

VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

TVIRTINU:

Pareigos

Rektorius Juozas Augutis

2019 m. lapkričio mėn..... d.

**ŽEMĖS, MAISTO ŪKIO, ŽUVININKYSTĖS IR KAIMO PLĖTROS
MOKSLINIŲ TYRIMŲ IR EKSPERIMENTINĖS PLĖTROS 2015–2020 METŲ
PROGRAMA**

**LIETUVOS JUODMARGIŲ HOLŠTEINŲ (LJH) BEI LIETUVOS ŽALŲJŲ IR
ŽALMARGIŲ VEISLIŲ GALVIJŲ GENETINĖ ANALIZĖ**

2019 M. ATASKAITA

Vadovas

Algimantas Paulauskas

Kaunas

2019

Darbo vadovas

Prof. dr. (habil.p.) Algimantas Paulauskas

Vykdytojai

Prof. Dr. Jana Radzijevskaja

Dr. Loreta Griciuvienė

Dr. Asta Aleksandravičienė

Turinys

ĮVADAS	4
Tyrimo tikslas	4
Tyrimo uždaviniai:	4
Rezultatai, kurie bus pasiekti įgyvendinus MTTV projektą.....	5
TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI	6
REZULTATAI	17
Lietuvos Juodmargių galvijų veislių genetiniai tyrimai pagal DNR.....	17
Lietuvos žaliųjų galvijų veislių genetiniai tyrimai pagal DNR.....	24
IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS	27
Publikacijos	28
Priedas - straipsnio rankraštis.....	29

IVADAS

Pagal Nacionalinę Gyvulininkystės sektoriaus 2014-2020 m. programą, būtina gerinti pieninių bandų genetinį potencialą. 1901 m. laikomi Lietuvos juodmargių galvijų veislės kūrimo pradžia. Intensyviausiai buvo panaudoti Olandijos juodmargiai galvijai. Nors galvijai ir turėdami daugiausiai olandiško kraujo, 1951 m. buvo pripažinta Lietuvos juodmargių galvijų veislė (su 26 kodu). 1955 m. visuose ūkiuose galvijų buvo 20312, iš jų 8473 karvės, kurių 93 proc. buvo Lietuvos juodmargės. Tuo metu šalia LJ veislės galvijų, Lietuvoje buvo veisiamos ir kitų šalių juodmargių veislių karvės, kaip Vokietijos juodmargiai, Britanijos Frizų, Olandijos juodmargiai ir Danijos juodmargiai.

Lietuvos žalieji (veislės kodas – 1) išvesta veislė, vietinius galvijus kryžminant su Danijos žalaisiais, anglerais, švicais, Latvijos dvylaisiais, Švedijos žalmargiais ir simentalais. Didžiausią įtaką Lietuvos žaliųjų galvijų veislei turėjo Danijos žalieji galvijai.

Nuo aštuntojo dešimtmečio Lietuvos pieniniai galvijai pradėti intensyviai gerinti, panaudojant Amerikos ir Kanados Holšteinus, o taip pat holšteinizuotus Danijos, Vokietijos, Britų frizų veislės galvijus, siekiant pagerinti produktyvumo ypač pieno sudėties bei galvijų eksterjero rodiklius, tinkamumą mechanizuotam melžimui, penėjimosi, mėsines ir kitas savybes, siekiant gauti ūkiškai ekonomiškesnius galvijus.

Intensyvi gyvulininkystė ir naujų žemės ūkio metodų taikymas joje lėmė, kad tam tikros rūšies galvijų, veisimas turėjo įtakos kelių, labai aukšto produktyvumo specializuotų veislių paplitimui, o šios tapo vienodos genetiniu požiūriu. Pagal Nacionalinę Gyvulininkystės sektoriaus 2014-2020 m. programą, siekiant gerinti pieninių bandų genetinį potencialą, labai svarbu žinoti faktinę genetinės įvairovės būklę. Todėl

Tyrimo tikslas

– panaudojant DNR žymenis atlikti Lietuvos Juodmargių, Holšteinizuotų galvijų, veislės grynumo genetinį vertinimą ir Lietuvos žaliųjų galvijų ir jiems gerinti naudojamų veislių Lietuvoje laikomų galvijų palyginamąjį genetinį vertinimą.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti Lietuvos Juodmargių galvijų veislių genetinį grynumą pagal DNR.
2. Panaudojant mikrosatelitinius žymenis įvertinti naujai kuriamos Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės genetinį panašumą su 100 % Holšteinų galvijų veislės galvijais.
3. Palyginti Lietuvos Juodmargių galvijų veislių genotipus su kaimyninių šalių šiandieninėmis veislėmis, tam tikslui panaudojant ir duomenis iš DNR genų banko.

4. Įvertinti Lietuvos žaliųjų galvijų veislės genetinį grynumą pagal DNR.
5. Panaudojant mikrosatelitinius žymenis įvertinti skirtingomis veislėmis pagerintų Lietuvos žaliųjų galvijų veislės genetinį panašumą su Senojo genotipo Lietuvos žaliųjų veisle.
6. Palyginti Lietuvos žaliųjų ir žalmargių galvijų veislių genotipus su kaimyninių šalių šiandieninėmis veislėmis, tam tikslui panaudojant duomenis iš DNR genų banko.

Rezultatai, kurie buvo pasiekti įgyvendinus MTTV projektą:

Buvo įvertintas Lietuvos Juodmargių genetinis pranašumas lyginant su Holšteinų galvijų veislės galvijais, Lietuvos žaliųjų galvijų veislės genetinis panašumas su Senojo genotipo Lietuvos žaliųjų veisle, Lietuvos Juodmargių ir žaliųjų galvijų veislių genetinis grynumas.

Buvo palyginti Lietuvos Juodmargių, Lietuvos žaliųjų ir žalmargių galvijų veislių genotipai su kaimyninių šalių veislėmis. Gauti duomenys bus naudingi veislininkystės sektoriui. Taip bus parengiamos rekomendacijos galvijų augintojams.

TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI

MTTV PROJEKTO PLANAS IR JO VYKDYMAS

Eil. Nr.	MTTV projekto etapo pavadinimas	MTTV projekto etapo trumpas aprašas, numatomi atlikti darbai	Įvykdymo terminas	Vykdytojai (vardas, pavardė)
1.	Įvertinti Lietuvos Juodmargių ir Lietuvos žaliųjų galvijų veislių genetinį grynumą; panaudojant mikrosatelitinius žymenis įvertinti naujai kuriamos Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės genetinį panašumą su 100 % Holšteinų galvijų veislės galvijais	1. Įvertinti galvijų veislių genetinį grynumą; <u>(Ivykdyta)</u> 2. Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės genetinį panašumą Etapai: - dalyvaujant Lietuvos juodmargių galvijų gerinimo asociacijai, iš Lietuvoje naujai kuriamų Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų surenkama kraujo ir audinių mėginiai, <u>(Ivykdyta)</u> VDU genetikos laboratorijoje: - išskiriama DNR molekuliniams tyrimams; - atliekama DNR mikrosatelitų tyrimai ir sekvenavimas <u>(Ivykdyta)</u> - įvertinamas veislių genetinį grynumą ir panašumą su kitomis veislėmis pasinaudojant sekoskaitos duomenimis iš NCBI duomenų bazės (GenBank).. <u>(Ivykdyta)</u>	2019.06.30- 2019.07.30 2019.07.31- 2019.11.30	Prof. Algimantas Paulauskas, prof. Jana Radzijeuskaja, dr. Loreta Griciuvienė
2.	panaudojant mikrosatelitinius žymenis įvertinti Lietuvos žaliųjų galvijų veislės genetinį panašumą su Senojo genotipo Lietuvos žaliųjų veisle, palyginti Lietuvos Juodmargių, Lietuvos žaliųjų ir žalmargių galvijų veislių genotipus su	1. Įvertinti Lietuvos žaliųjų galvijų veislės genetinį panašumą; <u>(Ivykdyta)</u> 2. Gautų duomenų analizė (palyginami Lietuvos Juodmargių, Lietuvos žaliųjų ir žalmargių galvijų veislių genotipus su kaimyninių	2019.06.30-	Prof. Algimantas Paulauskas, prof. Jana Radzijeuskaja, dr. Loreta Griciuvienė

	kaimyninių šalių šiandieninėmis veislėmis	šalių galvijų veislėmis) Etapai: - dalyvaujant Lietuvos žaliųjų galvijų gerintojų asociacijai, iš Lietuvoje Lietuvos žaliųjų galvijų veislės galvijų surenkama kraujo ir audinių mėginiai, <u>(Ivykdyta)</u> VDU genetikos laboratorijoje: -išskiriama DNR molekuliniams tyrimams; -atliekama DNR mikrosatelitų tyrimai ir sekvenavimas, <u>(Ivykdyta)</u> -įvertinamas veislių genetinis grynumas ir panašumas su kitomis veislėmis pasinaudojant sekoskaitos duomenimis iš NCBI duomenų bazės (GenBank). <u>(Ivykdyta)</u> 3. Parengiamos ataskaita Žemės ūkio ministerijai ir rekomendacijos galvijų gerintojų asociacijoms <u>(Ivykdyta)</u> 4. Seminaras Galvijų augintojų asociacijoms „Lietuvos juodmargių Holšteinų (LJH) bei Lietuvos žaliųjų ir žalmargių veislių galvijų genetinė analizė“ <u>(numatyta 2020 m. sausio mėn.)</u>	2019.07.30 2019.07.31-2019.11.30 2019.12.01-2019.12.30 2020.01.xx.	
--	--	--	--	--

TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI

Medžiaga

Mėginių pavyzdžiai buvo sutinkti dalyvaujant Lietuvos juodmargių galvijų gerinimo asociacijai ir Lietuvos žaliųjų galvijų gerintojų asociacijai. Tyrimui buvo panaudota 200 juodmargių galvijų ir 100 žaliųjų galvijų mėginių. Juodmargių galvijų individai buvo suskirstyti į 6 grupes pagal Holšteinų veislės kraujo dalių grupes, tarp kurių yra 20 grynakraujai Holšteinai bei seno genotipo individai, kurių Holšteinų veislės kraujo dalis yra mažesnė 45 % (1 lentelė).. Galvijų DNR tyrimui buvo panaudoti ausies audiniai, sudėti į sterilius mėgintuvėlius. Surinkti mėginiai iki DNR skyrimo buvo laikomi užšaldyti -20°C temperatūroje .

1 lentelė. Atskirų veislių galvijų skaičius

Galvijų veislės	Kodas	Individų skaičius
<i>Juodmargiai</i>		200
grynakraujai Holšteinai		70
Lietuvos juodmargiai:		
Seno genotipo (Iki 50%)	SGLJ	10
62-70	6LJ	15
71-78	7LJ	10
83-90	8LJ	20
>93,75	9LJ	75
<i>Žaliųjų ir žalmargių:</i>		100
<i>Lietuvos</i>	LŽ	20
<i>Lietuvos seno genotipo</i>	SGLŽ	20
<i>Danijos</i>	DŽ	20
<i>Švedijos</i>	ŠŽ	20
<i>Anglerai</i>	AL	20

DNR išskyrimas iš galvijų audinių

DNR išskyrimui iš galvijų spermos ir ausies audinio naudotas „Genomic DNA Purification Kit“ („ThermoScientific“, Lietuva). DNR išskyrimo iš raumens audinių etapai, remiantis gamintojo nurodymais: 10 mg audinio užpilama 200 µl TE homogenizacijos buferio (Tris + EDTA + H₂O), audinys homogenizuojamas. Gerai išmaišytas mėginys užpilamas 400 µl lizės buferio ir inkubuojama +65°C temperatūroje 10 minučių kas 2 min. mėginius pavartant. Mėginiai užpilami 600 µl chloroformo ir sumaišomi, kad gautųsi emulsija, centrifuguojama 2 min 10 000 aps/min greičiu. Viršutinis vandeninis sluoksnis atsargiai nusiurbiamas su pipete ir pernešamas į kitą mėgintuvėlį, jei nusiurbtas centrifugatas dar nėra skaidrus, pakartojamas valymas chloroformu. Gautas DNR vandeninis tirpalas užpilamas tokiu pat tūriu DNR išsodinimo tirpalo (išsodinimo tirpalo paruošimas: 80 µl išsodinimo tirpalo sumaišoma su 720 µl

distiliuoto vandens). Tirpalas švelniai pavartomas 3-5 kartus, mėginys centrifuguojamas 3 min 10 000 aps/min greičiu. Gautas tirpalas nupilamas nuo nuosėdų, nuosėdas užpilamos 100 µl NaCl tirpalo ir visiškai ištirpinamos. Tirpalas užpilamas 300 µl 96% etanolio, švelniai pavartomas ir paliekamas -20°C 10 min arba per naktį. Mėginys centrifuguojamas 5-6 min 10 000 aps/min greičiu, etanolis nupilamas nuo gautų DNR nuosėdų ir visiškai išdžiovinamas (palaikant termostate), tačiau negalima perdžiovinoti. Mėginys užpilamas 20 µl TE buferio, ištirpinamas ir laikomas šaldiklyje -20°C temperatūroje.

DNR koncentracijos ir švarumo nustatymas

DNR tirpalai sugeria ultravioletinius spindulius, tirpalų koncentracija matuojama esant 260 nm bangos ilgiui. Tirpalo sluoksnio storiui esant 1 cm, optinis tankis lygus 1, o dvigrandės DNR koncentracija tirpale atitinka 50 µg/ml. DNR kiekis tirpaluose apskaičiuojamas remiantis šia formule:

$$\text{dsDNR koncentracija} = 50 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{260}^* \times \text{praskiedimas}$$

kur OD₂₆₀ - tirpalų sugertis esant 260 nm ilgio bangai.

Užterštų DNR tirpalų matavimo rezultatai nėra tikslūs. Vertinant tirpalų švarumus skaičiuojamos OD₂₆₀/OD₂₈₀ ir OD₂₆₀/OD₂₈₀ santykių reikšmės. Gryno DNR tirpalo OD₂₆₀/OD₂₈₀ optinių tankių reikšmė turėtų būti ~1,8, RNR tirpalo - ~2. Žemos reikšmės gali būti gautos tuo atveju, kai tirpalai yra užteršti baltymais arba fenoliais.

Galvijų DNR mėginių koncentracija ir švarumas buvo išmatuotas naudojant „NanoDrop 2000“ sistemą. Atskaitos taško nustatymui naudotas TE buferis. 2 µl TE buferio užlašinama ant spektrofotometro matavimo paviršiaus ir kompiuterio programoje spaudžiamas mygtukas „Blank“. Matavimo paviršius nuvalomas, tiriamasis mėginys užlašinamas ant švaraus matavimo paviršiaus. „NanoDrop“ „kojelė“ užlenkiama, kompiuterio programoje spaudžiamas mygtukas „Measure“, pamatuojama DNR koncentracija ir švarumas, gauti rezultatai matomi kompiuterio ekrane ir išsaugomi kietajame diske. Po kiekvieno matavimo spektrofotometro paviršius nuvalomas. Tyrimuose naudotų DNR mėginių koncentracija svyravo 10 – 400 ng/µl ribose, optinių tankių santykis – 1,7 – 2,0.

Mikrosatelitinių sekų tyrimai

Mikrosatelitai kartotinių sekų atkarpos (SSR angl. *Simple Sequence Repeats*) - trumpos DNR atkarpos žymenys, sudarytos iš viena po kitos pakartotų kelių nukleotidų dydžio sekų. Šis metodas vienas iš dažniausiai taikomų įvairių žinduolių genetinės įvairovės tyrimuose.

Pradmenys buvo pasirinkti iš Tarptautinės gyvūnų genetikos draugijos ir Maisto ir agrikultūros organizacijos (angl. *International Society for Animal Genetics and Food and*

Agriculture Organization of the United Nations (ISAG and FAO)) rekomenduojamų žymenų, skirtų tirti žymių galvijų veislių DNR, specifinių genotipų nustatymui (FAO 2004) (2 lentelė).

2 lentelė. Galvijų mikrosatelitai, lokalizacija bei pradmenų sekos

Eil. Nr.	Žymenų pavadinimas	Žymenų sekos	Fluorescuojanti žymė	Produkto dydis (bp)
1	BOVIRBP	5'-GTATGATCACCTTCTATGCTTC-3' 5'-GCTTTAGGTAATCATCAGATAGC-3'	6FAM	144–146
2	BTJAB1	5'-CATTAAGGGCTGGGATTTCCT-3' 5'-AGATTTCTGGAGGAGGCTCACAGCA-3'	6FAM	206–228
3	BM6438	5'-TTGAGCACAGACACAGACTGG-3' 5'-ACTGAATGCCTCCTTTGTGC-3'	6FAM	264–274
4	BM2830	5'-ATGGGCGTATAAACACAGATG-3' 5'-TGAGTCCTGTCACCATCAGC-3'	CY3	143–163
5	TGLA122	5'-CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC-3' 5'-AATCACATGGCAAATAAGTACATAC-3'	6FAM	141–163
6	ETH10	5'-GTTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA-3' 5'-CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC-3'	6FAM	211–215
7	BM1225	5'-TTTCTCAACAGAGGTGTCCAC-3' 5'-ACCCCTATCACCATGCTCTG-3'	6FAM	254–260
8	BM1818	5'-AGCTGGGAATATAACCAAAGG-3' 5'-AAGTGCTTTCAAGGTCCATGC-3'	CY3	260–264
9	RT9	5'-TGAAGTTTAATTTCCACTCT-3' 5'-CAGTCACTTTCATCCACAT-3'	6FAM	135–141
10	BM723	5'-ACCCTTGCTTTTCTGCTGG-3' 5'-CATCCTGTGTGAGTGTGTGG-3'	6FAM	150
11	ETH121	5'-CCAACTCCTTACAGCAAATGTC-3' 5'-ATTTAGAGCTGGCTGGTAAGTG-3'	6FAM	182–210
12	BOVFSH	5'-CTTCTTGGGATATAGACTTAGTGGC-3' 5'-GCTTAGATTAGCCTGACTATGA-3'	6FAM	300–350
13	TGLA53	5'-GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA-3' 5'-ATCTTCACATGATATTACAGCAGA-3'	CY3	146–148
14	AGLA232	5'-CCTTTGCAAATACCTCCTGACCAG-3' 5'-AATGGTTCTACATTTGCTAGGTGTC-3'	6FAM	140–160
15	BM1824	5'-GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC-3' 5'-CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG-3'	6FAM	178–180
16	RT29	5'-GCCTTCTTTCATCCAACAAA-3' 5'-CCCATCTTCCCATCCTCTT-3'	6FAM	250–300

SSR molekulinų žymenų polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininė reakcija buvo atlikta 15 µl tūryje, susidedančiame iš 1X PGR buferio +KCl -MgCl₂ (50 mM KCl), po 0,3 µM kiekvieno pradmens, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 1 vieneto (U) Taq polimerazės, ~50 ng DNR ir vandens. Kiekvienos reakcijos metu naudotos neigiamos kontrolės – PGR mišinys be DNR.

Mikrosatelitiniai DNR žymenys buvo sugrupuoti atsižvelgiant į fluorescuojančią žymę bei produkto dydžio ribas (bp). Iš viso buvo pagaminti 4 pradmenų mišiniai.

Dauginei PGR reakcijai atlikti buvo naudoti dvi PGR programos (3, 4 lentelės).

3 lentelė. I PGR programa

Temperatūra °C		Laikas t	Ciklų skaičius
95		5 min	1
95		45 s	35
50-60		45 s	
72		30 s	
72		10 min	1
4		laikymas	1

4 lentelė. II PGR programa

Temperatūra °C	Laikas t	Ciklų skaičius
95	15 min	1
84	2 min	3
54	20 s	
72	10 s	
94	15 s	35
54	20 s	
72	10 s	
72	30 min	1
4	laikymas	1

Biosan „DNA/RNA UV-CLEANER UVT-S-AR“ laminaras, Eppendorf 5324 „minispin“ centrifūga, Biosan „Vortex V-1 plus“ buvo naudoti PGR reakcijos mišiniams paruošti. PGR buvo vykdoma termocikleryje, Eppendorf Mastercycler gradient, AG 22331, Vokietija. Iki PGR naudojimo DNR mėginiai buvo laikomi prie -20 °C temperatūroje. Paviršių valymui buvo naudojamas natrio hipochloritas (0,25%) (Sigma Aldrich #STBG3237V).

DNR elektroforezė poliakrilamido gelyje

Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje vykdyta vertikaloje padėtyje. SSR PGR pagausinimo produktai išskirstyti 8 % poliakrilamido gelyje, kurio sudėtis: 78 ml. H₂O, 1 ml 50X TAE, 20 ml 40 % akrilamido, 1 ml 10 % APS, 83 µl TEMED. Gelis užpilamas tarp dviejų stiklų, įdedamos šukutės ir paliekamas polimerizuotis ~1 val. kambario temperatūroje. PGR produktai sumaišomi su 6X dažu („ThermoScientific“, Lietuva), santykiu 5:1 ir įnešami į gelio šulinėlius, į šoninius šulinėlius įneštas „O’RangeRuler 20 bp DNA Ladder“ molekulinės masės žymuo (20 – 300 bp) arba 50 bp molekulinės masės žymuo GeneRuler DNA Ladder (50 – 1000 bp).

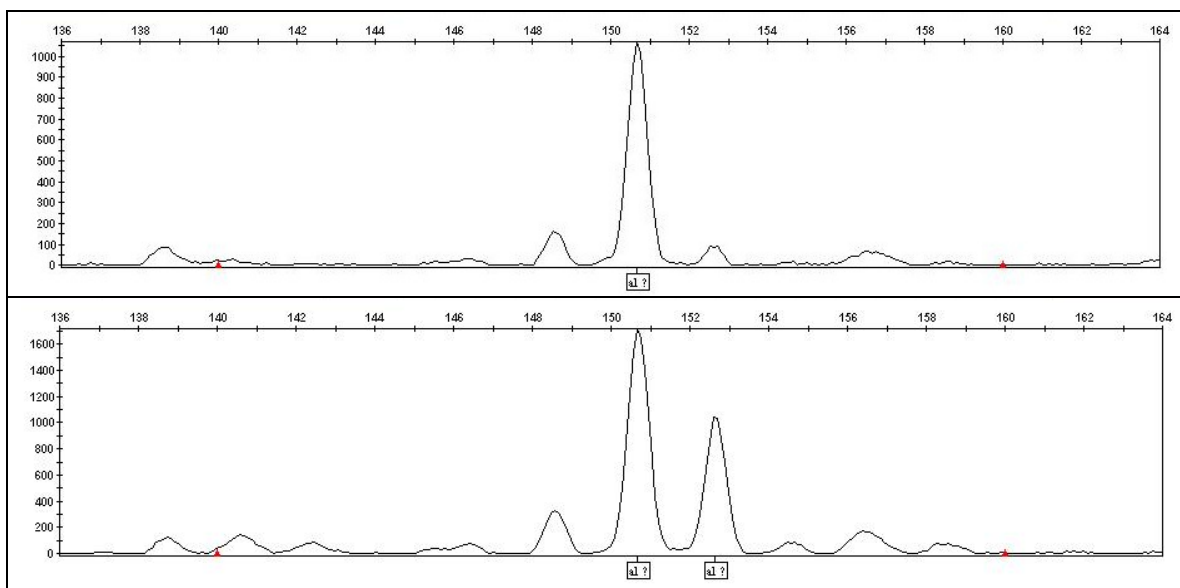
Elektroforezė vykdoma 6-7 val. esant ~250 V srovės stipriui. Pasibaigus laikui, srovės šaltinis išjungiamas, elektroforezės forma išimama iš elektroforezės aparato, atsargiai vienas nuo kito atskiriami stiklai. Gelis pamerkiamas į vonelę, kurioje yra 1l 0,5X TAE buferio su 10 µl etidžio bromido ir laikomas apie 10 min, kas kelias minutes vonelę pajudinant, kad buferis

judėtų. Rezultatai įvertinami UV šviesoje, naudojant GelDoc-It 310 sistemą ir VisionWorks LS programinę įrangą, gelio nuotrauka išsaugoma ir įrašoma į kompiuterio atmintį.

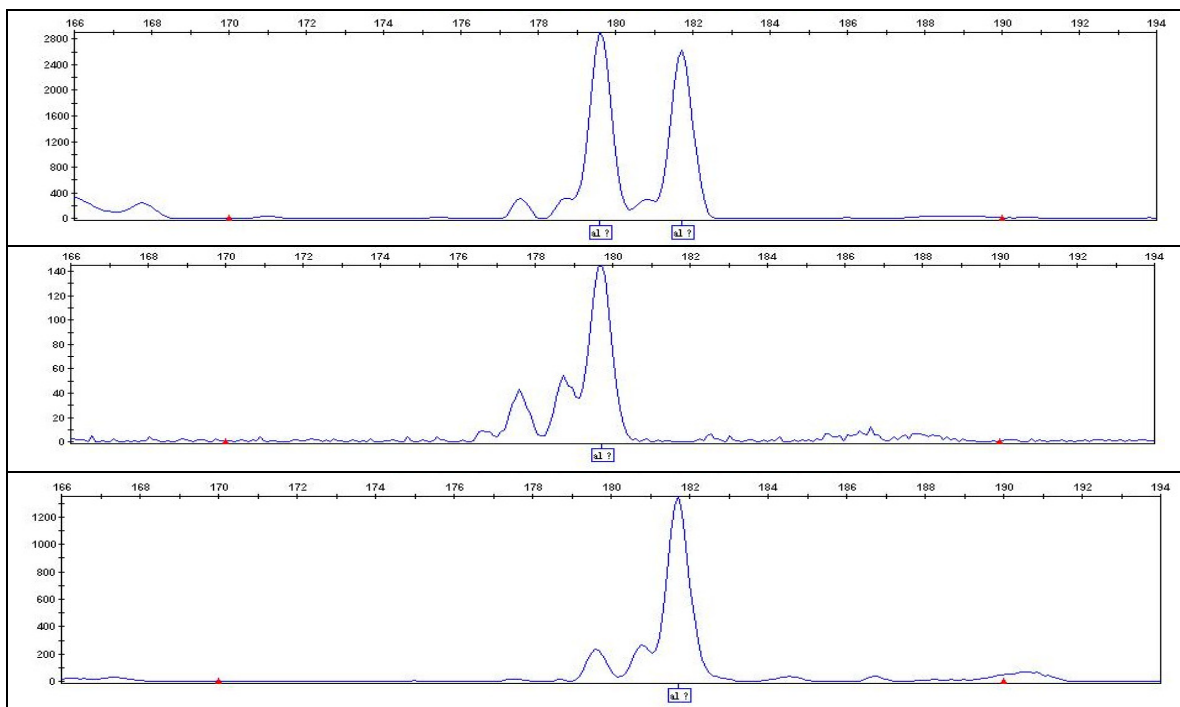
Kapiliarinė DNR elektroforezė

Kapiliarinė elektroforezė atliekama plonuose 50 µm diametro kapiliaruose, kurie yra užpildyti specialiais klampiais polimerais, arba tiesiog tirpale. Mėginys kapiliare migruoja dėl didelės įtampos tarp elektrodų, matuojama, kada molekulės pasiekia detektorių. Kapiliarinės elektroforezės metu nustatomas migracijos laikas, o ne atstumas. Pagrindiniai kapiliarinės elektroforezės privalumai: didelė PGR produktų skiriamoji geba ir trumpesnis atlikimo laikas (10 – 15 min).

Galvijų pagausinti DNR fragmentai buvo analizuoti naudojant genetinį analizatorių „ABI 3130 Genetic Analyser“ („Applied Biosystems“, Ltd.) (2, 3 pav.).

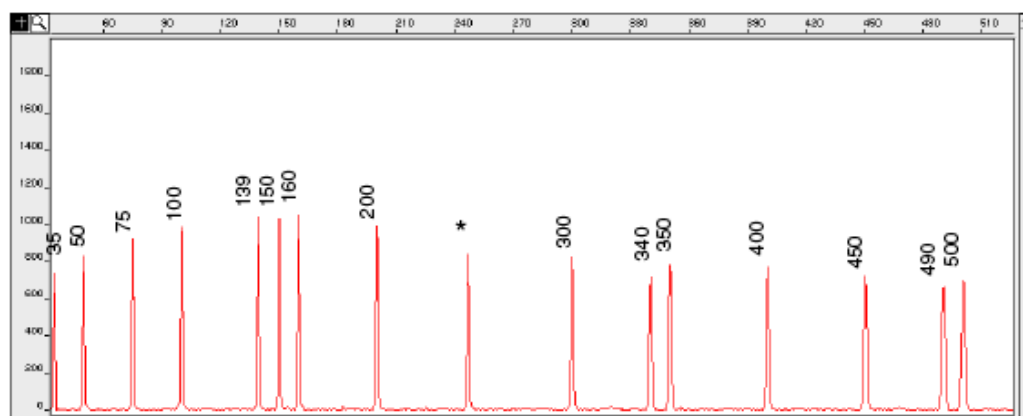


1 pav. TGLA53 mikrosatelitinio žymens kapiliarinė elektroforegrama. Matomi du genotipai: homozigota 150/150 ir heterozigota 150/152



2 pav. BM1818 mikrosatelitinio žymens kapiliarinė elektroforegrama. Matomi trys genotipai: heterozigota 179/181, homozigota 179/179 ir homozigota 181/181

PGR produktai buvo atskiesti 10 kartų dejonizuoto formamido tirpalu, kurio sudėtyje yra DNR ilgio standartas GeneScan-500 LIZ („Applied Biosystems“, Ltd.) (3 pav.), supilstyti į plokštelę, įdėti į genetinį analizatorių, paleista programa.



3 pav. GeneScan-500 LIZ DNR ilgio standartas („Applied Biosystems“, Ltd.)

Kapiliarinės elektroforezės rezultatų įvertinimui buvo naudota GeneMapper v4.0 programa, kurioje įvertinti smailių signalų stiprumai.

DNR amplifikacijos rezultatai parodė, kad trys lokusai (AGLA232, BM1824, RT29) nesiampifikavo arba amplifikuotų alelių fluorescencija buvo per silpna juos vertinti. Sėkmingai ampifikavosi 13 fluoresuojančių mikrosatelitinių žymenų.

Statistinė duomenų analizė

Kapiliarinės elektroforezės smailių įvertinimui naudota GeneMapper v4.0 programa („Applied Biosystems“), duomenys gauti iš šios programos apdoroti naudojant du Bajeso statistikos algoritmus. Duomenys buvo analizuojami naudojant programą STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard ir kt., 2000; Falush ir kt., 2003; Falush ir kt., 2007). Norint nustatyti genetinių subpopuliacijų (K) skaičių buvo atliekama 10 nepriklausomų pakartojimų, kai galimos K reikšmės yra nuo 1 iki 9 su periodiniais 200 000 kartų pakartojimais, kurių ilgis 10^6 Markov'o grandinės Monte Carlo (MCMC) pakartojimai bendram duomenų kiekiui. Tikintis nustatyti patikimą genų srautą, buvo pritaikyti modelių įvertinimai, koreliuojantys su alelių dažniu ir susimaišymu: ALPHA - Dirichlet'o parametras, kuris leidžia įvertinti susimaišymo laipsnį, jo dydis gali varijuoti tarp atskirų pakartojimų. Remiantis logaritmine panašumo (log-likelihood) reikšme (ir subpopuliacijų supanašėjimu), pasirinkome labiausiai tikėtiną subpopuliacijų skaičių, kuris yra susijęs su kiekviena K reikšme, taip kaip ir su ΔK reikšmės apskaičiavimo metodu (Evano ir kt., 2005). Buvo apskaičiuotas kiekvieno individo indėlis (q) išreikštas procentais, išvedant vidurkį iš q reikšmių per skirtingus pakartojimus esant tai pačiai K reikšmei. Taip pat duomenys buvo analizuoti naudojant individų klasterizavimo algoritmą BAPS v.6.0 (Cheng L ir kt., 2013), kuris leidžia daryti išvadą apie surinktų duomenų genetinių grupių skaičių, buvo atlikta 10 pakartojimų kiekvienai K nuo 1 iki 9 reikšmei.

Duomenys gauti iš GeneMapper v4.0 ir STRUCTURE 2.3.4 programų buvo apdoroti naudojant GenAlEx 6.501 programą (Peakall ir Smouse, 2006; 2012). Kiekvienam klasteriui (remiantis STRUCTURE programos rezultatais) - apskaičiuoti genetiniai rodikliai, kuriais remiantis galima įvertinti Lietuvos galvijų genetinę įvairovę: alelių skaičius (A), stebimas heterozigotiškumas (H_o), tikėtinas heterozigotiškumas (H_e), Fiksacijos indeksai (F_{is} , F_{it} , F_{st}) pagal kiekvieną lokusą, genetinis atstumas pagal Nei (1978). Taip pat naudojant šią programą atliktas molekulinės įvairovės (AMOVA) įvertinimas naudojant 9999 pakartojimus, principinių koordinačių (PCoA) analizė, genetinės diferenciacijos lygis tarp klasterių buvo vertinamas pagal F_{ST} reikšmę.

Populiacijos (veislės) atitikimas Hardžio-Veinbergo pusiausvyrai (HV) ir heterozigotinių individų pertekliaus ar trūkumo patikimumas (atlikus 10 000 dememorizavimo žingsnių, 500 grupių ir 10000 pakartojimų) buvo tikrinamas naudojant programą GENEPOP 4.0 versiją (Raymond ir Rousset, 1995) su patikimumo reikšme P, kuri buvo apskaičiuota naudojant Markov'o grandinės algoritmą su 10,000 dememorizacijos žingsnių 100 grupių ir 1000 pakartojimų. Naudojant MICROCHECKER 2.2.3 programą (Oosterhout ir kt., 2004), bei atlikus 1000 pakartojimų esant 95% pasikliautiniam intervalui buvo tikrinamos vertinimo klaidos ir nulinių alelių galimybės. Polimorfizmo informacijos indeksas (PIC) apskaičiuotas naudojant

MSTOOLS (Park, 2001) programą. Alelių įvairovė (A_R) buvo apskaičiuota naudojant programą FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001), unikalių alelių įvairovė (P_R) buvo vertinama naudojant HP-RARE v1.1 remiantis retinimo metodu (Kalinowski, 2005).

Sekoskaita

mtDNR molekulinį žymenų polimerazės grandininė reakcija

Galvijų mitochondrinės DNR D-kilpos fragmento tyrimams remiantis Cybron ir kt. (1999) buvo naudoti AN4-bio -F ir AN3-R specifiniai žymenys (5 lent.).

5 lentelė. Galvijų AN4-bio -F ir AN3-R specifiniai žymenys.

Eil. nr.	Žymenų pavadinimas	Žymenų sekos	Produkto dydis (bp)
1	AN4-bio	5'-GGTAATGTACATAACATTAATG-3'	375 bp
2	AN3	5'-CGAGATGTCTTATTTAAGAGG-3'	

Polimerazės grandininė reakcija buvo atlikta 25 μ l tūryje, susidedančiame iš 1X PGR Master Mix buferio, po 2 pmol kiekvieno pradmens, ~50 ng DNR ir vandens. Pagausinimo reakcija:

6 lentelė. PGR programa

Temperatūra °C	Laikas t	Ciklų skaičius
94	5 min	1
94	1 min	30
55	1 min	
72	2 min	
72	5 min	
4	laikymas	1

Kiekvienos

reakcijos metu naudotos neigiamos kontrolės – PGR mišinys be DNR.

mtDNR PGR fragmento išskyrimas iš agarozės gelio

mtDNR D-kilpos PGR produktai buvo išskirstyti 1,5% agarozės gelyje, 0,5X TAE buferyje. Fragmentai iš gelio išgryninti naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ #K0691 rinkinį („ThermoScientific“, Lietuva). Fragmentas esantis agarozės gelyje išpjaunamas naudojant švarų skalpelį. Gelio gabalėlis įdedamas į prieš tai pasvertą tuščią 1,5 ml mėgintuvėlį ir pasveriamas. Gelis (santykis 1:1, svoris: tūris) užpilamas rišamuoju buferiu (angl. *Binding Buffer*). Mišinys inkubuojamas 10 min. arba ilgiau 60°C temperatūroje, kol visiškai ištirps agarozė. Į mišinį įpilama 100% izopropanolio santykiu 1:2 ir sumaišoma. Ištirpinto gelio mišinys perkeliamas į kolonėlę (iki 800 μ l), centrifuguojama 1 min. Supernatantas išpilamas, kolonėlė įstatoma atgal į surinkimo mėgintuvėlį. Įpilama 100 μ l surišimo buferio, centrifuguojama 1 min., supernatantas išpilamas. Ant kolonėlės užpilama 700 μ l plovimo buferio (angl. *Wash Buffer*), skiesto su

etanoliu, centrifuguojama 1 min., supernatantas išpilamas. Tuščia kolonėlė centrifuguojama dar kartą 1 min., norint visiškai pašalinti plovimo buferio likutį. Kolonėlė perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį. Ant kolonėlės membranos užpilama 20 µl išplovimo buferio (angl. *Elution Buffer*), centrifuguojama 1 min. Kolonėlė išmetama, mėgintuvėlyje likusi išgryninta DNR laikoma šaldiklyje -20°C temperatūroje.

Galvijų mtDNR mėginių sekoskaita buvo atlikta automatinio 16 kapiliarų genetiniu analizatoriumi 3130xl (*Applied Biosystems*), kuriuo atliekama fluorescentiniais dažais žymėtų DNR fragmentų elektroforezė, jų detekcija lazeriu ir kompiuterinė analizė. Sekų analizė atlikta panaudojant MEGA X kompiuterinę programą ir NCBI duomenų bazę (GenBank).

REZULTATAI

LIETUVOS JUODMARGIŲ GALVIJŲ VEISLIŲ GENETINIAI TYRIMAI PAGAL DNR

Skirtingų alelių pasiskirstymas

Atlikus 13 mikrosatelitinių lokusų analizę, panaudojant 200 juodmargių galvių DNR pavyzdžius, nustatyti 250 aleliai. Nustatytų alelių skaičiaus pasiskirstymo tarp grupių ir lokusų duomenys pateikiami 7 lentelėje. Mažiausiai skirtingų alelių rasta BOVIRBP žymenyje (8), o daugiausiai BM2830 ir TGLA122 (29).

Aptiktų alelių skaičius tarp grupių svyravo nuo 35, 100 % Holšteinų veislės kraujo dalis turinčių galvių, iki 49, <50 % Holšteinų veislės kraujo dalis turinčių galvių. Didžiausias skirtingų alelių skaičius buvo nustatytas 7 pagal TGLA122 lokusą, 100% ir ETH10 >93,75% Holšteinų veislės kraujo dalių turinčiose grupėse.

7 lentelė. Skirtingų alelių pasiskirstymas grupėse ir lokusuose

Lokusas	Holšteinų kraujo dalis turinčios grupės (%)						Skirtingų alelių skaičius
	100	>93,75	83-90	71-78	62-70	< 50	
BOVIRBP	1	2	1	1	1	2	8
BTJAB1	2	3	3	5	4	5	22
BM6438	1	2	4	2	2	4	15
BM2830	4	5	4	6	5	5	29
TGLA122	7	5	4	5	3	5	29
ETH10	4	7	4	5	4	4	28
BM1225	3	2	3	3	2	4	17
BM1818	3	2	3	5	5	5	23
RT9	1	2	1	1	1	3	9
BM723	3	2	1	1	1	4	12
ETH121	6	3	3	5	5	2	24
BOVFSH	0	3	1	3	4	3	14
TGLA53	0	4	3	5	6	3	21
Iš viso	35	42	35	47	43	49	251

Dominuojančių alelių pasiskirstymas

Dominuojančių alelių (8 lentelė) skaičius buvo skirtingas tiek tarp grupių, tiek tarp lokusų. 13 tirtuose mikrosatelitiniuose lokusuose buvo rasti 36 skirtingi dominuojantys aleliai.

Daugiausiai skirtingų dominuojančių alelių rasta BM2830 lokuse (5), o mažiausiai BOVIRP lokuse (1).

Daugiausiai dominuojančių alelių rasta iki 50% holšteinų veislės kraujo dalių turinčioje grupėje (26), mažiausiai (13 ir 14) grupės, sudarančios 62-70%, 71-78%, 93,75% ir 100%

Holšteinų veislės kraujo dalį. Galime stebėti tendenciją, kad tam tikri mikrosatelitų aleliai yra labiau būdingi tam tikroms galvijų grupėms: BM2830- 170 bp alelis, BOVFSH -304 bp alelis, ETH121- 204 bp alelis dominuojantis grupėje, kuri turi 62-70% Holšteinų veislės kraujo dalį. BM2380 -160 bp, 164 bp ir 168 bp aleliai dominuojantys 100% Holšteinų veislės galvijų grupėje.

8 lentelė. Dominuojančių alelių pasiskirstymas grupėse ir lokusuose

Privačių alelių pasiskirstymas

Lokusas	Holšteinų kraujo dalis turinčios grupės (%)						Dominuojančių alelių skaičius
	100	>93,75	83-90	71-78	62-70	<50	
BOVIRBP	135	135	135	135	135	135	1
BTJAB1	224	224	220, 222, 224	220	224	222, 224	3
BM6438	270	260	270	270	270	260, 270	2
BM2830	160, 162, 164, 168	158, 162	158	158	162	158, 162, 170	5
TGLA122	140	162	146, 162	140, 162	140	140, 148, 162	3
ETH10	216	214	218, 222	216	216	214, 216, 218	4
BM1225	244	242	244	244	244	244	2
BM1818	264	268	268	268	264	264, 268	2
RT9	135	135	135	135	135	135, 140	2
BM723	148	148	148	148	148	148, 150	2
ETH121	200	206	206	200	204	196, 200	4
BOVFSH		306	306	320	304	306	3
TGLA53		162	162	170	160	160, 162	3
Iš viso	14	14	17	14	13	26	36

Unikalūs aleliai (9 lentelė) buvo rasti 5 iš 6 grupių (grupėje su 83-90% Holšteinų veislės kraujo dalimis nebuvo rasta). Privačių alelių nebuvo rasta lokusuose: BM6438 ir BM1225. Daugiausia unikalių alelių (10) buvo rasta 100% Holšteinų veislės kraujo dalių turinčioje grupėje, mažiausiai iki 50% Holšteinų kraujo dalių grupėje (4). Didžioji dauguma unikalių alelių rasti gana mažu dažniu: 0,1-0,25. Tai galėtų reikšti, kad jie yra heterozigotinės būklės ir šie genai išsivystė prie aplinkos prisitaikant mutacijų eigoje (Malevičiūtė, Baltrienė ir Miceikienė 2013). Tačiau grupės, su <50% Holšteinų veislės kraujo dalimis aleliai yra didelio dažnio: RT9 lokuse dažniu 1 ir BM723 dažniu 0,5, taip pat grupėje su 100% Holšteinų veislės kraujo dalimis BTJAB1 su dažniu 0,5. Tai reiškia, kad šie lokusai gali būti panaudoti kaip veislę charakterizuojantys žymenys.

9 lentelė. Privačių alelių pasiskirstymas grupėse ir lokusuose

Lokusas	Holšteinų veislės kraujo dalis (%)					Privačių alelių skaičius
	100	>93,75	71-78	62-70	<50	
BOVIRBP		143(0,1)				1
BTJAB1	213(0,5)		218(0,1)			2
BM6438						0
BM2830	160(0,25)	172(0,1)	178(0,1)			3
TGLA122	154(0,1), 156(0,1)	160(0,1)	152(0,2)			4
ETH10		206(0,1), 212(0,1)				2
BM1225						0
BM1818			260(0,1)	272(0,25)	262(0,167)	3
RT9					140(1)	1
BM723	154(0,1), 160(0,1)	162(0,1)			158(0,167), 150(0,5)	5
ETH121	178(0,1), 180(0,1), 182(0,1), 192(0,2)	202(0,2)		186(0,125)		6
BOVFSH		318(0,2)	312(0,1)	314(0,125)		3
TGLA53				154(0,125), 166(0,125), 176(0,125)		3
Iš viso	10	8	5	6	4	33

Dažniausiai privatūs aleliai didelėse populiacijose atsiranda dėl atsitiktinių mutacijų ir individuose pasisikirsto heterozigotinėje formoje. Mažose populiacijose privatūs aleliai išnyksta dėl galimo giminiškų individų poravimosi arba krosbrydingo.

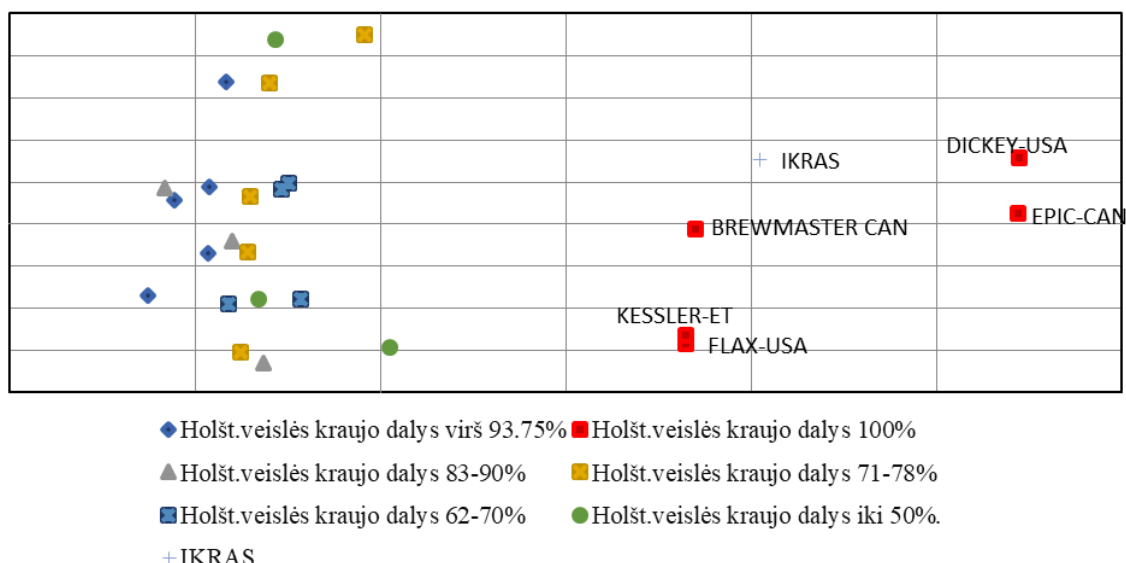
Kita didelio privačių alelių skaičiaus atsiradimo priežastis - galimas genų dreifas arba migracija iš populiacijos į populiaciją. Specifinių alelių radimas individuose suteikia prielaidą, kad šie aleliai išgyveno kaip adaptyvus genai, kurie gali būti esminiai tolimesniame galvijų veisime.

Šio tyrimo metu naudoti žymenys yra dažnai pasitelkiami tirti kitų galvijų veislėms: korėjiečių Peninsula, senegaliečių Gobra zebu arba pakistaniečių zebu, kur Holšteinų veislė buvo naudojama kaip palyginamoji. TGLA122, TGLA53 ir ETH10 lokusai yra labai dažnai minimi ir naudojami kitų galvijų genetinio variabilumo tyrimuose. Visuose tyrimuose, naudojant šiuos žymenis nustatyta didelė alelinė gausa, dominantinių bei privačių alelių skaičiaus paralelė (Cervini ir kt. 2006; Ndiaye ir kt. 2015; Hussain ir kt. 2016; Suh ir kt. 2014).

Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės genetinis panašumas

Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės genetinis panašumas įvertintas panaudojus principinių koordinačių analizę, kuri parodė, kad grupė su mažesniu nei 50 % (kodiniu pavadinimu "IKRAS") ir 100% Holšteinų veislės kraujo dalies galvijai yra genetiškai labiausiai nutolusios nuo kitų grupių (4 pav.). Pastebimas reikšmingas skirtumas, kuris aiškiai matomas

vizualiai. Tai visiškai sutampa su Suh ir kt. (2014) „Faktorinės korespondencijos“ atskirų galvijų mikrosatelitų genotipų analize, kur Holšteino veislė taip pat atsiskiria.



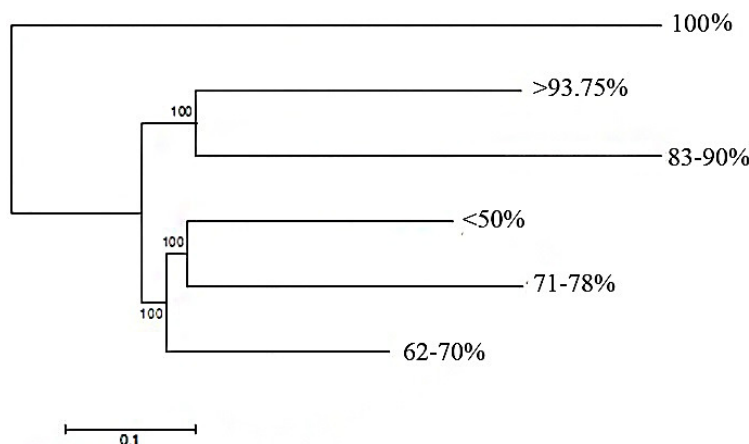
4 pav. Pieninių galvijų grupių pasiskirstymas dviejų pirmųjų principinių komponentų (PK) ašyse (PK1 22,55% ir PK2 9,68%).

Didžiausias polimorfizmas stebimas virš 93,75 % Holšteinų veislės kraujo dalis turinčioje grupėje, o mažiausias polimorfizmas aptinkamas 100 % Holšteinų veislės kraujo dalis turinčioje grupėje. Vidutinis polimorfizmo lygis tarp grupių yra 79,49 % (10 lentelė). **DNR polimorfizmo tyrimai gali padėti nuspręsti, kuri gyvūnų populiacija turėtų būti toliau veisiama ir kuri turėtų būti naudojama tolimesniems DNR tyrimams, nustatant produktyvumą ir sveikatingumą. Ši informacija būtų tiesiogiai panaudojama tolimesnėse veislių fenotipinių savybių gerinimo programose.**

10 lentelė. Polimorfizmas (%) veislių grupėse.

Veislių grupės	Polimorfizmas
>93.75%	100,00%
62-70%	92,31%
83-90%	76,92%
71-78%	76,92%
<50%	69,23%
100%	61,54%
Vidurkis	79,49%

Atlikus filogenetinio medžio analizę su Poptree2 sisteminiu paketu. (modifikuotas Kaimynų apjungimo algoritmas (*angl. Neighbour – Joining*) matome, kad grupės pasiskirstė į tris pagrindinius klasterius. Pirmąjį klasterį sudarė 100% Holšteinų veislės kraujo dalis turinti grupė, kuri buvo labiausiai nutolusi nuo kitų pieninių galvijų veislių grupių. Tuo tarpu antrajam klasteriui priklausė 83-90 % ir >93,75 % Holšteinų veislės kraujo dalis turinčios grupės. Grupės, sudarančios 62-70%, 71-78% ir <50% Holšteinų veislės kraujo dalį, sudarė trečiąją sankaują (5 pav.).



6. pav. Pieninių galvijų veislių filogenetinis medis, naudojant kaimynų apjungimo metodą (*angl. NJ*). Įkėlų (*angl. bootstrap*) reikšmės pavaizduotos virš medžio šakų, gautos panaudojant 1000 pakartojimų.

Atlikus Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės genetinio panašumo vertinimą pagal Nei ir F_{ST} parametrus, nustatyta, kad didžiausia genetinės distancija yra tarp 100% ir virš 93,75% Holšteinų veislės kraujo dalis turinčių grupių (0,359). Apskritai, 100% (grynakraujai Holšteinų) veislės galvijai su kitomis Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės grupėmis genetinės distancijos yra didelės. Tai parodo 100% veislės išskirtinius genetinius bruožus (11 lentelė).

11 lentelė. Nei genetiniai atstumai (žemiau diagonalės) tarp tirtų galvijų veislių. Maksimalios ir minimalios vertės- paryškintos.

Veislės grupės pagal Holšteinų veislės kraujo dalis %						
	100%	>93,75%	83-90%	71-78%	62-70%	<50%
100%	0,000					
>93.75%	0,359	0,000				
83-90%	0,275	0,151	0,000			
71-78%	0,277	0,198	0,172	0,000		
62-70%	0,246	0,281	0,252	0,137	0,000	
< 50%	0,290	0,264	0,228	0,132	0,188	0,000

Fiksacijos indeksas (F_{ST}), kurio reikšmė yra virš 0,25 laikoma, kad tai parodo, jog genetinis skirtumas labai didelis (Wright 1978). Maksimali F_{ST} reikšmė (12 lentelė) yra tarp 100% ir 93.75% Holšteinų veislės kraujo grupių turinčių veislių, kas nurodo didelį genetinį skirtumą. T.y. **Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės galvijus galima laikyti atskira veisle, kuri aiškiai skiriasi nuo tipinių Holšteinų galvijų veislės.**

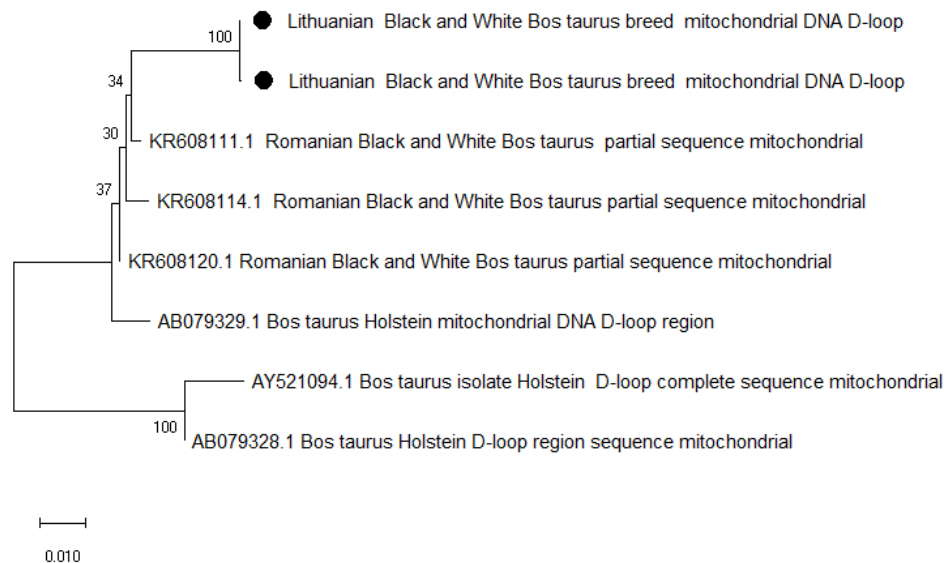
Mažiausios F_{ST} reikšmės rastos tarp 62-70% ir 71-78%, < 50% ir 71-78% bei 83-90% ir virš 93,75% veislių, kurių reikšmės artima 0. Tai parodo, kad šios veislės yra genetiškai susijusios. Nei genetinių atstumų rezultatų reikšmės (0.132 - 0.359) nežymiai skiriasi nuo Suh ir kt. (2014) apskaičiuotų, kurių rezultatas svyravo 0,129 – 0,316 intervale. Tolimesnė analizė parodė, kad F_{ST} reikšmės, kurias mes gavome (0 - 0,257), koreliuoja su Hussain ir kt. (2016) gautais rezultatais (0.02445- 0.22009).

12 lentelė. F_{ST} reikšmės (žemiau diagonalės) tarp tirtų galvijų veislių. Maksimalios ir minimalios vertės-paryškintos.

Veislės grupės pagal Holšteinų veislės kraujo dalis %						
	100%	>93.75%	83-90%	71-78%	62-70%	<50%
100%	0,000					
>93.75%	0,257	0,000				
83-90%	0,191	0,000	0,000			
71-78%	0,185	0,060	0,010	0,000		
62-70%	0,191	0,102	0,047	0,000	0,000	
<50%	0,085	0,080	0,010	0,000	0,002	0,000

mtDNR sekų analizė

Atlikus filogenetinę sekų analizę, naudojant Neighbor-Joining kaimynų sujungimo metodą, buvo gautas filogenetinis medis (7 pav.). Sudarant medį buvo panaudotos mūsų tyrime nustatytos juodmargių pieninių galvijų mtDNR sekos ir sekos iš “Genų banko” duomenų bazės. Filogenetinė analizė parodė aiškų Holšteinų atsiskyrimą nuo Lietuvos juodmargių veislių. Lietuvos juodmargių veislė susigrupavo į viena didelį klasterį kartu su juodmargių veislėmis iš Rumunijos. Tačiau klasteris skilo į du mažesnius klasterius, kuriuose matomi skirtumai tarp Lietuviškų juodmargių ir Rumunijos juodmargių veislių.



6 pav. Juodmargių galvijų Neighbor-Joining medis paremtas Kimura2-parameter modeliu, remiantis mtDNR D-kilpos sekomis. Įkėlų (bootstrap) reikšmės, pavaizduotos ant medžio šakų, gautos panaudojant 1000 pakartojimų, skalė apačioje parodo genetinį atstumą. Tyrimo metu identifikuotos sekos pažymėtos ●.

LIETUVOS ŽALŪJŲ GALVIJŲ VEISLIŲ GENETINIAI TYRIMAI PAGAL DNR

Žalųjų galvių tyrimai atlikti 100 galvių grupėje, kurie suskirstyti pagal veisles: Lietuvos žaliųjų- **LŽ**, seno genotipo Lietuvos žaliųjų- **SGLŽ**, Danijos žaliųjų - **DŽ**, Švedijos žaliųjų-**ŠŽ**, Anglų-**AL**. Amplifikacija atlikta su 10 pradmenų, padaugintų fragmentų ilgis svyravo nuo 133bp - 350bp, aptikti 168 skirtingi aleliai. (13 lent.).

13 lentelė. Tirtų galvių mikrosatelitų dydžio minimalios ir maksimalios rastos ribos bazių poromis.

Mikrosatelitai	Minimalios ir maksimalios dydžio ribos bp	Bendras skirtingų alelių sk. kiekviename lokuse
TGLA53	147bp-221bp	29
BM2830	143-163 bp	16
TGLA122	136bp-205bp	30
ETH121	133bp-161bp	20
BM1818	177bp-289bp	14
BM6438	264bp-274bp	11
BOVFSH	300bp-350bp	6
ETH10	211bp-215bp	18
BM1225	254bp-260bp	14
RT9	135bp-141bp	10
Viso		168

Ištirtose 100 galvių faktinis aptiktų skirtingų alelių skaičius visuose 10 lokusų svyravo nuo 32 (AL) iki 64 (DŽ). Didžiausias skirtingų alelių skaičius – 14 - buvo nustatytas ETH121 lokuse. Mažiausias skirtingų alelių skaičius - 1 - rastas RT9 lokuse LŽ, ŠŽ, AL ir SGLŽ veislėse.

14 lentelė. Faktiškai aptiktų skirtingų alelių skaičius ir jų pasiskirstymas kiekviename lokuse bei veislėje

Mikrosatelitai	Veislė					
	LJ	DŽ	LŽ	ŠŽ	AL	SGLŽ
TGLA53	12	12	6	6	4	4
BM2830	6	7	7	5	3	4
TGLA122	9	10	5	7	3	7
ETH121	10	14	7	10	4	8
BM1818	5	7	5	8	5	8
BM6438	3	2	4	2	2	4
BOVFSH	3	3	4	3	4	4
ETH10	3	4	5	4	3	5
BM1225	4	3	2	3	3	3
RT9	4	2	1	1	1	1
Viso	59	64	46	49	32	48

10 ištirtų mikrosatelitinių lokusų iš viso buvo nustatyti 77 skirtingi dominuojantys aleliai. Vertinant skirtingų veislių grupių mikrosatelitų įvairovę nustatyta, kad daugiausia dominuojančių alelių rasta Danijos žalmargių (14) ir Lietuvos juodmargių (16) veislėse, mažiausiai (10) Lietuvos žalmargių ir seno genotipo Lietuvos žaliųjų veislėse (15 lent.). Kai kurių veislių galvijuose skirtinguose lokusuose buvo aptikta po kelis dominuojančius alelius. Galime stebėti tendenciją, kad tam tikri mikrosatelitų aleliai yra labiau būdingi tam tikroms galvių veislėms.

15 lentelė. Aptikti dominuojantys aleliai tirtuose mikrosatelituose bei veislėse

Mikrosatelitai	Dominuojantys aleliai bp					
	LJ	DŽ	LŽ	ŠŽ	AL	SGLŽ
TGLA53	160,162	157	157	157	157	157
ETH10	216	215	215	215	215	215
TGLA122	140, 162	140	150	150	140	150
ETH121	200	147	139	137	141	137
BM1818	264, 268	264, 268	268	264, 268	264, 268	268
BM6438	260, 270	264, 268	268	264, 268	264, 268	268
BOVFSH	304, 306	270	-	270	-	-
BM2830	160	162, 170	162, 170	162	162	162, 170
BM1225	244	306, 320	306	306, 320	306	306
RT9	135	134	134	134	134	134
Viso	16	14	10	13	11	10

16 lentelė. Aptikti unikalūs aleliai tirtuose mikrosatelituose bei veislėje

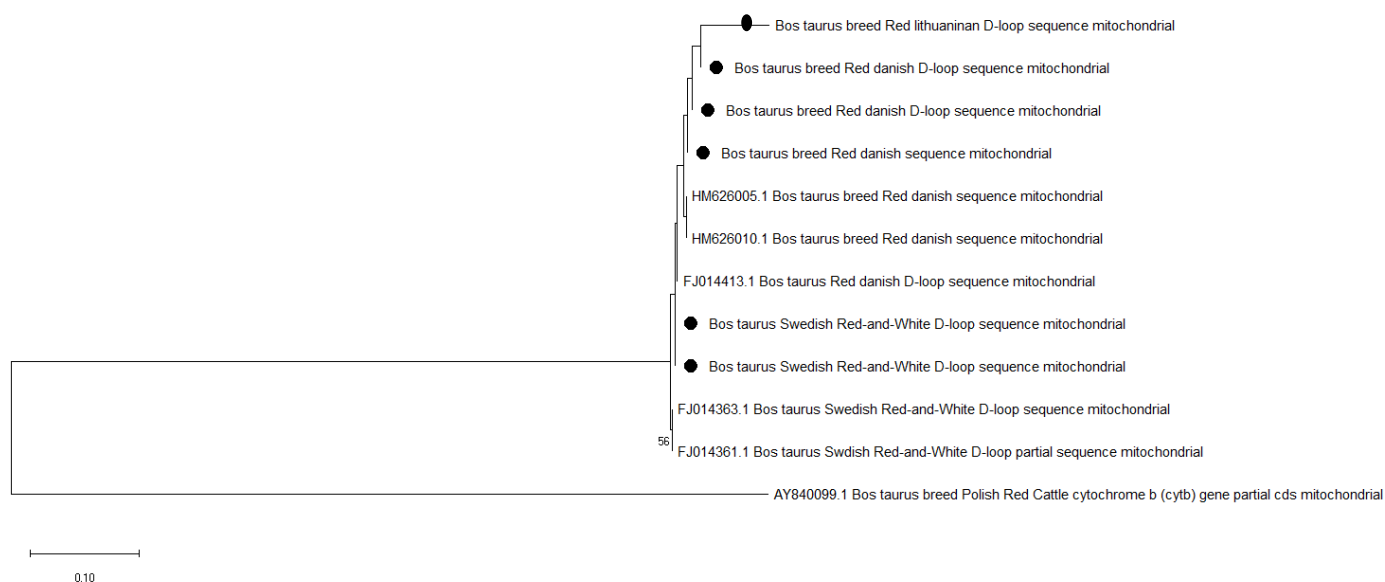
Mikrosatelitai	Unikalių alelių bp					
	LJ	DŽ	LŽ	ŠŽ	AL	SGLŽ
TGLA53	154	153	-	-	147	-
	166	173	-	-	-	-
ETH10	212	206	204	-	-	-
TGLA122	152	-	-	-	-	-
ETH121	180	153	-	134	-	-
	-	159	-	138	-	-
BM1818	260	-	-	184	-	-
		-	-	185	-	-
BM6438		-	-	-	-	-
BOVFSH	312	318	-	314	-	-
BM2830	172	206	-	-	206	-
	178	-	-	-	-	-
BM1225		-	-	-	-	-
RT9	140	-	138	-	-	-
Viso	10	7	2	5	2	0

Unikalūs tik vienai grupei aleliai buvo rasti visose tirtose galvių veislėse. Unikalių alelių skaičius skirtingose veislėse svyravo nuo 2 iki 10. Iš viso visose tirtose veislėse rasti 26

unikalūs aleliai. Daugiausiai unikalių alelių rasta Lietuvos juodmargių (10) ir Danijos Žalųjų (7) veislėse (16 lentelė). Specifinių alelių radimas individuose suteikia prielaidą, kad šie aleliai išgyveno kaip adaptyvus genai, kurie gali būti esminiai žymenys tolimesniame galvijų veisime.

Žalųjų galvijų individų genealogijos nustatymas ir palyginimas

Atlikus filogenetinę sekų analizę, naudojant Neighbor-Joining kaimynų sujungimo metodą, buvo gautas filogenetinis medis (7 pav.). Sudarant medį buvo panaudotos mūsų tyrime nustatytos pieninių galvijų sekos ir sekos iš “Genų banko” duomenų bazės. Filogenetinė analizė parodė, kad Danijos Žalųjų ir Švedijos žalmargių individai susigrupavo ir sudarė atskirus klasterius. Tuo tarpu, seka, priklausanti **Lietuvos žalųjų veislių grupei yra labiau giminingesnė Danijos žalųjų galvijams bei parodė ryškesnį atsiskyrimą nuo kitų tyrime naudotų veislių sekų.**



7 pav. Žalųjų galvijų Neighbor-Joining medis paremtas Kimura2-parameter modeliu, remiantis mtDNR D-kilpos sekomis. Įkėlų (bootstrap) reikšmės, pavaizduotos ant medžio šakų, gautos panaudojant 1000 pakartojimų, skalė apačioje parodo genetinį atstumą. Tyrimo metu identifikuotos sekos pažymėtos ●.

IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS

1. Ištyrus trylikos mikrosatelitinių lokusų alelių pasiskirstymą atskirose galvijų grupėse, nustatytas 251 skirtingas alelis. Mažiausias (35) skirtingų alelių skaičius buvo aptiktas grupėje turinčioje 100% Holšteinų veislės kraujo dalį, didžiausias (49) grupėje, kuri turi 71-78% Holšteinų veislės kraujo dalį. Daugiausia (26) dominuojančių alelių rasta iki 50% Holšteinų veislės kraujo dalių turinčioje grupėje, mažiausiai (13 ir 14) grupėse, sudarančiose 62-70%, 71-78%, 93,75% ir 100% Holšteinų veislės kraujo dalį..
2. Privatūs aleliai rasti 5 iš 6 grupių (grupėje su 83-90% Holšteinų veislės kraujo dalimi nebuvo rasta). Daugiausia unikalių alelių (10) buvo rasta 100% Holšteinų veislės kraujo dalį turinčioje grupėje, mažiausiai iki 50% Holšteinų kraujo dalių grupėje (4)..
3. Atlikus Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės genetinio panašumo vertinimą pagal Nei ir F_{ST} parametrus, nustatyta, kad didžiausia genetinės distancija yra tarp 100% ir virš 93,75% Holšteinų veislės kraujo dalis turinčių grupių (0,359), o genetiškai panašiausios yra 62-70% su 71-78%, iki 50% su 71-78% bei 83-90% su virš 93,75% Holšteinų kraujo grupių dalis turinčios veislės.
4. Didžiausias polimorfizmas stebimas virš 93,75 % Holšteinų veislės kraujo dalis turinčioje grupėje, o mažiausias polimorfizmas aptinkamas 100 % Holšteinų veislės kraujo dalis turinčioje grupėje. Vidutinis polimorfizmo lygis tarp grupių yra 79,49 %. DNR polimorfizmo tyrimai gali padėti nuspręsti, kuri gyvūnų populiacija turėtų būti toliau veisiama ir kuri turėtų būti naudojama tolimesniems DNR tyrimams, nustatant produktyvumą ir sveikatingumą. Ši informacija būtų naudinga tiesiogiai panaudojant tolimesnėse veislių fenotipinių savybių gerinimo programose.
5. Nustatytas labai didelis genetinis skirtumas pagal fiksacijos indeksą (F_{ST}) tarp 100% ir 93,75% Holšteinų veislės kraujo grupių turinčių veislių, t.y. Lietuvos Juodmargių Holšteinų galvijų veislės galvijus galima laikyti atskira veisle, kuri aiškiai skiriasi nuo tipinių Holšteinų galvijų veislės.
6. Atlikus Lietuvos juodmargių pieninių galvijų mtDNR sekų ir sekų iš "Genų banko" duomenų bazės filogenetinę analizę, nustatytas aiškų Holšteinų atsiskyrimas nuo Lietuvos juodmargių veislių.
7. Atlikus Lietuvos žaliųjų galvijų mikrosatelitinių lokusų analizę iš viso buvo nustatyti 77 skirtingi dominuojantys aleliai: daugiausia dominuojančių alelių rasta Danijos žalmargių (14) veislėse, mažiausiai (10) Lietuvos žalmargių ir seno genotipo Lietuvos žaliųjų veislėse.

8. Filogenetinė analizė parodė, kad Danijos Žalųjų ir Švedijos žalmargių individai susigrupavo ir sudarė atskirus klasterius, o Lietuvos žalųjų veislės galvijai yra labiau giminingesni Danijos žalųjų galvijams bei parodė ryškesnį atsiskyrimą nuo kitų tyrime naudotų veislių sekų.

Publikacijos

Iš gautų tyrimų rezultatų vienas staipsnis parengtas įteikti spaudai, kitas rengiamas:

1. A. Paulauskas, L. Griciuvienė, A. Aleksandravičienė, R. Lapickas, J. Radzijeuskaja. The genetic variability of the Holstein blood parts having Lithuanian black-and-white cattle breed. *Animal Genetics **arba** Animals* (parengtas rankraštis) IF: 1,832
2. A. Paulauskas, L. Griciuvienė, A. Aleksandravičienė, R. Lapickas, J. Radzijeuskaja. The genetic variability of the Lithuanian Red cattle breed.(rengiamas)

SUDERINTA:

(Tyrimų priežiūros komisijos pirmininkas)

(Vardas, Pavardė)

(Data)