

## LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY



*Rytis Juras*

### GENETIC ANALYSIS OF LITHUANIAN NATIVE HORSE BREEDS

Summary of doctoral dissertation  
Biomedical sciences, zootechny (13B)

Kaunas, 2005

The work was carried out at the LVA Institute of Animal Science, Šiauliai University and Equine Parentage Verification and Research Laboratory at University of Kentucky in 2000-2004.

Extern defended dissertation.

The right to confer doctor's degree was granted for the Lithuanian Veterinary Academy according to the decree of the Government of the Republic of Lithuania No. 926, 15<sup>th</sup> of July, 2003.

The dissertation is written in English.

#### **Consultant:**

Prof. habil. dr. Ramutis Klimas (Šiauliai University, biomedical sciences, zootechny - 13B).

#### **Chairman of Zootechny science council:**

Prof. habil. dr. Česlovas Jukna (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny - 13B).

#### **Members:**

Prof. habil. dr. Vytautas Tarvydas (LVA Institute of Animal Science, biomedical sciences, zootechny - 13B);

Prof. at Incumbent, dr. Antanas Sederevičius (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine - 12B);

Assoc. prof. dr. Vida Juozaitienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny - 13B);

Dr. Jonas Kutra (LVA Institute of Animal Science, biomedical sciences, zootechny - 13B).

#### **Opponents:**

Assoc. prof. dr. Ilona Miceikienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny - 13B);

prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (VU Ecology Institute, biomedical sciences, biology - 01B).

Public defense of doctoral dissertation in Zootechny science council will take place at the Lithuanian Veterinary Academy I auditorium 2 pm LT on 24<sup>th</sup> March of 2005.

Address: Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

The abstract of doctoral dissertation has been send on 24<sup>th</sup> of February 2005 according to confirmed address list.

This dissertation is available at the libraries of the Lithuanian Veterinary Academy and LVA Institute of Animal Science.

## LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA

*Rytis Juras*

### LIETUVOS VIETINIŲ VEISLIŲ ARKLIŲ GENETINĖ ANALIZĖ

Daktaro disertacijos santrauka  
Biomedicinos mokslai, zootechnika (13B)

Kaunas, 2005

Darbas atliktas 2000-2004 metais LVA Gyvulininkystės institute, Šiaulių universitete ir Kentukio universiteto Arklių kilmės patikrinimo ir tyrimų laboratorijoje.

Disertacija ginama eksternu.

Doktorantūros teisė Lietuvos veterinarijos akademijai suteikta 2003 m. liepos mėn. 15 d. Lietuvos Respublikos Vyriausybės nutarimu Nr. 926.

Disertacija parašyta anglų kalba.

#### **Konsultantas:**

prof. habil. dr. Ramutis Klimas (Šiaulių universitetas, biomedicinos mokslai, zootechnika - 13B).

#### **Zootechnikos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:**

##### **Pirmininkas:**

prof. habil. dr. Česlovas Jukna (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika - 13B).

##### **Nariai:**

prof. habil. dr. Vytautas Tarvydas (LVA Gyvulininkystės institutas, biomedicinos mokslai, zootechnika - 13B);

e. prof. p. dr. Antanas Sederevičius (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina - 12B);

doc. dr. Vida Juozaitienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika - 13B);

dr. Jonas Kutra (LVA Gyvulininkystės institutas, biomedicinos mokslai, zootechnika - 13B).

##### **Oponentai:**

doc. dr. Ilona Miceikienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika - 13B);

prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (VU Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija - 01B).

Disertacija bus ginama viešame Zootechnikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2005 m. kovo 24 d. 14 val. Lietuvos veterinarijos akademijos I auditorijoje.

Adresas: Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2005 m. vasario 24 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą. Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos veterinarijos akademijos ir LVA Gyvulininkystės instituto bibliotekose.

## IVADAS

Pastaraisiais metais daug dėmesio skiriama gyvūnijos įvairovės išsaugojimui. Ilgą laiką buvo orientuojamasi į laukinių gyvūnų išsaugojimą ir tik neseniai naminiai gyvūnai pripažinti kaip svarbi bioįvairovės dalis. Arkliai prijaukinti palyginti vėlai - prieš 5000-6000 metų. Pasaulio domestikuotų arklių populiaciją sudaro 62 milijonai arklių, susidedančių iš 500 veislių, tipų ir rūšių (FAOSTAT, 1998). Vietinėmis veislėmis daugelis autorių vadina primityvias arba pagerintas veisles, paplitusias tam tikroje vietovėje, prisitaikiusias prie tėvynės sąlygų. Tokioms veislėms formuoti didžiausią reikšmę turėjo natūrali atranka, kuri palieka ištvermingiausius, tvirčiausius, nereikliausius gyvulius. Lietuvos vietinių veislių arkliais vadinami žemaitukai, stambieji žemaitukai ir Lietuvos sunkieji arkliai.

Žemaitukai – labai sena vietinė Lietuvos arklių veislė, lydėjusi lietuvius nuo seniausių laikų. Daugelį šimtmečių lietuviai garbino ir puoselėjo savo žemaitukus. Net kryžiuočių apgulties metais išsaugojo juos nuo mišrinimo su kitomis veislėmis. Tik antroje XIX a. pusėje, įsigalint sunkesniems žemės ūkio padargams ir prireikus didesnės traukiamosios jėgos, žemaitukus pradėjo išstumti kitų veislių arkliai. 1994 m. Lietuvoje buvo likę tik 30 suaugusių žemaitukų arklių. Lietuvos veterinarijos akademijos Gyvulininkystės institute 1994m. pradėtas veislės išsaugojimo darbas – veislinių bandų formavimas, ūkinių biologinių sąvybių tyrimas, veislės monitoringas. 2004 m. pradžioje žemaitukų veislės arklių populiacijoje buvo 22 eržilai, 67 kumelės ir 57 kumeliukai.

Stambiųjų žemaitukų arklių kūrimas prasidėjo XIX a. pabaigoje, atsiradus didesnio arklio poreikiui, kai žmonių nebetenkino smulkus žemaitukų veislės arklys. Pietryčių Lietuvoje žemaitukai pradėti mišrinti su Orlovo ristūnais ir šiaurės švedų veislių arkliais. Taip mišrinant, o vėliau veisiant tarpusavyje, buvo išvestas stambesnis ir daug tvirtesnis vietinis arklys, kuris nuo 1941 metų kartu su senojo tipo žemaitukais vadinamas vietiniu arkliu. Šiuo metu Lietuvoje yra penkios stambiųjų žemaitukų veislinės bandos, laikomi 127 arkliai.

Lietuvos sunkiųjų arklių veislė yra palyginti jauna, bet pagal savo biologines ir ūkines savybes buvo pripažinta viena iš perspektyviausių sunkiųjų veislių. Ši veislė buvo pradėta kurti XIX a. pabaigoje, vyravusių žemaitukų veislės kumelės mišrinant su ardėnų, brabansonų, peršeronų

ir kitų sunkiųjų veislės eržilais. Jau pačioje Lietuvos sunkiųjų veislės arklių išvedimo pradžioje, be grynaveislių reproduktorių, veislininkystės darbui buvo naudojami ir gerai išsivystę, pageidaujamo tipo eržilai mišrūnai. Nuo 1940 m. Lietuvos sunkieji arkliai buvo formuojami taikant tiksliai mišrūnų veisimo tarpusavyje metodą. Kuriamojo mišrinimo, sąmoningos atrankos ir parinkimo, intensyvaus arklių panaudojimo darbui sąlygomis buvo suformuoti Lietuvos sunkieji arkliai, kurie 1963 m. patvirtinti savarankiška veisle, turinčia 12 linijų. Mažėjant darbui naudojamų arklių skaičiui ir vis plačiau žirgus naudojant sportui ir laisvalaikiui, iškilo pavojus išnykti sunkiųjų veislės arkliams. Šiuo metu Lietuvos sunkiųjų veislės arklių populiacijoje yra 455 arkliai.

Daugelis tarpopuliacinių kontaktų, kurie vyko prieš arklių kilmės knygų sudarymą ar arklių veislių sukūrimo pradinuose etapuose lėmė genų mainus tarp kontaktuojančių populiacijų. Vietinių populiacijų genetinis bendrumas dažniausiai atitinka jų geografinį artumą (atstumą ir geografinius barjerus tarp jų) ir istorinius įvykius (populiacijų kontaktus). Metodai ir duomenys, kuriais remiamasi atliekant populiacijų genetinius tyrimus yra gana skirtingi. Iki praeito dešimtmečio dažniausiai buvo analizuojami pagal Mendelio dėsnius paveldimi baltymų polimorfizmai (kraujo grupės, serumo baltymai bei fermentai). Nuo praeito dešimtmečio pradėti tyrinėti įvairūs DNR polimorfizmai, dažniausiai panaudojant mikrosatelitinės DNR žymeklius bei mitochondrinės DNR tyrimus.

Lietuvos arklių vietinės veislės išsamiai pagal genetinius žymeklius mažai tyrinėtos, todėl norint ištirti šių veislių unikalumą, įvertinti jų genetinę įvairovę bei palyginti su kitomis domestikuotomis arklių veislėmis, pradėti arklių kraujo grupių, kraujo serumo baltymų ir fermentų polimorfizmo bei DNR mikrosatelitinių lokusų tyrimai. Pirmuosius arklių imunogenetinius tyrimus pagal kraujo grupes Lietuvoje atliko B. Kriščiūnas 1990 metais. Lietuvos vietinių veislių arklių genetinis charakterizavimas ypatingai svarbus ateities veislininkystės tikslams, genetinių išteklių išsaugojimui. Visų veislių arkliams yra svarbu žinoti tikslią kilmę, norint sudaryti tinkamus veisimo planus, atliekant selekciją ir sekant inbrydingo laipsnį.

### Darbo tikslas ir uždaviniai:

Darbo tikslas – atlikti Lietuvos vietinių veislių arklių monitoringą, panaudojant kraujo grupių, kraujo serumo baltymų bei fermentų ir

mikrosatelitinių DNR žymeklių polimorfizmo tyrimus. Siekiant šio tikslo, buvo iškelti sekantys uždaviniai:

- ištirti žemaitukų, stambiųjų žemaitukų ir Lietuvos sunkiųjų veislės arklių genetinę įvairovę;
- palyginti Lietuvos vietinių veislių arklius su kitomis domestikuočių arklių populiacijomis;

#### **Darbo mokslinis naujumas ir originalumas:**

- pirmą kartą šalyje panaudota daug genetinių žymeklių, įvairių koncentracijų gelių Lietuvos vietinių veislių arklių tyrimams;
- pirmą kartą Lietuvoje panaudoti DNR žymekliai Lietuvos vietinių veislių arklių genetinei įvairovei įvertinti;
- nustatyta mitochondrinės DNR įvairovė Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijose;
- pagal gautus tyrimų duomenis apskaičiuotas genetinis panašumas ir genetinė distancija tarp veislių.

#### **Praktinė šio darbo reikšmė:**

- įvertintas mikrosatelitinių žymeklių tinkamumas kilmės patikslinimui Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijose;
- atlikta Lietuvos vietinių veislių arklių stebėseną pagal genetinius žymeklius;
- mitochondrinės ir branduolinės DNR tyrimo rezultatai gali būti panaudoti Lietuvos vietinių veislių arklių genetiniams ištekliams išsaugoti ir veislių stebėsenos programai įgyvendinti.

#### **Darbo struktūra ir apimtis**

Disertacija parašyta anglų kalba, jos struktūrą sudaro: įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų medžiaga ir metodai, tyrimų rezultatai, apibendrinimas, išvados, pasiūlymai, santrauka lietuvių kalba, paskelbtų publikacijų sąrašas ir literatūros sąrašas, kuriame yra 206 šaltiniai. Disertacijoje pateikta 17 lentelių ir 9 paveikslai. Darbo apimtis – 108 puslapiai.

#### **TYRIMŲ METODAI IR MEDŽIAGOS**

Darbas atliktas 2000–2004 m. pagal Lietuvos veterinarijos akademijos Gyvulininkystės instituto mokslinių tyrimų metodinės komisijos patvirtintą metodiką. Tyrimai vykdyti Lietuvos veterinarijos akademijos Gyvulininkystės instituto gyvūnų kilmės patikrinimo laboratorijoje, Šiaulių universiteto biologinių tyrimų moksliniame centre bei Kentukio universiteto Arklių kilmės patikrinimo ir tyrimų laboratorijoje JAV.

Bandinių paėmimo metu Lietuvoje buvo apie 100 žemaitukų veislės arklių. Tyrimams buvo atrinkta proporcingai pagal esamas šeimas ir linijas 30 minėtos veislės arklių: 8 eržilai ir 22 kumelės. Iš Erelio linijos - 15 arklių, Astūro - 12, naujai kuriamos Saturno linijos - 3. Pagal šeimas buvo atrinkta: Arabės šeimos - 3, Žibutės - 4, Kaštankės - 8, Mirtos - 3, Tulpės - 4 kumelės. Iš stambiųjų žemaitukų buvo atrinkta 16 kumelių ir 14 eržių: Kalmano linijos - 8, Šachtioro - 10, Agrasto - 9, Klinto - 3 arkliai. Arkliai atrinkti iš SPUAB “Vilniaus žirgynas” ir SPUAB “Sartų žirgynas” veislynų bei Lietuvos gyvulininkystės instituto ir Šeduvos aukštesniosios žemės ūkio mokyklos veislinių bandų ir pavienių augintojų. Buvo paimti dvidešimt keturi kraujo mėginiai iš Lietuvos sunkiųjų veislės arklių, priklausančių skirtingoms linijoms ir šeimoms, mikrosatelitinių DNR lokusų polimorfizmo analizei.

**Standartinės imunologinės procedūros**, t.y. hemolizės ir agliutinacijos reakcijos buvo naudojamos nustatant eritrocitų antigeninius veiksnius pagal septynias tarptautiniu mastu pripažintas kraujo grupių genetines sistemas: EAA, EAC, EAD, EAK, EAQ, EAP ir EAU. Iš viso naudoti 26 monospecifiniai antiserumai reagentai, pagaminti Kentukio universiteto Arklių kilmės patikrinimo ir tyrimo laboratorijoje. Agliutinacijos reakcijoms naudotas triušių kraujo serumo komplimentas. Šarminio poliakrilamidinio gelio elektroforezė naudota *TF*, *GC*, *ES*, *AL* ir *Xk* lokusų tyrimams. Rūgštinio poliakrilamidinio gelio elektroforezė naudota proteazės inhibitorių (*PI*) ir serumo karboksilesterazės (*ES*) sistemoms tirti. Krakmolo gelio elektroforezės ir izoelektrinio fokusavimo krakmolo gelyje metodu nustatytas *PGD*, *PGM*, *GPI* ir *HB* sistemų polimorfiskumas. Visos reakcijos vertintos pagal standartines metodikas, naudota tarptautiniu mastu pripažinta terminologija.

**Mikrosatelitinių DNR lokusų tyrimai.** Jiems naudoti 24 mikrosatelitiniai žymekliai: *ASB23*, *AHT4*, *AHT5*, *HTG4*, *ASB17*,

VHL20, HMS7, HMS6, LEX3, HMS3, ASB2, HTG10, LEX33, HTG6, HTG7, UCDEQ487, HTG3, EB2E8, HMS5, HMS15, HMS2, UCDEQ487, AHT2 ir UCDEQ425. Polimerazės grandininė reakcija (PGR) atlikta įtraukus mikrosatelitinius žymeklius į reakcijos rinkinius, atsižvelgus į pradmenų dydį, pradmenų sulydymo temperatūrą ir fluorescencinę žymę. Amplifikacijos reakcijos atliktos 19 μl tūrio inde, naudojant 5 μl pradmenų, 2,3 μl tiriamosios DNR (25-50ng) ir 11,7 μl PGR reakcijos mišinio. PGR reakcijos mišinio sudėtinės dalys: 10×PGR buferis, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP (10 mM), DMSO ir Taq polimerazės. Amplifikacijos reakcijos mišinys buvo padengtas 15 μl PGR reakcijos aliejumi. Tiriamoji DNR ir pradmenys denatūruoti 95°C 5 minutes ir, esant 85°C (antra stadija), įdėtas reakcijos mišinys. Reakcijos atliktos naudojant 30 ciklų 1 min. 95°C denatūracijos, sekant 30 sek. 56°C grandžių sulydymo ir 45 sek. 72°C naujų grandžių sintezės stadijas, ciklai užbaigti 30 min. 72°C stadija ir reakcijos užbaigtos atšaldant mėginius iki 4°C.

Reakcijoms pasibaigus, dydžio standartas ir genominė DNR tirti tame pačiame šulinėlyje. Dydžio standartas (Rox 350) - tai fluorescencsine žyme žymėtas žinomo dydžio DNR fragmentas, skirtas ABI PRISM DNR sekvenatoriuje tiriamo nežinomo dydžio DNR fragmentui nustatyti. Kompiuterine programa automatiškai apskaičiuotas tiriamos DNR fragmento dydis, kalibruojant kreives, gautas migruojant žinomo dydžio standarto ir tiriamos DNR fragmentams. Prieš uždedant DNR mėginius ant akrilamidinio gelio, jie 3 minutes denatūruoti 95°C temperatūroje, atšaldyti iki 4°C laipsnių ir 2 μl šios reakcijos mišinio įnešta į individualius 6% akrilamidinio gelio šulinėlius. Tiriamosios DNR mikrosatelitinių lokusų alelių dydžiai nustatyti automatiškai sekvenatoriumi ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), kuriuo atliekama fluorescenciniais dažais žymėtų DNR molekulių fragmentų elektroforezė, jų detekcija lazeriu ir kompiuterinė analizė. Programos režimas: 1,1 kV, 1,7 valandos esant 51°C temperatūrai, naudojant filtrą D. Mikrosatelitinių alelių fragmentų dydžiai nustatyti kompiuterine programa STRand. Nustatytiems mikrosatelitinių lokusų alelių dydžiams naudota tarptautinės genetikų draugijos nustatyta raidinė nomenklatura.

**Mitochondrinės DNR tyrimai.** Jiems naudoti penki žemaitukų veislės arklių mėginiai: Kaštankės šeimos - Kanarėlė ŽRg40, Arabės - Austėja ŽRg59, Žibutės - Žemyna ŽRg172, Mirtos - Asvėja ŽRg173 ir Tulpės - Tola ŽRg217. Tyrimams paimta po tris (atsitiktiniai) stambiųjų

žemaitukų, Lietuvos sunkiųjų veislės arklių, hanoverio, holšteino, Suomijos arklių, trakėnų, gotlando, vielkopolski, Lenkijos sunkiųjų, posavinos, huculų ir lenkų primitivios veislės arklių mėginiai. Veislės šiam tyrimui buvo pasirinktos dėl keleto priežasčių: geografinės padėties, anksčiau nebuvo tyrinėtos (nėra genų banke) ir mums prieinamų mėginių. Pradmenys sukurti naudojantis publikuota mtDNR seka:

F: 5'-CGCACATTACCCTGGTCTTG-3',

R: 5'-GAACCAGATGCCAGGTATAG-3'.

Mitochondrinės DNR amplifikacijos reakcija atlikta 25 μl tūrio inde, analizei naudojant 5 μl (25-50 ng) tiriamosios DNR, dNTP (10 mM) mišinio, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 10XPGR buferio, 25 pmol/μl pradmenų ir Taq DNR polimerazės (5 aktyvumo vienetai/μl). PGR reakcija atlikta termocikleriuose, ją sudarė šie etapai - pradinė 5 minučių denatūracija 95°C su 30 ciklų denatūracijos stadija 94°C - 40 sekundžių, pradmenų prisitvirtinimo stadija 55°C - 45 sekundžių ir naujų grandžių sintezės stadija 72°C - 45 sekundžių ir vėliau galutinė naujų grandžių sintezės stadija 72°C - 10 minučių.

**PGR produkto analizė.** Pasibaigus PGR, 10 μl reakcijos mišinio ir 2 μl nešamojo dažo frakcionuota agarozės gelyje. Elektroforezė vyko 1-2 valandas, esant 100 V įtampai ir 220 mA srovės stiprumui 1,5% agarozės gelyje tris - acetatiniam buferiui. Gelis buvo dažytas etidžio bromido tirpalu, vizualizuotas ultravioletinių spindulių šviesoje, fotografuotas. PGR produktai buvo matomi kaip atskiros juostos, analizuoti su esančiu DNR masės standartu. Pirmos PGR reakcijos 10 μl produkto valyta su 4 μl ExoSAP-IT reagentu (USB, JAV), kuris pašalina nepanaudotus reakcijos komponentus. Termociklerio programa - 37°C - 15 minučių ir 80°C - 15 minučių.

**DNR sekvenavimo reakcija** atlikta naudojant sekvenavimo rinkinį BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Ji remiasi DNR grandinės terminacijos (Sanger-didezoksi) metodu su fluorescenciškai žymėtais ddNTP. Su šiuo rinkiniu sekvenuota viengrandė mitochondrinė DNR. Sekvenavimo PGR reakcija, susidedanti iš šių etapų: pradinės 5 minučių denatūracijos 98°C su 25 ciklų denatūracijos stadija, 98°C - 15 sekundžių, pradmenų prisitvirtinimo stadijos 50°C - 5 sekundžių ir naujų grandžių sintezės stadijos 60°C - 4 minučių, atlikta termocikleriuose. Temperatūrų skirtumas tarp stadijų kito 1,0°C per sekundę greičiu. Sekvenavimo reakcijos produktas valytas CentriSept spin columns (Princeton Separations, JAV), naudojantis gamintojo

rekomendacijomis. Po valymo mėginiai džiovinti 45-60 minučių vakuuminėje centrifugoje.

Sekvenavimo geliui naudotas 4,5% akrilamido tirpalo gelis. Buvo liejamas 0,2 mm gelis tarp dviejų 36 centimetrų stiklo plokščių. Gelio polimerizacija truko 1,5-2 valandas. Džiovintas sekvenavimo reakcijos mėginys rehidruotas 5 µl formamido ir 1 µl nešamojo dažo, denatūruotas 95°C 2,30 minutės ir 2 µl mėginio lašinta į sekvenavimo gelio šulinėlį.

Tiriamosios DNR seka nustatyta automatinio sekvenatoriumi ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), kuriuo atlikta fluorescenciniais dažais žymėtų DNR molekulių fragmentų elektroforezė, jų detekcija lazeriu ir kompiuterinė analizė. Programos režimas: 1,6 kV, 7 valandos, 1200 skenavimų per valandą 51°C, naudojant filtrą E. Visos sekos patvirtintos sekvenuojant iš antros atskiros PGR reakcijos. Gautos sekos palygintos su genų banke esančia mtDNR seka, numeris X79547.

**Matematiniai skaičiavimo metodai ir duomenų apdorojimas.** Alelių dažniai atskiruose kraujo grupių lokusuose buvo skaičiuoti Andersono pasiūlytu alelių pasiskirstymo metodu. Genetiniam variabilumui skaičiuoti naudotos kompiuterinės programos: Popgene (versija 1,31), Cervus (versija 2,0), Genepop (versija 3,3). Naudojantis jomis, skaičiuotas alelių dažnis, faktiškas heterozigotiškumas (Ho), Hardy-Weinbergo laukiamas heterozigotiškumas (He), nešališkas laukiamas heterozigotiškumas (Hu), efektyvių alelių skaičius (Ae), bendra variantų, rastų kiekvienoje populiacijoje, suma (Na), bendras alelių skaičius lokuse, polimorfiškumo indeksas (PIC), kilmės patikrinimo patikimumas (PE). Populiacijos inbrydingo laipsnis nustatytas Wright's pasiūlytu metodu:  $Fis = 1 - (Ho/He)$ . Lietuvos vietinių veislių arklių genetinis variabilumas pagal kraujo grupes ir baltymų polimorfizmą palygintas su 122 įvairių prijaukintų arklių veislių (arklių, testuotų Kentukio universiteto laboratorijoje, Cothran E. G. neskelti duomenys). Genetiniam giminingumui nustatyti naudotas Rodger's genetinio panašumo koeficientas (S). Riboto maksimalaus tikėtumo analizė panaudota dendrogramai sudaryti.

## TYRIMŲ REZULTATAI IR APIBENDRINIMAS

**Kraujo grupių, serumo baltymų bei fermentų polimorfizmo tyrimai.** Viena iš variabiliausių arklių biocheminių sistemų yra kraujo serumo transferinų (TF) sistema. Tirtų žemaitukų veislės arklių kraujo mėginiuose buvo nustatyti septyni transferinų fenotipiniai variantai (DD,

DF2, DR, F2R, F2F2, F2F3 ir F2H2), kontroliuojami penkių kodominantinių alelių. Transferinų lokuse dažniausiai sutinkamas fenotipas yra DF2 (0,267), dažniausia yra alelė D (0,433). Stambiųjų žemaitukų veislės populiacijos transferinų lokuse nustatytos 5 alelės. Palyginimui, tiriant kitas veisles rasta: 8 alelės achaltekinų, 7 alelės arabų ir grynakraujų jojamųjų, bei 6 alelės lipicanų arklių populiacijose. Alelė F3, esanti žemaitukų veislės populiacijoje, nebuvo nustatyta stambiųjų žemaitukų arklių populiacijoje, tuo tarpu stambiųjų žemaitukų populiacijoje dažna alelė O (0,100) nebuvo rasta žemaitukų populiacijoje. Stambiųjų žemaitukų populiacijoje dažniausiai sutinkama alelė F2 (0,500), kaip ir achaltekinų (0,470), apalūzos (0,428), morgano (0,534) ir fryzų (0,858) arklių populiacijose. Daugelyje arklių veislių (hanoverio, lipicanų, lusitanų ir kt.) glikoproteinų (A1B) sistemoje randamos 3 alelės F, K ir S, tačiau visi tirti žemaitukų veislės arkliai buvo homozigotai, rastas vienos kodominantinės alelės K kontroliuojamas fenotipas KK. Stambiųjų žemaitukų arklių populiacijoje šioje sistemoje rastos S alelės dažnis – 0,050. Serumo karboksilesterazės sistema yra viena iš sunkiausiai tiriamų arklių biocheminių lokusų sistemų, kadangi ES - F ir ES - G alelės yra elektroforeziškai neatskiriamos šarminiame gelyje, tuo tarpu ES - I ir ES - S alelės migruoja tokiu pat greičiu rūgštiniame gelyje. Panaudojus rūgštinio, šarminio poliakrilamidinio ir krakmolo gelio elektroforezę žemaitukų populiacijos esterazės (ES) lokuse pavyko nustatyti septynis fenotipinius variantus, kontroliuojamus keturių kodominantinių alelių. Viena alelė, kurią pavadino T alele, žemaitukų veislės arklių populiacijoje sutinkama gana dažnai (dažnis 0,267), kitų naminių arklių veislių esterazės lokuse T alelė buvo nustatyta tik keleto veislių arklių kraujo mėginiuose iš šimtų tūkstančių tirtų ir alelės dažnis labai mažas. Ši alelė taip pat nenustatyta stambiųjų žemaitukų veislės populiacijoje. Keturi fenotipiniai variantai GG, GI, HI ir II nustatyti stambiųjų žemaitukų populiacijoje, kontroliuojami trijų kodominantinių alelių G, H ir I. Alelė H, sutinkama 0,017 dažniu, žemaitukų veislės arklių mėginiuose nebuvo nustatyta, tuo tarpu tokiu pat dažniu sutinkama alelė L nebuvo rasta stambiųjų žemaitukų populiacijoje. Abiejų Lietuvos veislių populiacijų arklių serumo albuminų lokuse dažniausia alelė A, tuo tarpu B alelė dažnesnė fryzų, gotlando ir hanoverio arklių populiacijose. Lietuvos vietinių veislių GC, PGD ir PGM sistemose rastos vienodos alelės ir panašūs alelių dažniai. Žemaitukų veislės arklių populiacijoje nustatytos

dvi alelės F ir I, tuo tarpu sunkiųjų žemaitukų populiacijoje rasta alelė S (0,033). Izoelektrinio fokusavimo metodu nustatytos 4 alelės ir šeši fenotipiniai variantai (A1B1, A1B2, A2B2, B1B1, B1B2 ir B2B2) stambiųjų žemaitukų, 2 alelės ir trys fenotipai (B1B1, B1B2 ir B2B2) žemaitukų  $\alpha$  hemoglobino sistemoje (HBA). Kaip ir žemaitukų veislės arklių populiacijoje, taip ir morgano, Holšteino ir kitų arklių veislėse nebuvo nustatytos alelės A ir A1. Variabiliausioje arklių proteazės inhibitorių sistemoje žemaitukų veislėje nustatytos devynios, o stambiųjų žemaitukų - 10 skirtingų alelių. Šioje sistemoje 15 alelių rasta morgano veislės arklių populiacijoje, 9 alelės arabų, 10 hanoverio ir grynakraujų jojamųjų arklių populiacijose. Kraujo grupių EAA sistemoje rastos 5 alelės abiejose Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijose. Vienodas alelių skaičius rastas ir grynakraujų jojamųjų, holšteino ir lipicanų arklių populiacijose. Abiejų Lietuvos veislių alelių dažniai EAC sistemoje buvo panašūs. Arklių kraujo grupių sistema EAD yra informatyviausia sprendžiant kilmės patikrinimo klausimus. Ši sistema buvo polimorfiškiausia iš visų kraujo grupių sistemų, joje rastos 5 alelės žemaitukų, 8 alelės stambiųjų žemaitukų, 12 morgano veislės arklių, 9 apalūzų ir tik 3 alelės sorajos veislės arklių populiacijose. Nors žemaitukai ir stambieji žemaitukai yra artimai giminingi, tačiau nustatyti alelių dažnių skirtumai visose tirtose sistemose. Pagal įvairias metodikas ir tyrimų techniką nustatyta, kad retos ar naujos alelės gali būti rastos retose arklių veislėse.

Tiriant arklių kraujo grupių, kraujo serumo ir eritrocitų baltymų bei fermentų polimorfiškumą pagal įvairias metodikas, nustatyti Lietuvos vietinių ir kitų prijaukintų arklių veislių genetinės įvairovės įverčiai pateikti 1 lentelėje.

Dauguma arklių veislių susiformavo ar buvo sukurtos prieš 100-200 metų, pradėjus vesti kilmės knygas. Genetiniai skirtumai tarp veislių dažniausiai yra tik alelių dažnių skirtumai, atsiradę dėl selekcijos, skirtingų veisimo schemų, genų dreifo, skirtumų veislės istorijoje, bet nebūtinai ankstyvoje veislės kilmėje. Tradiciškai grynakraujėmis vadinamų arabų, grynakraujų jojamųjų ir lipicanų veislių arkliai ilgą laiką buvo veisiami uždaroje populiacijoje, todėl yra linkę turėti mažesnę genetinę variabilumą. Lietuvos vietinių veislių arkliai pasižymėjo didele genetinė įvairove. Panašūs rezultatai gauti tiriant Kroatijos, Brazilijos, Čilės ir kitų vietinių veislių arklių populiacijas. Kodėl šių veislių arklių genetinė įvairovė nėra sumažėjusi, lieka neaišku. Tikriausiai neseniai

įvykęs staigus populiacijų dydžių sumažėjimas, sąlygotas drastiško arklių skaičiaus sumažėjimo, nespėjo pasireikšti kaip genetinės įvairovės sumažėjimas.

**1 lentelė.** Lietuvos vietinių ir kitų pasirinktų šalių prijaukintų arklių veislių kraujo grupių ir biocheminių lokusų genetinės įvairovės palyginimas

**Table 1.** Estimates of genetic variability at biochemical and blood group loci for Lithuanian and selected other country domestic horse breeds

| Veislė<br>Breed                                 | N   | Ho    | He    | Hu    | Fis    | He ttl | Na    | Ae    |
|-------------------------------------------------|-----|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Zemaitukai                                      | 30  | 0,430 | 0,377 | 0,384 | -0,155 | 0,417  | 54    | 2,159 |
| Zemaitukai heavy<br>type                        | 30  | 0,440 | 0,416 | 0,423 | -0,057 | 0,432  | 60    | 2,201 |
| Sorraia                                         | 59  | 0,368 | 0,343 | 0,346 | -0,071 | 0,358  | 41    | 2,054 |
| Thoroughbred                                    | 265 | 0,294 | 0,288 | 0,289 | -0,019 | 0,325  | 64    | 2,009 |
| Arabian                                         | 117 | 0,307 | 0,327 | 0,328 | 0,061  | 0,376  | 67    | 2,132 |
| Standardbred Pacer                              | 341 | 0,401 | 0,395 | 0,395 | -0,016 | 0,414  | 85    | 2,142 |
| Skyros pony                                     | 79  | 0,434 | 0,418 | 0,420 | -0,046 | 0,424  | 68    | 2,435 |
| Polish primitive<br>Horse                       | 207 | 0,413 | 0,405 | 0,406 | -0,021 | 0,445  | 68    | 2,544 |
| Appaloosa                                       | 99  | 0,376 | 0,382 | 0,383 | 0,015  | 0,439  | 83    | 2,485 |
| Friesian                                        | 314 | 0,307 | 0,306 | 0,307 | -0,003 | 0,348  | 54    | 1,901 |
| Lipizzaner                                      | 98  | 0,335 | 0,324 | 0,325 | -0,034 | 0,366  | 69    | 2,396 |
| Haflinger                                       | 161 | 0,405 | 0,412 | 0,413 | 0,016  | 0,458  | 69    | 2,704 |
| Quarter Horse                                   | 168 | 0,396 | 0,393 | 0,394 | -0,007 | 0,440  | 87    | 2,653 |
| Peruvian Paso                                   | 141 | 0,451 | 0,445 | 0,446 | -0,014 | 0,469  | 77    | 2,761 |
| Suffolk Punch                                   | 122 | 0,438 | 0,432 | 0,434 | -0,013 | 0,465  | 65    | 2,459 |
| Yakut Horse                                     | 30  | 0,323 | 0,294 | 0,299 | -0,098 | 0,315  | 43    | 1,875 |
| Clydesdale                                      | 41  | 0,334 | 0,322 | 0,326 | -0,039 | 0,347  | 54    | 2,121 |
| Posavina                                        | 98  | 0,418 | 0,427 | 0,429 | 0,020  | 0,467  | 76    | 2,838 |
| Vidurkis<br>Mean                                | 122 | 0,371 | 0,365 | 0,371 | -0,015 | 0,413  | 65,11 | 2,390 |
| Standartinis<br>nuokrypis<br>Standard deviation |     | 0,048 | 0,043 | 0,043 | 0,065  | 0,039  | 11,04 | 0,250 |

Genetinės įvairovės tyrimai dažnai apima daug populiacijų ar veislių ir daug lokusų. Keletas genetinio panašumo nustatymo metodų

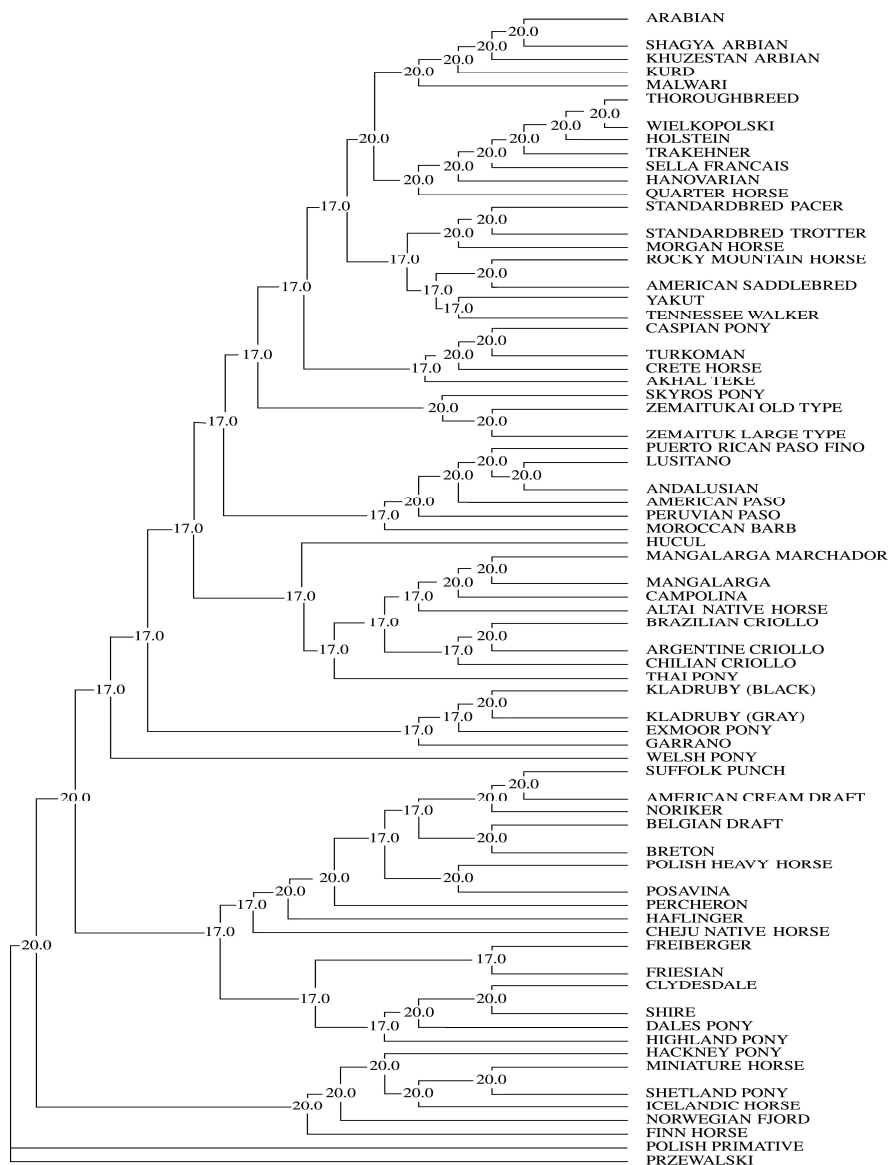
pasiūlyta genetinės įvairovės pasiskirstymui tarp grupių nustati. Šie tyrimai padeda konsoliduoti duomenis į paprastesnes proporcijas ir lengviau nustatyti bendrą giminingumą tarp grupių. Žinoma, dalis informacijos yra prarandama, sutrumpinus visą genetinės variacijos informaciją į vieną skaičių. Žemaitukų ir stambių žemaitukų genetiniam panašumui su kitomis arklių veislėmis nustatyti naudotas Rodger's pasiūlytas genetinio panašumo koeficientas (S). Kuo didesnis genetinio panašumo koeficientas S, tuo mažiau genetiškai skiriasi lyginamų grupių arkliai. Žemaitukų veislės arkliai genetiškai panašiausi su stambiojo tipo žemaitukais: genetinio panašumo koeficientas 0,858. Tai yra lauktas rezultatas, patvirtinantis, kad šios dvi veislės atsiskyrė neseniai ir yra genetiškai artimos. Antras rezultatas - tarp žemaitukų ir Šiaurės Amerikos lenktyninių morgano veislės arklių: genetinio panašumo koeficiento dydis 0,830. Mažai tikėtina, kad žemaitukų ir morgano veislės turi bendrus protėvius. Morgano arklių veislę sukurta praėjusio šimtmečio pradžioje, ji turi arabų, standartinės veislės ir kinkomųjų arklių kraujo. Morgano veislės arkliai pasižymi didele genetinė įvairove ir tai gali būti viena iš priežasčių, kodėl jie yra genetiškai panašūs į žemaitukus. Daugumos arklių veislių genetinio panašumo koeficientas buvo aukštesnis su stambių žemaitukų veislės arkliais. Stambieji žemaitukai genetiškai artimiausi yabou veislės arkliams. Yabou yra vietiniai Turkmenijos arkliai (Turkoman). Artimas giminingumas tarp šių veislių nėra tikėtinas, greičiau sąlygotas mažo skaitlingumo arklių, iš kurių buvo paimti mėginiai.

Iš kraujo grupių, kraujo serumo ir eritrocitų baltymų bei fermentų genų dažnio duomenų, remiantis riboto maksimalaus tikėtinumo analize, sudaryta dendrograma, parodanti genetinį panašumą tarp arklių veislių (1 pav.).

Žemaitukai ir stambieji žemaitukai šioje dendrogramoje sugrupuoti su Skyros ponių veislės arkliais iš Graikijos, tarp arabų ir Iberijos tipo veislės arklių klasterių. Skyros poniai yra unikali, vietinė arklių veislė, egzistuojanti Graikijoje esančiose Skyros salose. Šie arkliai gyveno šiose salose daugelį amžių pusiau laukiniai ir tiksli jų kilmė nėra žinoma. Artimas giminingumas tarp Skyros ir Lietuvos vietinių veislių arklių yra mažai tikėtinas. Arabų tipo veislės arklių klasteryje sugrupuotos veislės, kurioms arabų veislės arkliai turėjo įtakos ankstyvosiose veislių formavimosi stadijose, išskyrus Jakutijos arklius. Jakutijos arkliai - šiaurinės ir centrinės Sibiro dalies vietiniai arkliai, prisitaikę prie sunkių

Sibiro sąlygų, pasižymi maža genetinė įvairove, tai tikriausiai ir sąlygojo jų atsiradimą arabų veislės arklių klasteryje. Iberijos arklių klasteryje Pietų Amerikos arkliai sugrupuoti su Portugalijos arklių veislėmis andalūzais ir lusitanais, tai patvirtina šių veislių istoriją ir žinomus genetinius ryšius. Mažai tikėtina, kad Lietuvos vietinių veislių arkliai turi bendrus protėvius su Iberijos ir arabų veislės arkliais. Kitos geografiškai artimos (Suomijos, Lenkijos) vietinės arklių veislės nerodo artimo giminingumo su Lietuvos vietinėmis veislėmis.

**Polimorfinių mikrosatelitinių DNR lokusų analizė.** Genetinės įvairovės tyrimams, dėl pakankamai nesudėtingų tyrimo metodų, vieni iš populiariausių šiuo metu yra genetiniai žymekliai-mikrosatelitai. Lietuvos vietinių veislių arklių 24 tirtuose mikrosatelitiniuose lokusuose iš viso rasta 181 skirtinga alelė. Visi mikrosatelitiniai lokusai buvo polimorfiški, o aptiktų skirtingų alelių skaičius svyravo nuo 12 (ASB17 lokuse) iki 4 (HMS5 ir HTG7 lokusuose), o vidutinis alelių skaičius lokuse buvo 7,54. Vienas iš polimorfiškiausių Lietuvos vietinių arklių veislių mikrosatelitinių lokusų buvo ASB17 lokusas. Tirtose 52 populiacijose iš viso rasta 17 skirtingų alelių. Visose populiacijose dažniausios alelės buvo R (0,229) ir N (0,212). Dažniausia alelė šiame lokuse žemaitukų veislėje buvo J, N – stambių žemaitukų ir P – Lietuvos sunkiųjų veislės arklių populiacijoje. Mikrosatelitiniame VHL20 lokuse M alelė dažniausiai sutinkama žemaitukų, lipicanų ir standartinės veislės arklių populiacijose. Devynios skirtingo dydžio alelės rastos ištyrus Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijas, šešios - žemaitukų ir aštuonios stambių žemaitukų ir Lietuvos sunkiųjų arklių veislėse, tuo tarpu 11 skirtingo dydžio alelių rasta visose tirtose populiacijose. HTG10 lokusas buvo vienas polimorfiškiausių, jame identifikuota 14 skirtingo dydžio alelių, tuo tarpu 9 iš jų rastos Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijose. Žemaitukų veislės arklių populiacijoje dažniausia alelė L (0,307) HTG10 lokuse, buvo retai sutinkama kitose populiacijose (0,078). Mikrosatelinis lokusas HTG4 buvo polimorfiškiausias žemaitukų veislės populiacijoje iš tirtų Lietuvos vietinių veislių arklių. Tiriant mikrosatelitinį AHT5 lokusą, nustatytos 6 alelės žemaitukų, 7 – stambių žemaitukų ir 8 – Lietuvos sunkiųjų veislės arklių populiacijose. Mikrosatelitiniame AHT4 lokuse rastos 8 alelės stambių žemaitukų veislės arklių populiacijoje, tuo tarpu žemaitukų veislės polimorfiškumas yra nedidelis - tik 5 skirtingo dydžio alelės. Mažas polimorfiškumas šiame lokuse nustatytas ištyrus grynakrau-



**1 pav.** Filogenetinė Lietuvos vietinių ir 67 pasaulio domestikuotų arklių veislių schema

**Fig. 1.** Phylogenetic tree comparing the Lithuanian horses to 67 other domestic breeds

jų jojamųjų (keturios alelės) ir sorajos (penkios alelės) arklių veisles. Mikrosatelitiniam lokuse HMS3 sutinkamų alelių skaičius varijuoja nuo 2 (sorajos veislės), iki 7 (stambiųjų žemaitukų veislės). Mikrosatelitiniam lokuse HMS7 L alelė dažniausiai sutinkama tiriant žemaitukų ir Lietuvos sunkiųjų veisles, tuo tarpu M alelė - stambiųjų žemaitukų veislę. Šiame lokuse mažiausiai polimorfinė žemaitukų veislė (trys alelės) iš visų 52 tirtų populiacijų. Devynios alelės nustatytos ASB23, LEX33, LEX3 ir ASB2 lokusuose tiriant Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijas. Polimorfiškiausia šiuose lokusuose buvo Lietuvos sunkiųjų veislės arklių populiacija.

Daugelyje pasaulio laboratorijų iki šiol arklių kilmės patikslinimas buvo atliekamas panaudojant kraujo grupių, kraujo serumo baltymų bei fermentų polimorfizmo tyrimus, tačiau pastaruoju metu daugelyje laboratorijų kilmė patikslinama panaudojant mikrosatelitinius žymeklius. Šie žymekliai kilmei patikslinti pasirinkti dėl jų polimorfiškumo. Tyrimams gali būti panaudojami įvairūs mėginiai (kraujas, audiniai, plauko folikulas, išmatos ir t.t.), pakankamai nesudėtingi tyrimo ir įvertinimo metodai. Biocheminių metodų testo patikimumas siekė 90-97%, priklausomai nuo veislės ir naudojamų sistemų skaičiaus. Naudojant įvairius mikrosatelitinių žymeklių rinkinius, tiriant skirtingas arklių veisles, nustatytas metodo patikimumas yra 99,99%. Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijose, tėvystei nustatyti panaudojant mikrosatelitinius žymeklius VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, AHT5, HMS6, ASB2, HTG10, HMS3, LEX3, LEX33, ASB17 ir ASB23, metodo patikimumas žemaitukų veislėje siekia 99,94%, o stambiųjų žemaitukų ir Lietuvos sunkiųjų arklių veislėse 99,99%. Tiesioginiam veislių palyginimui buvo naudota informacija, gauta genotipuojant 52 skirtingas arklių populiacijas dvylikoje mikrosatelitinių lokusų ((VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, AHT5, HMS6, ASB2, HTG10, HMS3, LEX33, ASB17 ir ASB23) (2 lentelė).

Žemaitukų veislės arklių faktiškas heterozigotiškumas (Ho) buvo mažesnis (0,682) nei bendras visų tirtų arklių veislių (0,699), bendras alelių skaičius ir efektyvių alelių skaičius mažesnis nei vidutinis visų tirtų populiacijų. Stambiųjų žemaitukų ir Lietuvos sunkiųjų arklių veislių Ho buvo vienas didžiausių iš visų tirtų veislių. “Butelio kaklelio testas” panaudotas efektyvaus populiacijos dydžio sumažėjimui nustatymui. Ir biocheminių lokusų, ir mikrosatelitinių lokusų tyrimas parodė neseniai įvykusį efektyvios žemaitukų veislės arklių populiacijos sumažėjimą.

Šiuo metu yra 149 žemaitukų veislės arklys ir efektyvus populiacijos skaičius yra 66,9. Teoriniu požiūriu, tai pakankamas skaičius trumpalaikiam veislės išsaugojimui. Norint išlaikyti genetinę įvairovę žemaitukų veislės populiacijoje, tikslinga sparčiai didinti efektyvios populiacijos skaičių. Genetinės įvairovės praradimas nėra fenomenalus

**2 lentelė.** Lietuvos vietinių ir kitų prijaukintų pasaulio arklių veislių mikrosatelitinių DNR lokų genetinės įvairovės palyginimas

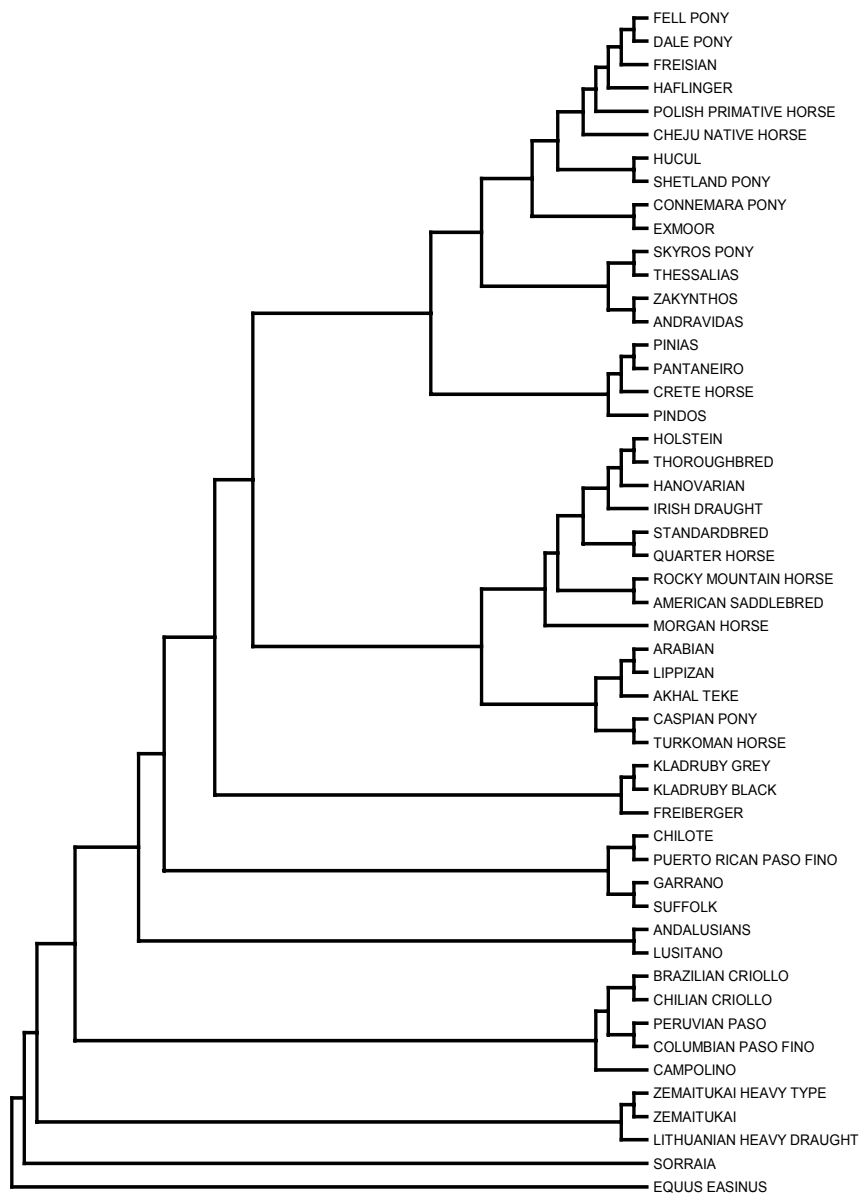
**Table 2.** Estimates of genetic variability for microsatellite DNA loci for Lithuanian and other domestic horse breeds

| Veislė<br>Breed          | N   | Ho    | He    | Hu    | Fis    | Na    | Ae    |
|--------------------------|-----|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Zemaitukai               | 31  | 0,682 | 0,641 | 0,651 | -0,048 | 60    | 3,042 |
| Zemaitukai heavy-type    | 30  | 0,758 | 0,714 | 0,726 | -0,044 | 69    | 3,771 |
| Lithuanian heavy-draught | 24  | 0,760 | 0,718 | 0,734 | -0,037 | 75    | 3,941 |
| Thoroughbred             | 175 | 0,674 | 0,693 | 0,695 | 0,027  | 75    | 3,622 |
| Arabian                  | 93  | 0,625 | 0,681 | 0,687 | 0,072  | 78    | 3,657 |
| Exmoor pony              | 98  | 0,601 | 0,606 | 0,609 | 0,014  | 63    | 2,733 |
| Andalusians              | 33  | 0,693 | 0,716 | 0,727 | 0,047  | 69    | 3,870 |
| Skyros pony              | 47  | 0,644 | 0,640 | 0,647 | -0,010 | 62    | 3,153 |
| Polish primitive Horse   | 150 | 0,674 | 0,668 | 0,673 | 0,005  | 74    | 3,597 |
| Cheju native horse       | 75  | 0,730 | 0,714 | 0,719 | -0,015 | 82    | 3,972 |
| Garrano                  | 37  | 0,746 | 0,768 | 0,779 | 0,043  | 86    | 4,613 |
| Lipizzaner               | 77  | 0,687 | 0,717 | 0,723 | 0,068  | 81    | 3,610 |
| Haflinger                | 341 | 0,630 | 0,639 | 0,641 | 0,017  | 75    | 3,264 |
| Quarter Horse            | 47  | 0,645 | 0,640 | 0,647 | 0,057  | 69    | 3,153 |
| Dales pony               | 42  | 0,715 | 0,654 | 0,662 | -0,080 | 67    | 3,241 |
| Suffolk Punch            | 122 | 0,684 | 0,713 | 0,717 | 0,043  | 79    | 3,795 |
| Hanovarian               | 28  | 0,698 | 0,751 | 0,767 | 0,089  | 79    | 4,274 |
| Sorraia                  | 60  | 0,487 | 0,502 | 0,506 | 0,040  | 46    | 2,440 |
| Irish Draught            | 47  | 0,766 | 0,764 | 0,772 | 0,008  | 85    | 4,411 |
| Vidurkis<br>Mean         | 51  | 0,699 | 0,698 | 0,711 | 0,015  | 75.39 | 3,767 |

reiškinys tarp prijaukintų gyvūnų veislių. Net didelės arklių populiacijos yra linkusios prarasti genetinę įvairovę dėl skirtingų priežasčių: veisimo planų, sumažėjusio efektyvaus populiacijos skaičiaus, dėl kurio didėja inbrydingo laipsnis. Turėtų būti atliekama Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijų išsami stebėseną, tai užtikrintų genetinės įvairovės išsaugojimą.

Filogenetinis Lietuvos vietinių veislių arklių ir kitų pasaulio prijaukintų veislių arklių medis pateiktas 2 pav. Filogenetiniame medyje, sudarytame iš mikrosatelitinių lokų genų dažnio duomenų, Lietuvos vietinių veislių arkliai buvo sugrupuoti tarpusavyje su giminingomis žemaitukų ir stambiųjų žemaitukų veislėmis. Lietuvos vietiniai arkliai filogenetiniame medyje yra tarp sorajos ir Pietų Amerikos veislės arklių, tačiau bendri protėviai su šiomis arklių veislėmis yra mažai tikėtini. Visos veislės filogenetiniame medyje sugrupuotos pagal žinomą veislės istoriją ir arklių tipą. Norint geriau suprasti Lietuvos vietinių veislių arklių kilmę, tikslinga būtų ištirti daugiau regioninių šalių arklių veislių (Skandinavų, Rusijos, Ukrainos ir Azijos).

**Mitochondrinės DNR analizė.** Dėl daugelio ypatybių mtDNR plačiai analizuojama atliekant populiacinius tyrimus. Mitochondrinės DNR tyrimams veislės pasirinktos dėl geografinio artumo. Šių veislių arklių mėginiai buvo anksčiau tirti Kentukio arklių kilmės patikrinimo ir tyrimo laboratorijoje. Pasirinktų veislių mtDNR nebuvo tyrinėta ir šių veislių sekų nebuvo genų banke. Mėginiai pasirinkti atsitiktinai, neatsižvelgus į genealogiją - kumelių šeimas, išskyrus žemaitukų veislės arklių populiaciją. Sekvenuojant trylikos arklių veislių mtDNR mitochondrinės DNR D kilpos regioną, 41 mėginyje rasti 37 haplotipai. Haplotipas buvo atskirtas, jei gauta vieno arklio mtDNR seka skiriasi bent viena baze nuo kito arklio mtDNR sekos. Tiriant tris atsitiktinai pasirinktus mėginius rasta nuo dviejų haplotipų (Suomijos, huculų, holšteino ir stambiųjų žemaitukų veislių) iki trijų haplotipų likusiose veislėse. Visos sekos lygintos su pirmąja publikuota Švedijos arklio mitochondrinės DNR seka, Lietuvos vietinių veislių arklių polimorfinės sekų vietos pateiktos 3 lentelėje. Tyrinėjant mitochondrinės DNR variabilumą tarp žinduolių nustatyta, kad žmogaus ir arklių mtDNR yra variabiliausia. Tiriant atskiras veisles, taip pat pastebėtas didelis mitochondrinės DNR variabilumas. Ištyrus lipicanų veislės 16 kumelių šeimų linijų, rasti 13 skirtingų haplotipų. Ištyrus 34 Arabų veislės arklių šeimas rasti 27 haplotipai. Žemaitukų veislės arklių penkiose kumelių



**2 pav.** Filogenetinis medis, sudarytas iš mikrosatelitinių DNR lokų tyrimo duomenų

**Fig. 2.** Phylogenetic tree constructed from microsatellite data

šeimose rasti penki skirtingi haplotipai, tai patvirtina išlikusias genealogiškai svarbias kumelių šeimas. Tiriant arklių veisles, iš viso rasti 38 nukleotidų skirtumai su pirmąja publikuota arklio mtDNR seka, tai sudarė 9% visos DNR sekos. Iš 38 nustatytų mutacijų 37 buvo tranzicijos ir tik viena delecija Lenkijos vietinės veislės arklio mtDNR sekoje. Delecija nustatyta penkių citozinų atkarpoje, esančioje 15532 mtDNR sekos vietoje. Keletas arklių veislių turėjo vienodą haplotipą (Mirtos šeima). Lenkijos sunkiųjų veislės arkliai, holšteino ir trakėnų veislės arkliai turėjo vienodą haplotipą kaip ir žemaitukų kumelės Žibutės šeimos arkliai. Žemaitukai (Kaštankės šeima) ir sunkieji žemaitukai turėjo vienodą haplotipą. Veislės, turinčios bendrą haplotipą, gali turėti bendrus protėvius, tačiau kitų autorių tyrimų duomenimis, veislės gali turėti vienodą haplotipą net būdamos labai geografiškai tolimos (pvz. lipicanai, arabai ir japonų vietinių veislių arkliai). Filogenetiniame medžiui sudaryti geografiškai artimų veislių mitochondrinės DNR sekos buvo paimtos iš genų banko, kartu panaudojant ir mūsų tirtas sekas. Sekos buvo sutrumpintos iki 353 bazių porų ilgio, siekiant išlaikyti maksimalų veislių skaičių. Filogenetinė Lietuvos vietinių ir kitų veislių schema pateikta 3 paveiksle.

Sutrumpinus sekas, veislės, kurios turėjo tokį pat haplotipą, buvo suskirstytos į grupes C1, C2, C3 ir C4. C1 grupėje buvo holšteino, trakėnų, Lietuvos sunkiųjų, arabų, sorajos ir hanoverio veislės. C2 grupėje buvo hanoverio, trakėnų, žemaitukų ir arabų veislės. Haplotipai belgų, achaltekinų, haflingerių, žemaitukų, Lenkijos sunkiųjų, garano ir norikerių veislės arklių sudarė C3 grupę. Huculai, grynakraujai jojamieji, haflingeriai, norikeriai ir Lietuvos sunkieji sudarė C4 grupę. Filogenetiniame medyje arkliai buvo sugrupuoti neatsižvelgiant į jų kilmę, tipą ar žinomą istoriją. Dažnai tame pačiame klasteryje sugrupuojami sunkieji ir poni veislės arkliai, taip pat kilę iš skirtingų geografinių zonų. Ši problema buvo pastebėta ir kitų autorių, tyrinėjusių arklių, žmonių ir galvijų populiacijas. Mitochondrinės DNR tyrimai patvirtino išlikusias žemaitukų veislės arklių kumelių šeimas. Ši informacija bus naudinga veislės genetinės įvairovės išsaugojimui.

**3 lentelė.** Žemaitukų, stambųjų žemaitukų ir Lietuvos sunkiųjų veislės arklių polimorfinės mitochondrinės DNR D-kilpos nukleotidų skirtumai su kontroline seka X79547

**Table 3.** Polymorphic sites of Žemaitukai horse breed family lines and reference (GeneBank X79547) in control region of horse mtDNA D-loop sequence

|       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 15494 | 15495 | 15496 | 15497 | 15498 | 15499 | 15500 | 15501 | 15502 | 15503 | 15504 | 15505 | 15506 | 15507 | 15508 | 15509 | 15510 | 15511 | 15512 | 15513 | 15514 | 15515 | 15516 | 15517 | 15518 | 15519 | 15520 | 15521 | 15522 | 15523 | 15524 | 15525 | 15526 | 15527 | 15528 | 15529 | 15530 | 15531 | 15532 | 15533 | 15534 | 15535 | 15536 | 15537 | 15538 | 15539 | 15540 | 15541 | 15542 | 15543 | 15544 | 15545 | 15546 | 15547 | 15548 | 15549 | 15550 | 15551 | 15552 | 15553 | 15554 | 15555 | 15556 | 15557 | 15558 | 15559 | 15560 | 15561 | 15562 | 15563 | 15564 | 15565 | 15566 | 15567 | 15568 | 15569 | 15570 | 15571 | 15572 | 15573 | 15574 | 15575 | 15576 | 15577 | 15578 | 15579 | 15580 | 15581 | 15582 | 15583 | 15584 | 15585 | 15586 | 15587 | 15588 | 15589 | 15590 | 15591 | 15592 | 15593 | 15594 | 15595 | 15596 | 15597 | 15598 | 15599 | 15600 | 15601 | 15602 | 15603 | 15604 | 15605 | 15606 | 15607 | 15608 | 15609 | 15610 | 15611 | 15612 | 15613 | 15614 | 15615 | 15616 | 15617 | 15618 | 15619 | 15620 | 15621 | 15622 | 15623 | 15624 | 15625 | 15626 | 15627 | 15628 | 15629 | 15630 | 15631 | 15632 | 15633 | 15634 | 15635 | 15636 | 15637 | 15638 | 15639 | 15640 | 15641 | 15642 | 15643 | 15644 | 15645 | 15646 | 15647 | 15648 | 15649 | 15650 | 15651 | 15652 | 15653 | 15654 | 15655 | 15656 | 15657 | 15658 | 15659 | 15660 | 15661 | 15662 | 15663 | 15664 | 15665 | 15666 | 15667 | 15668 | 15669 | 15670 | 15671 | 15672 | 15673 | 15674 | 15675 | 15676 | 15677 | 15678 | 15679 | 15680 | 15681 | 15682 | 15683 | 15684 | 15685 | 15686 | 15687 | 15688 | 15689 | 15690 | 15691 | 15692 | 15693 | 15694 | 15695 | 15696 | 15697 | 15698 | 15699 | 15700 | 15701 | 15702 | 15703 | 15704 | 15705 | 15706 | 15707 | 15708 | 15709 | 15710 | 15711 | 15712 | 15713 | 15714 | 15715 | 15716 | 15717 | 15718 | 15719 | 15720 | 15721 | 15722 | 15723 | 15724 | 15725 | 15726 | 15727 | 15728 | 15729 | 15730 | 15731 | 15732 | 15733 | 15734 | 15735 | 15736 | 15737 | 15738 | 15739 | 15740 | 15741 | 15742 | 15743 | 15744 | 15745 | 15746 | 15747 | 15748 | 15749 | 15750 | 15751 | 15752 | 15753 | 15754 | 15755 | 15756 | 15757 | 15758 | 15759 | 15760 | 15761 | 15762 | 15763 | 15764 | 15765 | 15766 | 15767 | 15768 | 15769 | 15770 | 15771 | 15772 | 15773 | 15774 | 15775 | 15776 | 15777 | 15778 | 15779 | 15780 | 15781 | 15782 | 15783 | 15784 | 15785 | 15786 | 15787 | 15788 | 15789 | 15790 | 15791 | 15792 | 15793 | 15794 | 15795 | 15796 | 15797 | 15798 | 15799 | 15800 | 15801 | 15802 | 15803 | 15804 | 15805 | 15806 | 15807 | 15808 | 15809 | 15810 | 15811 | 15812 | 15813 | 15814 | 15815 | 15816 | 15817 | 15818 | 15819 | 15820 | 15821 | 15822 | 15823 | 15824 | 15825 | 15826 | 15827 | 15828 | 15829 | 15830 | 15831 | 15832 | 15833 | 15834 | 15835 | 15836 | 15837 | 15838 | 15839 | 15840 | 15841 | 15842 | 15843 | 15844 | 15845 | 15846 | 15847 | 15848 | 15849 | 15850 | 15851 | 15852 | 15853 | 15854 | 15855 | 15856 | 15857 | 15858 | 15859 | 15860 | 15861 | 15862 | 15863 | 15864 | 15865 | 15866 | 15867 | 15868 | 15869 | 15870 | 15871 | 15872 | 15873 | 15874 | 15875 | 15876 | 15877 | 15878 | 15879 | 15880 | 15881 | 15882 | 15883 | 15884 | 15885 | 15886 | 15887 | 15888 | 15889 | 15890 | 15891 | 15892 | 15893 | 15894 | 15895 | 15896 | 15897 | 15898 | 15899 | 15900 | 15901 | 15902 | 15903 | 15904 | 15905 | 15906 | 15907 | 15908 | 15909 | 15910 | 15911 | 15912 | 15913 | 15914 | 15915 | 15916 | 15917 | 15918 | 15919 | 15920 | 15921 | 15922 | 15923 | 15924 | 15925 | 15926 | 15927 | 15928 | 15929 | 15930 | 15931 | 15932 | 15933 | 15934 | 15935 | 15936 | 15937 | 15938 | 15939 | 15940 | 15941 | 15942 | 15943 | 15944 | 15945 | 15946 | 15947 | 15948 | 15949 | 15950 | 15951 | 15952 | 15953 | 15954 | 15955 | 15956 | 15957 | 15958 | 15959 | 15960 | 15961 | 15962 | 15963 | 15964 | 15965 | 15966 | 15967 | 15968 | 15969 | 15970 | 15971 | 15972 | 15973 | 15974 | 15975 | 15976 | 15977 | 15978 | 15979 | 15980 | 15981 | 15982 | 15983 | 15984 | 15985 | 15986 | 15987 | 15988 | 15989 | 15990 | 15991 | 15992 | 15993 | 15994 | 15995 | 15996 | 15997 | 15998 | 15999 | 16000 | 16001 | 16002 | 16003 | 16004 | 16005 | 16006 | 16007 | 16008 | 16009 | 16010 | 16011 | 16012 | 16013 | 16014 | 16015 | 16016 | 16017 | 16018 | 16019 | 16020 | 16021 | 16022 | 16023 | 16024 | 16025 | 16026 | 16027 | 16028 | 16029 | 16030 | 16031 | 16032 | 16033 | 16034 | 16035 | 16036 | 16037 | 16038 | 16039 | 16040 | 16041 | 16042 | 16043 | 16044 | 16045 | 16046 | 16047 | 16048 | 16049 | 16050 | 16051 | 16052 | 16053 | 16054 | 16055 | 16056 | 16057 | 16058 | 16059 | 16060 | 16061 | 16062 | 16063 | 16064 | 16065 | 16066 | 16067 | 16068 | 16069 | 16070 | 16071 | 16072 | 16073 | 16074 | 16075 | 16076 | 16077 | 16078 | 16079 | 16080 | 16081 | 16082 | 16083 | 16084 | 16085 | 16086 | 16087 | 16088 | 16089 | 16090 | 16091 | 16092 | 16093 | 16094 | 16095 | 16096 | 16097 | 16098 | 16099 | 16100 | 16101 | 16102 | 16103 | 16104 | 16105 | 16106 | 16107 | 16108 | 16109 | 16110 | 16111 | 16112 | 16113 | 16114 | 16115 | 16116 | 16117 | 16118 | 16119 | 16120 | 16121 | 16122 | 16123 | 16124 | 16125 | 16126 | 16127 | 16128 | 16129 | 16130 | 16131 | 16132 | 16133 | 16134 | 16135 | 16136 | 16137 | 16138 | 16139 | 16140 | 16141 | 16142 | 16143 | 16144 | 16145 | 16146 | 16147 | 16148 | 16149 | 16150 | 16151 | 16152 | 16153 | 16154 | 16155 | 16156 | 16157 | 16158 | 16159 | 16160 | 16161 | 16162 | 16163 | 16164 | 16165 | 16166 | 16167 | 16168 | 16169 | 16170 | 16171 | 16172 | 16173 | 16174 | 16175 | 16176 | 16177 | 16178 | 16179 | 16180 | 16181 | 16182 | 16183 | 16184 | 16185 | 16186 | 16187 | 16188 | 16189 | 16190 | 16191 | 16192 | 16193 | 16194 | 16195 | 16196 | 16197 | 16198 | 16199 | 16200 | 16201 | 16202 | 16203 | 16204 | 16205 | 16206 | 16207 | 16208 | 16209 | 16210 | 16211 | 16212 | 16213 | 16214 | 16215 | 16216 | 16217 | 16218 | 16219 | 16220 | 16221 | 16222 | 16223 | 16224 | 16225 | 16226 | 16227 | 16228 | 16229 | 16230 | 16231 | 16232 | 16233 | 16234 | 16235 | 16236 | 16237 | 16238 | 16239 | 16240 | 16241 | 16242 | 16243 | 16244 | 16245 | 16246 | 16247 | 16248 | 16249 | 16250 | 16251 | 16252 | 16253 | 16254 | 16255 | 16256 | 16257 | 16258 | 16259 | 16260 | 16261 | 16262 | 16263 | 16264 | 16265 | 16266 | 16267 | 16268 | 16269 | 16270 | 16271 | 16272 | 16273 | 16274 | 16275 | 16276 | 16277 | 16278 | 16279 | 16280 | 16281 | 16282 | 16283 | 16284 | 16285 | 16286 | 16287 | 16288 | 16289 | 16290 | 16291 | 16292 | 16293 | 16294 | 16295 | 16296 | 16297 | 16298 | 16299 | 16300 | 16301 | 16302 | 16303 | 16304 | 16305 | 16306 | 16307 | 16308 | 16309 | 16310 | 16311 | 16312 | 16313 | 16314 | 16315 | 16316 | 16317 | 16318 | 16319 | 16320 | 16321 | 16322 | 16323 | 16324 | 16325 | 16326 | 16327 | 16328 | 16329 | 16330 | 16331 | 16332 | 16333 | 16334 | 16335 | 16336 | 16337 | 16338 | 16339 | 16340 | 16341 | 16342 | 16343 | 16344 | 16345 | 16346 | 16347 | 16348 | 16349 | 16350 | 16351 | 16352 | 16353 | 16354 | 16355 | 16356 | 16357 | 16358 | 16359 | 16360 | 16361 | 16362 | 16363 | 16364 | 16365 | 16366 | 16367 | 16368 | 16369 | 16370 | 16371 | 16372 | 16373 | 16374 | 16375 | 16376 | 16377 | 16378 | 16379 | 16380 | 16381 | 16382 | 16383 | 16384 | 16385 | 16386 | 16387 | 16388 | 16389 | 16390 | 16391 | 16392 | 16393 | 16394 | 16395 | 16396 | 16397 | 16398 | 16399 | 16400 | 16401 | 16402 | 16403 | 16404 | 16405 | 16406 | 16407 | 16408 | 16409 | 16410 | 16411 | 16412 | 16413 | 16414 | 16415 | 16416 | 16417 | 16418 | 16419 | 16420 | 16421 | 16422 | 16423 | 16424 | 16425 | 16426 | 16427 | 16428 | 16429 | 16430 | 16431 | 16432 | 16433 | 16434 | 16435 | 16436 | 16437 | 16438 | 16439 | 16440 | 16441 | 16442 | 16443 | 16444 | 16445 | 16446 | 16447 | 16448 | 16449 | 16450 | 16451 | 16452 | 16453 | 16454 | 16455 | 16456 | 16457 | 16458 | 16459 | 16460 | 16461 | 16462 | 16463 | 16464 | 16465 | 16466 | 16467 | 16468 | 16469 | 16470 | 16471 | 16472 | 16473 | 16474 | 16475 | 16476 | 16477 | 16478 | 16479 | 16480 | 16481 | 16482 | 16483 | 16484 | 16485 | 16486 | 16487 | 16488 | 16489 | 16490 | 16491 | 16492 | 16493 | 16494 | 16495 | 16496 | 16497 | 16498 | 16499 | 16500 | 16501 | 16502 | 16503 | 16504 | 16505 | 16506 | 16507 | 16508 | 16509 | 16510 | 16511 | 16512 | 16513 | 16514 | 16515 | 16516 | 16517 | 16518 | 16519 | 16520 | 16521 | 16522 | 16523 | 16524 | 16525 | 16526 | 16527 | 16528 | 16529 | 16530 | 16531 | 16532 | 16533 | 16534 | 16535 | 16536 | 16537 | 16538 | 16539 | 16540 | 16541 | 16542 | 16543 | 16544 | 16545 | 16546 | 16547 | 16548 | 16549 | 16550 | 16551 | 16552 | 16553 | 16554 | 16555 | 16556 | 16557 | 16558 | 16559 | 16560 | 16561 | 16562 | 16563 | 16564 | 16565 | 16566 | 16567 | 16568 | 16569 | 16570 | 16571 | 16572 | 16573 | 16574 | 16575 | 16576 | 16577 | 16578 | 16579 | 16580 | 16581 | 16582 | 16583 | 16584 | 16585 | 16586 | 16587 | 16588 | 16589 | 16590 | 16591 | 16592 | 16593 | 16594 | 16595 | 16596 | 16597 | 16598 | 16599 | 16600 | 16601 | 16602 | 16603 | 16604 | 16605 | 16606 | 16607 | 16608 | 16609 | 16610 | 16611 | 16612 | 16613 | 16614 | 16615 | 16616 | 16617 | 16618 | 16619 | 16620 | 16621 | 16622 | 16623 | 16624 | 16625 | 16626 | 16627 | 16628 | 16629 | 16630 | 16631 | 16632 | 16633 | 16634 | 16635 | 16636 | 16637 | 16638 | 16639 | 16640 | 16641 | 16642 | 16643 | 16644 | 16645 | 16646 | 16647 | 16648 | 16649 | 16650 | 16651 | 16652 | 16653 | 16654 | 16655 | 16656 | 16657 | 16658 | 16659 | 16660 | 16661 | 16662 | 16663 | 16664 | 16665 | 16666 | 16667 | 16668 | 16669 | 16670 | 16671 | 16672 | 16673 | 16674 | 16675 | 16676 | 16677 | 16678 | 16679 | 16680 | 16681 | 16682 | 16683 | 16684 | 16685 | 16686 | 16687 | 16688 | 16689 | 16690 | 16691 | 16692 | 16693 | 16694 | 16695 | 16696 | 16697 | 16698 | 16699 | 16700 | 16701 | 16702 | 16703 | 16704 | 16705 | 16706 | 16707 | 16708 | 16709 | 16710 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

## IŠVADOS

1. Kraujo grupių, kraujo serumo baltymų bei fermentų polimorfizmo tyrimai atskleidė didelę žemaitukų ir stambiųjų žemaitukų arklių populiacijų genetinę įvairovę:

1.1. faktinis heterozigotiškumas (žemaitukų 0,430, stambiųjų žemaitukų 0,440) buvo didesnis nei kitų šalių domestikuotų arklių populiacijų faktinio heterozigotiškumo vidurkis (0,371);

1.2. laukiamas heterozigotiškumas (žemaitukų 0,377, stambiųjų žemaitukų 0,416) buvo didesnis nei kitų domestikuotų arklių populiacijų laukiamo heterozigotiškumo vidurkis (0,365);

2. Žemaitukų veisės karboksilesterazės sistemoje nustatyta alelė T sutinkama dažniu 0,267. Ši alelė anksčiau buvo rasta tik keliose negiminingose arklių veislėse iš šimtų tūkstančių tirtų arklių. Tai patvirtina žemaitukų veislės unikalumą.

3. Kraujo grupių, kraujo serumo baltymų bei fermentų polimorfizmo duomenų filogenetinis medis rodo Lietuvos vietinių veislių arklių genetinį panašumą.

4. Tyrimai, atlikti pagal mikrosatelitinių DNR žymeklių kompleksą, rodo, kad Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijų genetinės įvairovės įverčiai palyginti aukšti:

4.1. Žemaitukų faktinis heterozigotiškumas yra 0,682, stambiųjų žemaitukų - 0,758 ir Lietuvos sunkiųjų - 0,760. Kitų šalių domestikuotų arklių populiacijų faktinio heterozigotiškumo vidurkis sudarė 0,699;

4.2. Žemaitukų laukiamas heterozigotiškumas yra 0,641, stambiųjų žemaitukų - 0,714 ir Lietuvos sunkiųjų - 0,718. Kitų šalių domestikuotų arklių populiacijų laukiamo heterozigotiškumo vidurkis sudarė 0,698;

5. Lietuvos vietinių veislių arklių populiacijose, tėvystei nustatyti naudojant mikrosatelitinius žymeklius VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, AHT5, HMS6, ASB2, HTG10, HMS3, LEX3, LEX33, ASB17 ir ASB23, metodo patikimumas žemaitukų veislėje siekė 99,94%, o stambiųjų žemaitukų ir Lietuvos sunkiųjų arklių veislėje - 99,99%.

6. DNR mikrosatelitinių žymeklių polimorfizmo duomenų filogenetiniame medyje Lietuvos vietinės veislės sudarė atskirą klasterį.

7. Mitochondrinės DNR D-kilpos nukleotidų sekų nustatymo metu gauti penki skirtingi haplotipai patvirtina, kad žemaitukų veislėje yra

išlikusios penkios skirtingos kumelių šeimos.

8. MtDNR filogenetinės analizės metu nenustatyta naujos informacijos apie Lietuvos vietinių veislių arklių kilmę.

## PASIŪLYMAI

1. Prieš įtraukiant gyvulius į kilmės knygą, veislinį planą, visų Lietuvos vietinių veislių arklių kilmę turėtų būti patikslinta pagal genetinius žymeklius. Taip būtų galima sekti inbrydingo laipsnį.

2. Arklių kilmei patikslinti turėtų būti naudojami 12-13 mikrosatelitinių DNR žymeklių, taip būtų išvengta klaidų nustatant jų kilmę.

3. Tikslinga tęsti pradėtus tyrimus, įtraukiant daugiau domestikuotų arklių veislių, tai suteiktų daugiau informacijos apie Lietuvos vietinių veislių arklių kilmę, giminingumą ir kitimą evoliucijos eigoje.

4. Lietuvos vietinių veislių arklių kilmei nustatyti galėtų padėti antropologinės kasinėjimų medžiagos mitochondrinės DNR tyrimai.

## PUBLIKACIJOS

### *Straipsniai recenzuojamuose leidiniuose:*

1. Boveinienė B., Jatkauskienė V., Juras R. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for the Zemaitukai and other horse breeds // *Biologija*. 2000. No. 3. P. 19-21.

2. Juras R., Boveinienė B., Jatkauskienė V. DNA loci polymorphism in Zemaitukai horses // *Proceedings of the Latvian Academy of Science*. 2001. Vol. 55. No. 5-6. P. 247-250.

3. Juras R., Macijauskienė V. Analysis of the lines and families of the Zemaitukai horse breed // *Žemės ūkio mokslai*. 2002. No. 1. P. 58-61.

4. Juras R., Boveinienė B., Jatkauskienė V., Cothran E.G. Investigation of five biochemical loci PGD, PGM, GPI, HBA, PI and ES in Zemaitukai and heavy type Zemaitukai horse breeds // *Gyvulininkystė*. 2002. No. 41. P. 78-83.

5. Macijauskienė V., Juras R. An attempt at analysing the selected traits of body conformation, growth, performance and genetic structure of Lithuanian native Zemaitukai horse, the breed being preserved from extinction // *Animal Science Papers and Reports*. 2003. Vol. 21. No. 1. P. 35-46.

6. Juras R., Cothran E.G., Klimas R. Genetic analysis of three Lithuanian native horse breeds // *Acta Agriculturae Scandinavica*, Section A, Animal Science. 2003. Vol. 53. No. 4. P. 180-185.

#### ***Kitos mokslinės publikacijos:***

1. Juras R., Boveinienė B., Jatkauskienė V. DNA loci polymorphism of Zemaitukai horses // *Molecular biology and biotechnology in agriculturally important organisms*, conference. Kaunas, 16-17 November 2000. P. 3.

2. Macijauskienė V., Juras R. The Zemaitukai horse breed and conservation of its genepool // 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Budapest, 26-29 August 2001. P. 343.

3. Juras R., Cothran E.G. Genetic analysis of three Lithuanian native horse breeds // 28 International Conference on Animal Genetics, ISAG. Gottingen, 11-15 August 2002. P. 107.

4. Juras R., Macijauskienė V., Boveinienė B., Jatkauskienė V. Genetic analysis of Zemaitukai horse breed // 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Cairo, 1-4 September 2002. P. 257.

5. Juras R., Cothran E.G., Macijauskienė V. Genetic diversity of mitochondrial DNA in Zemaitukai horse // 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Bled, 5-9 September 2004. P. 70.

6. Juras R., Cothran E.G., Macijauskienė V. Genetic diversity of Zemaitukai horse // 29 International Conference on Animal Genetics, ISAG. Tokyo, 11-16 September 2004. P. 117.

## **SUMMARY**

### **Introduction**

Domesticated animals have been subjected, in the last hundred years, to great pressures to evolve to meet the changing needs of a commercialized, mechanized and globalized world. Today a large numbers of the world's breeds are in danger of extinction. Like it happened with the breeds of other domestic species, some horse breeds

are threatened by extinction because they do not appear to meet the current needs of humans. The conservation of breeds in their traditional forms allows them to stay as reminders of the history and culture of various human societies. The preservation of genetic variability within a breed is a central concept of conservation of rare breeds of domestic livestock species. Rare breeds are particularly susceptible to loss of genetic variation due to small population size. Genetic variation within a breed can be divided into two components: a) population genetic diversity, b) individual genetic variance. Reduction of the populational genetic diversity can result in the loss of long-term adaptability and survival probability of the breed. Loss of individual variation, mainly due to inbreeding, can cause a reduction in individual fertility and viability. Understanding genetic processes and assessments of the genetic variation within small populations are important to assist sound conservation management of these populations.

Genetic characterization of populations and correct pedigrees are the first steps in breed conservation and may have implications for future breeding strategies and management plans. Genetic markers designed for parentage verification, like blood markers and microsatellites, have been extensively used to assess levels of genetic variation of different horse populations, compare populations and determine relationships with other populations. Like the genomic DNA, mitochondrial DNA is useful for studying the evolution of closely related species. Mitochondrial DNA sequence polymorphism has been used to examine genetic relationship within breeds, among breeds, between domestic and wild horse populations and also to address questions of horse domestication.

The two primary uses of genetic markers in population genetics are to assess levels of genetic variation within populations and to determine relationship with other populations. Here we present the results of genetic analysis of the three Lithuanian horse breeds: Zemaitukai, large-type Zemaitukai and Lithuanian Heavy Drought horses.

The Zemaitukai is an ancient indigenous Lithuanian horse breed known since the 6th-7th centuries. The Zemaitukai became especially famous in the 14th century as an excellent military horse during the Lithuanian-Crusader Battles. Later, the Zemaitukai became a utility horse. The Zemaitukai horses are small in size, the average measurements being as follows: withers height 128-142 cm, chest girth 165-180 cm and

cannon bone girth 17-18 cm. The weight of horses is 360-420 kg. The horses are distinguished by remarkable endurance, strength, disease resistance, fertility and longevity. In the 18th century Zemaitukai mares contributed towards the formation of the Trakehner breed, and in the 20th century the Zemaitukai became the foundation for breeding the Lithuanian Heavy Drought and large-type Zemaitukai. Recently, in consequence of unfavourable historical and economical circumstances, the number of Zemaitukai seriously declined.

The development of the Large-type Zemaitukai horse began at the end of 19th century, when the demand for larger horses emerged and people were no longer satisfied with the small horse of Zemaitukai breed. Thus, in south-east Lithuania native Zemaitukai horses were crossed with the horses of the Orlov Trotter and North Swedish breeds. This crossing and subsequent breeding inter se resulted in a larger and stronger horse which since 1941 is considered to be native horse together with the old type Zemaitukai.

The Lithuanian Heavy Drought horse breed was developed by crossing native horses, mostly of Zemaitukai breed, with several stallions of Belgian original, of which Swedish Ardennes were most influential. Lithuanian Heavy Drought horses were developed by absorptive crossbreeding up to the 2nd and 3rd generations and by subsequent breeding inter se. In 1930, the use of the best crossbreeds for breeding was started on a large scale. Breeding inter se was started in 1953. The horses were selected for their constitution, body conformation and working qualities. Crossbreeding, selection and mating of horses of the desired type as well as good feeding and housing conditions were the main factors that influenced the formation of the Lithuanian heavy Drought horse breed. The breed was recognized in 1963.

#### **The aim and objectives of the study:**

The aim of the study was to perform the monitoring of Lithuanian native horse breeds using blood group, biochemical and microsatellite DNA typing. In order to achieve our goal we had several tasks:

- to analyze genetic diversity within the Zemaitukai, Zemaitukai large-type and Lithuanian heavy draught horse populations;
- to compare Lithuanian native horse breeds to other domestic horse populations.

#### **The novelties of the study:**

- for the first time a wide range of biochemical genetic markers and different typing techniques were used to access levels of genetic variability in Lithuanian horse breeds;
- DNA based methods were used to access levels of genetic variation in Lithuanian horse breeds;
- genetic variation in Lithuanian horses was investigated using mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing;
- genetic relationship and genetic distances between the breeds were estimated using a wide range of different genetic markers.

#### **Practical importance of the study:**

- the DNA based technology for routine parentage testing in Lithuanian native horses was evaluated;
- monitoring of genetic variability is important of Lithuanian native horse breeds for conservation;
- the mtDNA data also provides additional insights into the genetic diversity of the breed, which, in combination with data from nuclear genes, can be used to maximize the maintenance of genetic diversity within the Zemaitukai horse.

#### **The structure and volume of the dissertation:**

Doctoral dissertation is written in English and consists of the introduction, review of the literature, materials and methods, results, discussion, conclusions, suggestions, summary in Lithuanian, list of publications, 206 references and acknowledgements. In the dissertation there are 17 tables and 9 figures presented. Volume of the work - 109 pages.

#### **Materials and Methods**

Thirty samples of Zemaitukai horses and thirty samples of heavy type Zemaitukai were used for biochemical typing. Standard immunological procedures involving hemaagglutination and complement mediated hemolysis were used to detect variation of red cell alloantigens

at seven blood group loci. Starch and polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing were used to detect variation at 10 serum and rbc lysate protein loci. The horse blood group loci examined were A, C, D, K, P, Q and U, and the biochemical protein loci were alpha-1-beta glycoprotein (A1 $\beta$ ), albumin (AL), serum esterase (ES), vitamin D binding protein (GC), glucosephosphate isomerase (GPI), alpha-hemoglobin (HBA), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), phosphoglucomutase (PGM), protease inhibitor (PI) and transferrin (TF). Nomenclature for variants at all 17 loci was in accordance with internationally standardized usage for horses except for variants at some loci that have not yet received international recognition.

Thirty one sample of Zemaitukai horses, thirty samples of heavy type Zemaitukai and 24 samples of Lithuanian Heavy Draught horses were examined for genetic variation at microsatellite loci. The DNA typing panel for comparison of the breeds consisted of 12 microsatellites: *VHL20*, *HTG4*, *AHT4*, *HMS7*, *HTG6*, *AHT5*, *HMS6*, *ASB2*, *HTG10*, *HTG7*, *HMS3*, *HMS2*. Amplification of microsatellites in multiple PCR reactions was performed in 25  $\mu$ l total volume reactions containing 50 ng of genomic DNA, 0.07 to 0.8 pmol of primers, 1xPCR buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs and 1U AmpliTaq. For microsatellite amplification, a hot start procedure was used in which DNA template and primers were combined and heated at 95°C for 10 min. The temperature was then lowered and held at 85°C for 10 minutes for addition of the remaining reagents. 32 cycles of 1 minute at 95°C, annealing 58°C for 30 seconds and 72°C for 45 seconds, then cycling was completed with a final extension at 72°C for 30 min. Reaction products were analyzed using ABI 377 DNA sequencer. Fragment sizes were determined using the computer software STRand.

For mtDNA sequencing primers from published horse mtDNA sequence (Xu & Arnason, 1994) were designed: Forward 5'-CGCACATTACCCTGGTCTTG-3', Reverse 5'-GAACCAGATGCCAGGTATAG-3'. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out in 25  $\mu$ l total reaction volumes, each containing 0.2 mM dNTP's, 0.5  $\mu$ M of each primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1xPCR buffer, 1 U of Taq polymerase (PE Applied Biosystems, MA), 1U of AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems, MA) and 50 ng of template DNA. The reaction mixture was heated to 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles each consisting of 40 seconds denaturation at 94

°C, 45 seconds annealing at 55 °C, 45 seconds of extension at 72 °C and then a final 10 minutes extension at 72 °C. Sequencing was carried out using BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, MA). Sequences were determined using the ABI Prism 377 DNA Sequencer. All sequences were confirmed by re-sequencing the same sample using a second independent PCR reaction. Sequence alignment, to track mutations, was performed using, as a reference, the equine mtDNA sequence GeneBank X79547.

Gene frequencies for biochemical loci were calculated by direct count. Frequencies of alleles at blood group loci were calculated by the allocation method of Andersson. Genetic variation was measured as observed heterozygosity (Ho), Hardy-Weinberg expected heterozygosity (He), unbiased expected heterozygosity (Hu) Nei (1978), effective number of alleles (Ae), and the total number of variants found in each population (Na). Ho was calculated for biochemical loci only because of the presence of recessive alleles and/or ambiguous genotypes at blood group loci. Populational inbreeding level was estimated by Wright's  $F_{is} = 1 - (Ho/He)$ . Values of genetic variation of Lithuanian horse breeds were compared to those of domestic horse populations that have been tested at the University of Kentucky (Cothran, E.G. unpublished results). Genetic relationship of the Lithuanian horse breeds to these other domestic breeds was investigated using Roger's and Nei's genetic similarity coefficient. Restricted maximum likelihood analysis was used to construct the dendrogram from blood group and biochemical data. For microsatellite loci D<sub>A</sub> distance matrix was used to build phylogenetic tree with neighbour joining (NJ) method using Populations software. Neighbor-joining (NJ) method was used to construct a tree from mtDNA data.

## Results and Discussions

Individual genetic variation within the Zemaitukai old type and Zemaitukai heavy type horse breeds were higher than the mean Ho for 122 domestic horse populations (0.430, 0.440 and 0.371, respectively) (Table 1). Of the 122 populations of domestic breeds that have been examined, only 7 have higher values of Ho than Large type and 12 than Old type Zemaitukai. Thus, from a genetic conservation standpoint there is no immediate concern about reduced genetic variation within the

Lithuanian horse breeds. The populational variation measures ( $H_e$ ,  $N_a$  and  $A_e$ ) of Zemaitukai horse breeds were higher for  $H_e$  (0.377, 0.416 and 0.365, respectively) than means for domestic horse breeds and lower for  $N_a$  (54, 60 and 65.10) and  $A_e$  (2.159, 2.201 and 2.390). For both of breeds  $H_o$  exceeded  $H_e$ , resulting in negative  $F_{is}$  values.

In the old type Zemaitukai horses an allele we called T was frequent (0.267) at the serum carboxylesterase (EST) locus. We have only seen this variant in three horses (of unrelated breeds) out of many thousands that have been tested prior to examination of this breed.

Old type Zemaitukai horse has its highest similarity ( $S$ ) to heavy type Zemaitukai ( $S = 0.858$ ) as would be expected, and to Morgan Horses ( $S = 0.830$ ). The heavy type Zemaitukai showed closest resemblance to Yabou and Mountain pleasure ( $S = 0.879$ ). For both of the breeds highest mean similarity was observed to North American racehorse breeds with values 0.802 for old type and 0.848 for heavy type Zemaitukai. The next highest mean  $S$  was with Arabian type horse breed for Zemaitukai heavy type ( $S = 0.836$ ) and with the breeds of Spanish type for old type Zemaitukai ( $S = 0.787$ ).

Figure 1 shows the genetic relationship among horse breeds from RML analysis of the gene frequency data. Lithuanian horse breeds were paired with the Skyros pony from Greece, between clusters of Arabian type horses and “Spanish” type horse breed.

At twelve microsatellite loci observed heterozygosity for old type Zemaitukai was slightly below the mean for domestic horse breeds (0.682 compare to 0.697) (Table 2). Heavy type Zemaitukai and Lithuanian Heavy Draught observed heterozygosity values were higher than mean for domestic horses (0.758, 0.759 and 0.697, respectively). For all three breeds  $H_o$  exceeded  $H_e$  resulting in negative  $F_{is}$  values. Zemaitukai heavy type and Lithuanian Heavy Draught horses has high genetic variability for microsatellite loci and only five other domestic horse breeds has values higher than those two Lithuanian horse breeds tested to date.

$D_A$  distance matrix was used to build phylogenetic tree with neighbour joining (NJ) method using donkey as outgroup shown in figure 2. The NJ method for constructing evolutionary trees from distance data has been reported to be one of the most effective methods in obtaining the correct tree topology from microsatellite data. In this tree all Lithuanian breeds were grouped together, with closer relationship

between Zemaitukai and Zemaitukai heavy type and that would be expected. Lithuanian breeds were placed between Sorraia and South American horses that are breeds of Iberian origins and direct relationship to Lithuanian horse breeds is very unlikely. Sorraia was placed almost as an outgroup probably due to very low genetic variability.

DNA-based typing has replaced blood group and protein marker typing in most laboratories due to its high efficacy. In common breeds such as Thoroughbreds, Arabians as well indigenous breeds such as Sorraia, Noric horse and many others  $PE$  values exceeding 0.99 have been reported. The microsatellite set consisting of *VHL20*, *HTG4*, *AHT4*, *HMS7*, *AHT5*, *HMS6*, *ASB2*, *HTG10*, *HMS*, *LEX3*, *LEX33*, *ASB17* and *ASB23*. markers was highly efficient with probability of excluding wrongly named parents ranging from 99.94% for Zemaitukai to 99.99% for heavy type Zemaitukai and Lithuanian Heavy Draught. DNA testing will have an important place in the conservation of rare breeds by ensuring that pedigrees are correct. This will allow for precise management of inbreeding levels and preservation of specific lineages.

Investigation of biochemical loci indicates bottleneck Zemaitukai horse population. However small number of biochemical loci were tested. The examination of microsatellites also indicated bottleneck in this population. The Zemaitukai horse population undergoes founder event and heterozygosity will continue to decrease due to genetic drift in this population. The decrease in heterozygosity is strongly dependent on the rate of population growth. A newly founded population that expands rapidly will lose less variation than a slowly growing population. Total size of the Zemaitukai horse population is 149 individuals with the effective population number of 66.9; those figures from the theoretical standpoint are good for short-term maintenance.

Table 3 shows polymorphic sites in the control region between the five maternal lineages of Zemaitukai horse breed, Lithuanian Heavy Draught, Zemaitukai heavy type and the reference sample – GeneBank X79547. Sequence analysis of 421bp revealed five different haplotypes in the Zemaitukai horse breed supporting the presumed maternal pedigree lineages for existing horses. A total of 20 nucleotide differences compared to the reference sequence were found in Lithuanian horse breed. All detected mutations were transitions. The minimal difference to the unrelated horse reference sequence was six nucleotides in the Tulpes and Zibutes families and the maximal difference was nine in Arabes

family for Zemaitukai horse breed. The minimal difference between two different haplotype DNA sequences was 6 and the maximum was 11 nucleotides. Out of five samples analyzed five different haplotypes were found for Zemaitukai horses, which is comparable to other findings [13 haplotypes in 16 maternal lines of Lippizzan horses, 27 haplotypes in 34 Arabian maternal lines]. For other breeds, out of three randomly selected samples, two haplotypes for Holstein, Hucul, Zemaitukai heavy type and Finn horse and three haplotypes for rest of the breeds were observed. A total of 38 nucleotide differences compared to the reference sequence were found representing 9% of the total DNA sequence analyzed. Out of 38 detected mutations, there were 37 transitions and a single deletion in one individual of the Polish primitive horse breed. The deletion was located in stretch of five cytosines at position 15532.

For genetic cluster analysis, sequences of Arabian, Thoroughbred, Friesian, Akhal-Teke, Belgian, Caspian, Cleveland Bay, Clydasdales, Exmoor, Garrano, Haflinger, Lusitano, Noriker, Shetlands and Sorraia horse breeds were obtained from gene bank and included with the breeds sequenced in this study for analysis. The breeds represent a wide geographic area as well as the different horse types. Sequences were truncated to 353 bp for this analysis in order to maximize the number of breeds included. Both maximum parsimony and neighbour-joining analysis showed similar patterns. After truncating sequences for genetic cluster analysis, breeds that shared the same haplotype were pooled in to groups named C1, C2, C3 and C4. The C1 group contained the Holstein, Trakehner, Lithuanian Heavy Draught, Arabian, Sorraia and Hanovarian breeds. Hanovarian, Trakehner, Zemaitukai and Arabians were put in C2. Haplotypes of Akhal-Teke, Belgian, Haflinger, Zemaitukai, Polish Heavy, Garrano, Cleveland Bay, and Noriker were placed in C3. Hucul, Thoroughbred, Haflinger, Noriker and Lithuanian Heavy draught horse haplotypes formed the C4 group. Genetic cluster analysis did not shown any clear pattern of relationship among the domestic horse breeds whose relationships are well known historically (bootstrap analysis of 1000 replications, Figure 3). Haplotypes from the same breed frequently clustered in separate groups that included breeds of completely different horse breed types. This same pattern has been seen in other studies of horse mtDNA, but are different from ones obtained using blood and protein typing data, were horse breeds clustered corresponding to their known ancestry. The mtDNA analysis provided no

new information about the ancestry of the Lithuanian horse breeds. The analysis of mitochondrial DNA of Zemaitukai horses adds useful information for the effective management and conservation of this rare breed. The mtDNA results confirm the maternal lineages, which are useful for development of breeding strategies, aimed at evening the genetic contribution of different maternal founding lineages. The mtDNA data also provides additional insights into the genetic diversity of the breed, which, in combination with data from nuclear genes, can be used to maximize the maintenance of genetic diversity within the Zemaitukai horse.

The old type Zemaitukai horses were included into the FAO World Watch List for domestic animal diversity (1995) as a very valuable and internationally watched horse breed. The genetic variation is normal for Zemaitukai horses, however, genetic variation can be lost very quickly in small populations, and Zemaitukai does have small population. We have a human duty to preserve those three breeds and develop management efforts to save those breeds in their native area.

## Conclusions

1. Blood group and biochemical loci typing revealed high levels of genetic variability in Zemaitukai and Zemaitukai heavy type horse breeds:

1.1. observed heterozygosity for Zemaitukai (0.430) and Zemaitukai heavy type (0.440) was higher than mean for other domestic horse breeds (0.371);

1.2. expected heterozygosity for Zemaitukai (0.377) and Zemaitukai heavy type (0.416) was higher than mean for other domestic horse breeds (0.365).

2. An allele we called T (0.267) was observed in Zemaitukai horse population at the serum carboxylesterase locus. This variant was observed only in a few other horses (of unrelated breeds) out of many thousands that had been tested prior to examination of this breed. This confirms the uniqueness of the Zemaitukai horse population.

3. Phylogenetic analysis from blood typing data paired Lithuanian horses breeds together, confirming of their close relationship.

4. DNA typing revealed high levels of genetic variability in Lithuanian horses compared to other domestic horse breeds:

4.1. observed heterozygosity for Zemaitukai, Zemaitukai

heavy type and Lithuanian Heavy Draught was 0.682, 0.758 and 0,760, respectively. The mean for other domestic horse breeds 0.699;

4.2. expected heterozygosity for Zemaitukai, Zemaitukai heavy type and Lithuanian Heavy Draught was 0.641, 0.714 and 0,718, respectively. The mean for other domestic horse breeds 0.698.

5.The probability of excluding wrongly named parents using microsatellites VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, AHT5, HMS6, ASB2, HTG10, HMS3, LEX3, LEX33, ASB17 and ASB23, in Lithuanian horse breeds were 99.94% for Zemaitukai and 99.99% for Zemaitukai heavy type and Lithuanian Heavy Draught.

6.Phylogenetic analysis from DNA typing data paired all Lithuanian horses together in one cluster.

7.Sequencing of mitochondrial DNA D-loop confirmed pedigree data of five remaining mare family lines in Zemaitukai horse population.

8.Phylogenetic analysis of mtDNA, study does not provide new information about the origin of Lithuanian native horse breeds.

## **Suggestions**

1.The pedigrees should be checked for all Lithuanian native horse populations before accepting animal to stud book that will allow monitor levels of inbreeding.

2.For parentage testing 12-13 microsatellites should be used which will give high exclusion probabilities for wrongly assigned parents and would be relatively easy to multiplex.

3.In order better understand the origins of Lithuanian horse breeds further studies should include breeds from same geographic area.

4.Studies of ancient mitochondrial DNA could provide links to the early origins of the Lithuanian breeds and historical remains.

## **TRUMPOS ŽINIOS APIE AUTORIŲ**

Rytis Juras gimė 1978m. Šiauliuose. Baigęs Baisogalos vidurinę mokyklą 1995m. tais pačiais metais įstojo į Lietuvos veterinarijos akademijos (LVA) veterinarijos fakultetą. Aukštojo mokslo diplomas įgytas 2000m. Įstojo į LVA Gyvulininkystės Instituto genetikos ir veisimo skyriaus doktorantūros studijas gyvūnų kilmės patikrinimo ir tyrimų laboratorijoje. Doktorantūros studijų metais vyko stažuotis į Kentukio universiteto arklių kilmės patikslinimo ir tyrimų laboratoriją.