

**ცხოველთა სახეობების წარმოშობა და პოპულაციის
სტრუქტურირების კვლევა კავკასიაში**

მარინე მურცხვალაძე

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
მეცნიერებათა და ხელოვნების ფაკულტეტზე ეკოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორის
ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად*

**ეკოლოგიისა და კონსერვაციული ბიოლოგიის
სადოქტორო პროგრამა**

**ხელმძღვანელი დავით თარხნიშვილი
ბიოლ.მეცნ. დოქტორი, პროფესორი**

**ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი 2012**

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის: **“ცხოველთა სახეობების წარმოშობა და პოპულაციის სტრუქტურირების კვლევა კავკასიაში”** ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

მარინე მურცხვალაძე



13.07.2012

აბსტრაქტი

ნაშრომი ეძღვნება კავკასიაში გავცელებული ტაქსონების ევოლუციის და სახეობათწარმოქმნის მექანიზმების კვლევას, იზოლაციის, გენეტიკური სტრუქტურირების და ჰიბრიდიზაციის მიზეზების იდენტიფიცირებას. კვლევა ჩატარდა მურა დათვის (*Ursus arctos*), ხმელეთის ლოკოკინების (*Helix*), ჯეირნის (*Gazzela*), კავკასიის კლდის ხვლიკებზე (*Darevskia*).

კავკასიაში მურა დათვის კვლევა მიზანად ისახავდა: დაგვეზუსტებინა ტაქსონომია, გავვერკვია ისტორიული განსახლება, გამოგვევლინა იზოლირებული ჯგუფები და გენეტიკური სტრუქტურირების მექანიზმები. კვლევის შედეგად აღმოჩნდა, მდებარეობითი ხაზით დიდი და მცირე კავკასიონის პოპულაციები გაემიჯნენ ერთმანეთს უკანასკნელი გამყინვარების დროს; დიდი კავკასიონიდან მცირე კავკასიონზე, სავარაუდოდ ლიხის ქედის გავლით, ხდება მხოლოდ მამრი ინდივიდების მიგრაცია. კავკასიის პოპულაციის ინდივიდები ეკუთვნის ნომინალურ ქვესახეობას (*Ursus arctos arctos*).

კავკასიის ხმელეთის ენდემური ლოკოკინების (*Helix buchi* და *H. goderdziana*) კვლევის მიზანი იყო სახეობათწარმოქმნის მექანიზმების დაზუსტება მტ ღნმ-სა და მორფოლოგიური ანალიზით. ფილოგენეტიკის შესწავლამ დაადასტურა *H. buchi*-ის და *H. goderdziana*-ს რეციპროკული მონოფილეტური წარმოშობა. ორივე სახეობის ბაზალური ჰაპლოტიპების გავრცელება ემთხვევა გამყინვარების დროს რეფუგიუმების საზღვრებს.

ჯეირნების კვლევის მთავარ ამოცანას წარმოადგენდა დაგვედგინა შეიძლება თუ არა მხოლოდ მტ ღნმ-ის ანალიზით შევარჩიოთ სარეინტროდუქციო ინდივიდები. კვლევამ აჩვენა, რომ აღნიშნული ჯეირნები მატრილინეალურად ორ ქვესახეობას მიეკუთვნებიან *Gazella subgutturosa* და *G. marica*-ს. ამ ქვესახეობებს შორის მიმდინარეობს ბუნებრივი ჰიბრიდიზაცია. ჰიბრიდები სიცოცხლისუნარიანები არიან. აზერბაიჯანის პოპულაციის ინტროდუქცია არ უქმნის საფრთხეს ეროვნულ პარკში რეინტროდუცირებულ ინდივიდებს.

კავკასიის კლდის ხვლიკების სახეობათწარმოქმნა აღწერილია *Darevskia "rudis"* კლდის სამი სახეობის: *D. rudis*, *D. valentini*, და *D. portschinskii*-ის მაგალითზე. გვანტერესებდა დაგვეზუსტებინა სახეობების ევოლუციის სცენარი, შეგვეფასებინა გენების მიმოცვლის ინტენსივობა, გაგვეჩვენა გადარჩევის მექანიზმები და შეგვეფასებინა ჰიბრიდული ორგანიზმების გადარჩენის ალბათობა. გენეტიკურმა კვლევამ აჩვენა, რომ გამყინვარების ტალღების დროს, ადგილი ჰქონდა იზოლაციას, ხოლო ინტერგლაციულში გენების ინტროგრესიას ნომინალურ სახეობებში. ინტროგრესიის ინტენსივობა ნაკლებია კლიმატურად განსხვავებულ კლიმატურ პირობებში გავრცელებულ სახეობებში და გადარჩევა მიმართულია ჰიბრიდული ორგანიზმების საწინააღმდეგოდ. *D. portschinskii* განცალკევდა *rudis* -სგან უფრო ადრე, ვიდრე *valentini*. თუმცა გენების მიმოცვლა, მიუხედავად შედარებით ხანგრძლივი დივერგენციისა, უფრო ინტენსიურია *rudis*-სა და *portschinskii*-ს შორის ვიდრე *D. rudis* და *D. valentini*- შორის.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: კავკასია; რეფუგიუმები; ფილოგენია; ჰიბრიდიზაცია, სახეობათწარმოქმნა.

Abstract

The Caucasus is in the list of Biodiversity “Hotspots”, as most diverse and vulnerable area in the world (IUCN). In this dissertation, molecular-genetic methods were used to explore evolution, revise existing taxonomies; identify mechanisms of speciation and evaluate genetic structure of selected animal species.

In Chapter 1, molecular genetic methods are used to clarify taxonomic status of brown bear in the Caucasus. mtDNA sequences (CR) were analyzed to reveal phylogenetic relationships, infer divergence time and identify possible barriers between subpopulations. Our results revealed two genetically and geographically distinct maternal haplogroups. The splitting these haplogroups dates as far back as the beginning of human colonization of the Caucasus. Low genetic differentiation inferred from microsatellite allele frequencies indicates that gene flow between the two populations is maintained through the movements of male brown bears. The Likhi Ridge that connects the Greater and Lesser Caucasus Mountains is the most likely corridor for this migration. Our suggestion is that all Caucasian bears belong to the nominal subspecies of *Ursus arctos*.

Chapter 2 describes speciation of two endemic species (*H. buchi* and *H. goderdzian*) of the Caucasus region. 52 specimens of *Helicidae* family were analyzed with mitochondrial CO1 and nuclear ITS-1 genes. Phylogenetic analysis supported reciprocal monophyly of *H. buchi* and *H. goderdziana*. The basal lineages of both species are found within two distinct glacial refugia. Extant distribution of *H. goderdziana* coincides with the anticipated refugial borders, whereas *H. buchi* is likely to widen the range in the post-glacial time.

In chapter 3, mitochondrial DNA cyt b gene was used for identification subspecies of *Gazella subgutturosa*. Five years ago 15 individuals of goitered gazella from eastern Turkey were introduced to Georgia for reintroduction purpose. To avoid deleterious inbreeding effects it was suggested introducing more individuals from Azerbaijan. Our finding confirms individuals from Turkey belong to *G. s. marica* and individuals from Azerbaijan belong to *G. s. subgutturosa*. There is ongoing maternal gene introgression from *G. s. marica* to *G. s. subgutturosa*, all females in studied specimens have no horns and morphologically looks like

G. s. subgutturosa. Our suggestion is that there is a natural gene flow among populations of the two subspecies, and morphological or recombinant genetic markers should be used for estimation of eligibility of reintroduction of gazelles in areas relatively close to the contact zone rather than the mitochondrial DNA markers.

Finally in chapter 4, genetic boundaries of three species of a rock lizard clade - *Darevskia* “*rudis*” (*D. rudis*, *D. valentini*, and *D. portschinskii*) were analyzed. Reconstruction of evolutionary pathways underline observed separation among the species. Studying mtDNA and nDNA markers showed asymmetric distribution of alleles within each species’ current contact zones. The diversification of the clade spanned periods of isolation during glacial cycles in the Pleistocene and repeated contacts during interglacial periods. The repeated contacts resulted gene introgression among the species. The introgression is stronger among neighboring populations. Natural selection occurs against hybrid genotypes. Isolation period *per se* was insufficient for development of intrinsic isolation mechanisms.

Key words: Caucasus; Refugia; Phylogeny; Speciation; Hybridization.

მადლობა

წინამდებარე სამუშაოს შესრულება შეუძლებელი იქნებოდა, რომ არა უამრავი ადამიანის დახმარება და მხარდაჭერა.

მინდა მადლიერების გრძნობა გამოვხატო ჩემი ხელმძღვანელის დავით თარხნიშვილის მიმართ.

დიდი მადლობა მინდა გადავუხადო:

- ჩემი ოჯახის წევრებს თანადგომისთვის,
- კორტ ანდერსონს აშშ-ი და ბერნად მიზოფს გერმანიაში მასპინძლობისთვის.
- ჩემს მეგობრებს: პაულინა ვიტერის, მარტა დე ბარბას, კარა გეჰარდტს, დახმარებისთვის.

- ჩემს კოლეგებს: ლევან მუმლაძეს, ლექსო გავაშელიშვილს, ბეჟან ლორთქიფანიძეს, ზურა ჯავახიშვილს, ელშად ასკეროვს, ნათია კოპალიანს, ზურაბ გურიელიძეს სინჯების მოგროვებისა და ფასდაუდებელი რჩევებისთვის.

სტუდენტებს: მაია შაქარაშვილს, ხატია ყურაშვილს, თამარ ქერხულს, ანნა ავალიანს, მარიამ გაბელაიას ლაბორატორიულ სამუშაოებში დახმარებისთვის.

სამუშაო ჩატარდა GRDF, GNSF, AvH , IBA ფონდების ფინანსური მხარდაჭერით.

სარჩევი

სურათების ჩამონათვალი	10
შესავალი	11
კავკასიის გეოლოგიური წარსული.....	11
მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდების განვითარების მოკლე ისტორია	16
მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის თანამედროვე მეთოდები.....	17
პროტეინების ელექტროფორეზი	18
მოლეკულური ციტოგენეტიკა - კარიოსისტემატიკა.....	18
დნმ-დნმ ჰიბრიდიზაცია	19
დნმ-ს ფრაგმენტების რესტრიქტაზული ანალიზი (RFLP).....	19
ჯაჭვური პოლიმერაზას რეაქცია (პჯრ).....	20
შემთხვევითად ამპლიფიცირებული დნმ-ს პოლიმორფული ფრაგმენტები RAPD.....	22
ცვალებადი მოკლე ტანდემური განმეორებები (მინისატელიტები).....	23
მოკლე ტანდემური განმეორებები (მიკროსატელიტური ლოკუსები).....	23
ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობების წაკითხვა - სექვენირება.....	25
ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის მოლეკულურ-გენეტიკური ლაბორატორია	28
თავი 1: მურა დათვის ტაქსონომიის კვლევა და პოპულაციის გენეტიკური სტრუქტურის შეფასება კავკასიაში	37
1.1. შესავალი	38
1. 2. მასალა და მეთოდი	39
1.2.1. სინჯების მოგროვება, დნმ-ს ექსტრაქცია, მტ დნმ-ს კვლევა	39
1.2.2. ბირთვული დნმ-ს მიკროსატელიტური ლოკუსები (გენოტიპირება)	40
1.3. მიღებული შედეგები	41
1.3.1. დნმ-ს ექსტრაქცია და მტ დნმ-ს კვლევა	41
1.3.2. პოპულაციურ - გენეტიკური ანალიზი.....	43
1.4. მიღებული შედეგების ანალიზი და დისკუსია.....	45
თავი 2. სახეობათწარმოქმნა და კავკასიის ხმელეთის ენდემური ლოკოკინების (<i>Helix buchi</i> და <i>H. goderdziana</i>) გავრცელება.	48
2.1. შესავალი	49
2.2. მასალა და მეთოდი	50
2.2.1. დნმ-ს ანალიზი და ჰაპლოტიპების კვლევა	50

2.3. მიღებული შედეგები	52
2.3.1. ტაქსონებს შორის ფილოგენეტიკური კავშირი	52
2.4. შედეგების ანალიზი და დისკუსია	55
თავი 3. გენების ინტროგრესია <i>Gazella subguturosa</i> და <i>G. marica</i> - შორის, არის მიტოქონდრიული დნმ-ს კვლევა საკმარისი სახეობის დასადგენად?.....	56
3.1. შესავალი	57
3.2. მასალა და მეთოდი	57
3.3. მიღებული შედეგები და მათი ანალიზი	59
თავი 4. კავკასიის კლდის ხვლიკების სახეობათწარმოქმნა (<i>Rudis</i>) ჯგუფის მაგალითზე.....	62
4.1. შესავალი	63
4.2. მასალა და მეთოდი	65
4.2.1. სინჯების შეგროვება, დნმ-ს ექსტრაქცია და მტ დნმ-ს კვლევა.....	65
4.2.2 ბირთვული დნმ-ს კვლევა.....	66
4.3 მიღებული შედეგები	66
4.3.1 ჰაპლოტიპების სივრცული გავრცელება და მტ დნმ-ს ფილოგენია	66
4.3.4. გენოტიპირების შედეგები.....	69
4.4 მიღებული შედეგების ანალიზი და დისკუსია.....	71
ციტირებული ლიტერატურა:	76
დანართი 1: დნმ-ს ექსტრაქცია ქსოვილების, სისხლის, ბეწვის სინჯებიდან QIAGEN-რეაქტივებით	101
დანართი 2: დნმ-ს ექსტრაქცია ექსკრემენტის სინჯებიდან QIAGEN რეაქტივებით	102
დანართი 3: პჯრ პროდუქტების გასუფთავება პოლიეთილენგლიკოლით.....	104
დანართი 4: სექვენირებული დნმ-ს გასუფთავება	105
დანართი 5. გამოყენებული პრაიმერები	106
დანართი 6: გამოქვეყნებული შრომები:	107

სურათების ჩამონათვალი

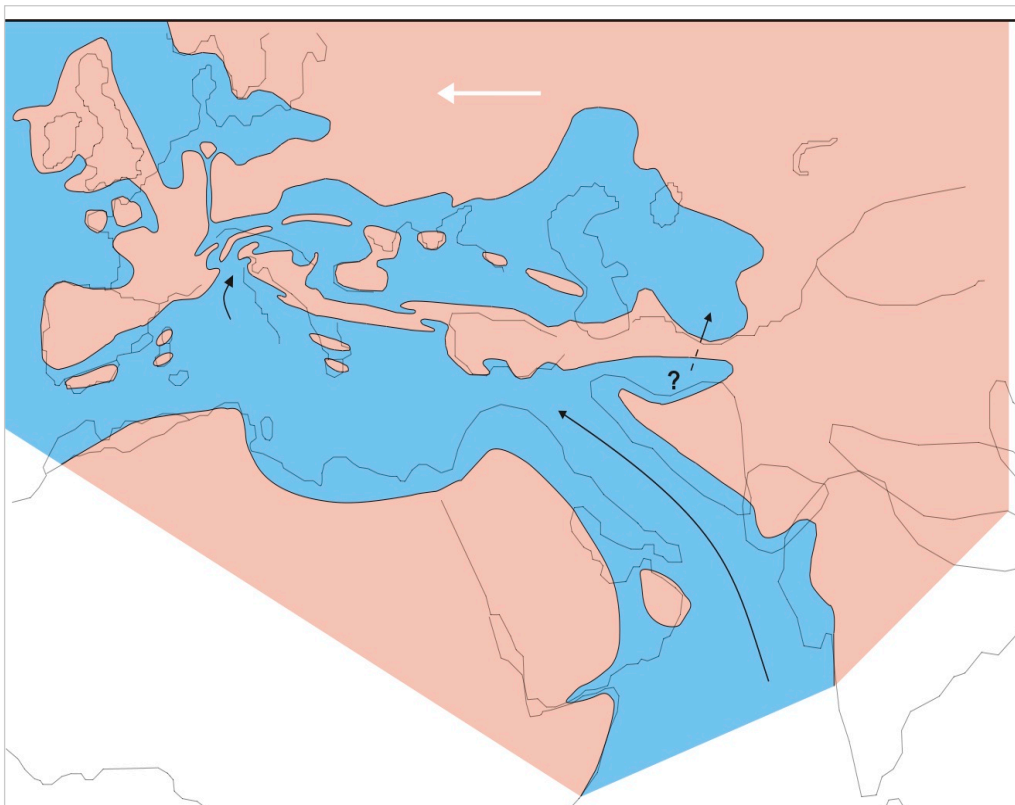
სურათი 1.	დასავლეთ ევრაზია მიოცენში	11
სურათი 2.	ხმელთაშუაზღვის რეგიონი და მცირე აზია შუა მიოცენში	12
სურათი 3.	ხმელთაშუაზღვის და კავკასიონის რეგიონი მესინის კრიზისის დროს	13
სურათი 1.1	მურა დათვის სინჯების მოპოვების ადგილები	38
სურათი 1.2	მურა დათვის ფილოგენეტიკური ხე	42
სურათი 1.3	უახლოესი მეზობლის ალგორითმით აგებული ფილოგენეტიკური ხე	43
სურათი 1.4	მურა დათვის ინდივიდების განაწილების ალბათობა დიდ და მცირე კავკასიონზე	44
სურათი 2.1	კავკასიის ხმელეთის ლოკოკინები	49
სურათი 2.2	<i>H. buch</i> -ს <i>H. goderdziana</i> - სინჯების მოპოვების ადგილები	51
სურათი 2.3	კავკასიის (<i>Helix</i>) ფილოგენეტიკური ხე	53
სურათი 2.4	გენეტიკური კავშირი <i>H. buch</i> -და <i>H. goderdziana</i> ჰაპლოტიპებს შორის	54
სურათი 3.1	ჯეირნის სინჯების მოპოვების ადგილები	58
სურათი 3.2	ჯეირნის ზრდასრული მამრი და მდედრი ინდივიდები	60
სურათი 4.1	<i>Rudis</i> კლადის სამი სახეობის სინჯების მოპოვების ადგილები	65
სურათი 4.2	<i>Rudis</i> კლადის სამი სახეობის არეალი მოდელირების მიხედვით	67
სურათი 4.3	<i>Rudis</i> კლადის ევოლუციის სცენარი	68
სურათი 4.4	<i>D.rudis</i> , <i>D.portchinskii</i> და <i>D.valentini</i> გენოტიპების ანალიზი	69
სურათი 4.5	იზოლაცია და მიგრაციის ინტენსივობა მტდნმ და ბ დნმ-ს მიხედვით <i>Rudis</i> კლადის სამ სახეობაში	70
სურათი 4.6	<i>Rudis</i> კლადის სამი სახეობის კლასტერების სივრცული განაწილება	72

შესავალი

კავკასიის გეოლოგიური წარსული

ბუნების დაცვის მსოფლიო კავშირმა (IUCN-international) და Conservation International-მა კავკასია ბიომრავალფეროვნების 34 ცხელ წერტილს შორის ერთ-ერთად გამოაცხადა (Mayers et al., 2000; Mittermeier 2004; Zazanashvili et al., 2004). კრიტიკული ეკოსისტემების პარტნიორობის ფონდის (CEPF) მონაცემებით, კავკასია ერთ-ერთია მსოფლიოს 21 რეგიონს შორის, რომელიც ბიოლოგიურად მრავალფეროვან და მოწყვლად ეკორეგიონად ხასიათდება. ამის ერთ-ერთი მიზეზი კავკასიის სახეობრივი მრავალფეროვნება და ენდემიზმის მაღალი დონეა (Tarkhnishvili & Kikodze 1996; Zazanashvili et al., 2004).

სურ.1 დასავლეთ ევრაზია მიოცენში (23-25 მლნ წ.)



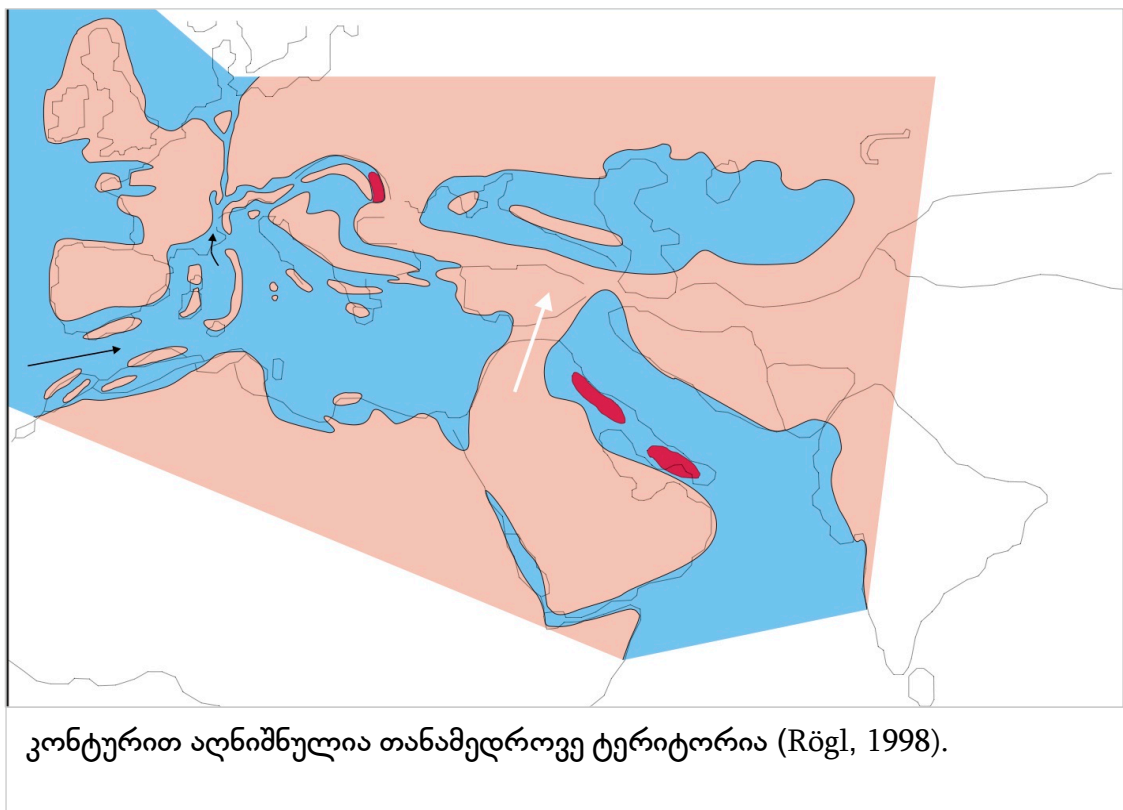
კონტურით აღნიშნულია თანამედროვე ტერიტორია (Rögl, 1998).

კავკასიის ბიომრავალფეროვნების ჩამოყალიბებაში გადამწყვეტი როლი გლობალურმა გეოლოგიურმა პროცესებმა ითამაშა. კავკასიის, როგორც უნიკალური

რეგიონის, ფორმირება მიოცენიდან (25-23 მლიონი წელი) იწყება. მიოცენში ევრაზიას ჯერ არ ჰქონდა დღევანდელი სახე (Fortelius et al., 2000), კერძოდ, შავი, არალის და კასპიის ზღვები ქმნიდა ერთ, დიდ, პარათეთისის ზღვას. ადგილი, სადაც დღევანდელი დიდი კავკასიონის მთებია, წარმოდგენილი იყო კუნძულის სახით პარათეთისის ზღვაში (სურ. 1) (Roghl & Steininger 1984). მიოცენში, მცირე აზია (თანამედროვე თურქეთის ტერიტორია), ხმელეთის ხილით დაკავშირებული იყო ბალკანეთის ნახევარკუნძულთან, მაგრამ არ ესაზღვრებოდა ირანს და ცენტრალურ აზიას, ხოლო თანამედროვე მცირე კავკასიონის მთები, მცირე აზიის ჩრდილო-აღმოსავლეთის ნაპირს წარმოადგენდა (სურ. 1 Rögl, 1998).

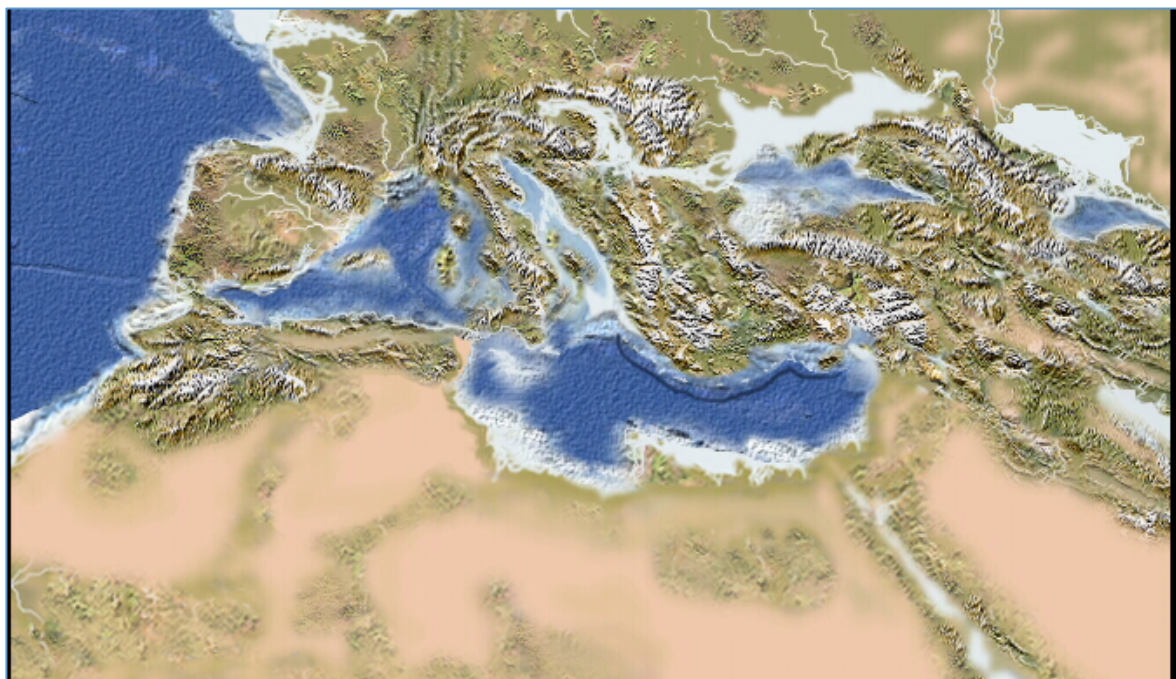
13-15 მილიონი წლის წინ, შუა მიოცენში, მცირე აზია, ბოსფორისა და მარმარილოს ზღვით გამოეყო ბალკანეთს და დაუკავშირდა თანამედროვე ირანს (სურ. 2) (Rögl, 1998).

სურ. 2. ხმელთაშუაზღვის რეგიონი და მცირე აზია შუა მიოცენი (15-10 მლნ წ.)



5-6 მილიონი წლის წინ, მიოცენის და პლიოცენის ზღვარზე, მკვეთრად იცვლება დედამიწის კლიმატი. იწყება ანტარქტიდის ყინულით დაფარვა (Dwyer et al., 2009). ნალექების შემცირებას თან სდევს ტროპიკული ტყეების გაქრობა ევრაზიის კონტინენტის დიდ ფართობებზე. აფრიკის კონტინენტზე ტყის დიდი ნაწილის ადგილს სავანა იკავებს (Hamilton & Taylor 1991; Bonnefille 1996). ვულკანური აქტივობა განაპირობებს წითელი ზღვის ფორმირებას და არაბეთის ნახევარკუნძულის ჩრდილო-აღმოსავლეთით გადანაცვლებას (Drake & Girdler 1964; Laughton 1966) (სურ. 1;2). გიბრალტარის სრუტე იხურება, იწყება გამშრალება, ევრაზიის სამხრეთით მცირდება ზღვის დონე და მცირე აზია ხმელეთით უკავშირდება თანამედროვე ევროპას. ეს პერიოდი “მესინის კრიზისის” სახელწოდებითაა ცნობილი (Harland et al., 1982; 1990; Krijgsman et al., 1999; Bulter et al., 1999 Duggen et al., 2003). კავკასია, რომელც მიოცენში კუნძული იყო, უკავშირდება ჯერ მცირე აზიას და შემდეგ აღმ. ევროპას (სურ. 3).

სურ. 3 კავკასიის და ხმელთაშუაზღვის რეგიონი მესინის კრიზისის დროს



(<http://jan.ucc.nau.edu/~rcb7/earmiomed.jpg>.)

ხმელეთის ხიდის წარმოქმნამ განაპირობა მცენარეთა და ცხოველთა ორმხრივი მიგრაცია ცენტრალურ და მცირე აზიასა და ევროპას შორის. თუმცა ტროპიკული

ტყეების შემცირება, რეფუგიუმების წარმოქმნა, ტენიან ჰაბიტატებში მობინადრე სახეობების გარცელების შემლუღვას განაპირობებდა (Tarkhnishvili 2000; 2008)

მოგვიანებით, პლიოცენის მეორე ნახევარში, 3 მლნ წლის წინ, დედამიწაზე გაიზარდა ტყის ფართობი, მაგრამ ახლო აღმოსავლეთის რეგიონის დიდი ნაწილი სტეპებით და ნახევარუდაბნოებით იყო დაფარული (Haywood et al., 2006; Voelker et al., 2010;). თანამედროვე დიდი კავკასიონის მთები დაუკავშირდა მცირე კავკასიონის მთებს და მცირე აზია სამხრეთ რუსეთის დაბლობიდან გამოყო (Roghl & Steininger 1984). კასპიის ზღვა ჩაკეტილ ტბად გადაიქცა. აქედან მოყოლებული რეგიონის ლანდშაფტი უმნიშვნელოდ იცვლებოდა.

პლეისტოცენში 2 მლნ წლის წინ, ტემპერატურა დაეცა. ჩრდილოეთ ამერიკის, ევროპისა და ციმბირის დიდი ფართობები ყინულით დაიფარა (Raymo et al., 1998; Bradley et al., 2003; Ravelo et al., 2004, Serebryanny et al., 1986 Sibrava et al., 1986). ტყეები მხოლოდ მდინარის ხეობებში შემორჩა. დროდადრო ტემპერატურა იწევდა, თოვლის საფარი უკან იხევდა და ტყის მასივებიც იზრდებოდა (Dolukhanov 1966). დათბობის პერიოდებს მოჰყვებოდა გამყინვარების ახალი ტალღები (Griffin 2002; Rea et al., 1998; Sollunias et al., 1999, Haywood et al., 2006). გამყინვარების დროს მცირე აზია უტყეო სივრცით იყო წარმოდგენილი (Adams et al., 1997). კავკასიის მთებში მობინადრე სახეობები იზოლირებულები იყვნენ ევროპაში გავრცელებული მათი ნათესავებისგან (Tarkhnishvili et al., 2000). გამყინვარების ბოლო ტალღა 12-15 ათასი წლის წინ დასრულდა. ამას მოჰყვა დათბობა და ტყის საფარის გავრცელება მცირე აზიაში (Dolukhanov 1966; Tarasov et al., 1998, Cornor & Kvavadze 2009). სწორედ ამან მისცა ბიძგი ძველი ცივილიზაციის განვითარებას ახლო აღმოსავლეთში (Kvavadze et al., 2009; Diamond 1997; Balanovsky et al., 2011).

ეს ნაშრომი ეძღვნება იმ საკითხების მიმოხილვას, თუ როგორ შეიძლება კვლევის მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდების გამოყენება კავკასიაში გავრცელებული ტაქსონების ევოლუციისა და სახეობათწარმოქმნის პროცესების შესწავლაში, პოპულაციების გენეტიკური პარამეტრების კვლევასა და ანალიზში. კვლევა ეფუძნება ცხოველების რამოდენიმე სახეობის კავკასიური პოპულაციების მოლეკულურ-გენეტიკურ ანალიზს. ეს სახეობები განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან არეალის ტიპით,

ზომით და გავრცელების უნარით, პოპულაციის ეფექტური რიცხოვნობებით, ოპტიმალური ჰაბიტატებით. კვლევის მიზანი იყო გვენახა, როგორ უკავშირდება სახეობის ბიოლოგიის თავისებურებები მის ისტორიულ წარსულს და პოპულაციის გენეტიკურ სტრუქტურას.

თავი 1 - ეხება მურა დათვის (*Ursus arctos*) ტაქსონომიისა და პოპულაციის გენეტიკური სტრუქტურის კვლევას. ჩვენი მიზანი იყო: დაგვედგინა როგორ მოხდა მურა დათვის ისტორიული განსახლება კავკასიაში, ქმნის თუ არა მურა დათვი გენეტიკურად და/ან გეოგრაფიულად იზოლირებულ ჯგუფებს კავკასიაში, როგორია გენეტიკური დისტანცია კავკასიისა და რეგიონის გარეთ გავრცელებულ მურა დათვის პოპულაციებს შორის. კვლევის შედეგად აღმოჩნდა, რომ კავკასიაში გავრცელებული მურა დათვი მიეკუთვნება ნომინალურ ქვესახეობას. დიდი კავკასიონის ჯგუფი მონოფილეტურია მდებრობითი ხაზით, დიდი და მცირე კავკასიონის პოპულაციები გაემიჯნენ ერთმანეთს უკანასკნელი გამყინვარების დროს; დიდი კავკასიონიდან მცირე კავკასიონზე, სავარაუდოდ ლიხის ქედის გავლით, ხდება მხოლოდ მამრი ინდივიდების მიგრაცია.

თავი 2- ში აღწერილია კავკასიის ხმელეთის ენდემური ლოკოკინების (*Helix buchi* და *H. goderdziana*) გავრცელება და სახეობათწარმოქმნა. ჩვენ გავაანალიზეთ ორივე სახეობის 59 ინდივიდის სინჯში მიტოქონდრიული დნმ-ს ფრაგმენტი და ბირთვული დნმ-ს ფრაგმენტი. კვლევაში გამოვიყენეთ ფართოდ გავრცელებული სახეობების *H. lucorum* და *H. pomatia* 13 სინჯი. მონაცემების ანალიზის შედეგად გამოვლინდა CO1-ის 11 განსხვავებული ჰაპლოტიპი. ფილოგენეტიკურმა ანალიზმა დაადასტურა *H. buchi*-ის და *H. goderdziana*-ს რეციპროკული მონოფილეტური წარმოშობა. ორივე სახეობის ბაზალური ჰაპლოტიპები გავრცელებულია იმ ტერიტორიაზე, რომელიც გამყინვარების დროს რეფუგიუმს წარმოადგენდა.

თავი 3: გენების ინტროგრესია *Gazella subgutturosa* და *G. marica*- შორის. ჩვენი მიზანი იყო დაგვედგინა შეიძლება თუ არა მხოლოდ მტ დნმ-ის ციტორქომ ბ გენის ანალიზით შევარჩიოთ სარეინტროდუქციო ინდივიდები. კვლევა ჩატარდა აზერბაიჯანიდან და აღმოსავლეთ თურქეთიდან მოპოვებულ 20 სინჯზე. მონაცემების ანალიზით აღმოჩნდა, რომ *Gazella subgutturosa* და *G. marica*-ს შორის მიმდინარეობს ბუნებრივი ჰიბრიდიზაცია, ამასთან ბუნებრივი ჰიბრიდები გარეგნულად *Gazella*

subguturosa-ს ჰგვანან. ჩვენი რეკომენდაციით შესაძლებელია, ვაშლოვანის ეროვნული პარკის ტერიტორიაზე თურქეთიდან სარეინტროდუქციოდ ჩამოყვანილ ინდივიდებს დაემატოს აზიურბაიჯანის შირვანის ეროვნული პარკიდან ჯეირნის ინდივიდები, მიუხედავად იმისა, რომ მათ განსხვავებული მატრილინეარული ჰაპლოტიპები აქვთ.

თავი 4: კავკასიის კლდის ხელიკების სახეობათწარმოქმნა აღწერილია *Darevskia "rudis"* კლადის სამი სახეობის: *D. rudis*, *D. valentini*, და *D. portschinskii*-ის მაგალითზე. ჩვენი მიზანი იყო გაგვეჩვენა ამ სამი სახეობის ევოლუციის სცენარი, დაგვედგინა მიმდინარეობს თუ არა გენების მიმოცვლა, გაგვეჩვენა გადარჩევის მექანიზმები და შეგვეფასებინა ჰიბრიდული ორგანიზმების გადარჩენის ალბათობა. მტ ღნმ-ს და ბღნმ-ს მიკროსატელიტური ლოკუსების კვლევამ აჩვენა, რომ პლეისტოცენში, გამყინვარების ტალღების დროს, ადგილი ჰქონდა იზოლაციას, ხოლო ინტერგლაციალში გენების ინტროგრესიას ნომინალურ სახეობებში. ინტროგრესია ნაკლებია იმ პოპულაციებში, რომლებიც კლიმატურად განსხვავებულ პირობებში ვრცელდება და გადარჩევა მიმართულია ჰიბრიდული ორგანიზმების სანაღმდეგოდ. კვლევამ აჩვენა რომ *portschinskii* განცალკევდა *rudis* -სგან უფრო ადრე, ვიდრე *valentini*. თუმცა გენების მიმოცვლა, მიუხედავად შედარებით ხანგრძლივი დივერგენციისა, უფრო ინტენსიურია *rudis*-სა და *portschinskii*-ს შორის ვიდრე *D. rudis* და *D. valentini*- შორის.

მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდების განვითარების მოკლე ისტორია

მე-20 საუკუნის შუა ხანებამდე სისტემატიკოსები, ორგანიზმთა ტაქსონომიის დასადგენად, ძირითადად სუბიექტურ კრიტერიუმებს იყენებდნენ (Huxley 1942). სიტუაცია მნიშვნელოვნად შეიცვალა ბოტანიკოსი ვალტერ ციმერმანის და ზოოლოგ ვილი ჰინიგის შრომების გამოქვეყნების შემდეგ (Zimmermann 1943; Hennig 1966). ევოლუციური ისტორიის რეკონსტრუქციისა და სახეობებს შორის ფილოგენეტიკური კავშირების დასადგენად მათ დაიწყეს ისეთი ნიშნების გამოყენება, რომელიც საერთო ჰქონდა თანამედროვე და ნამარხ ორგანიზმებს, დღეს არსებულ და მათ წინაპარ ტაქსონებს.

1990- იანი წლების დასაწყისიდან სახეობების მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევა ტაქსონომიის დადგენისა და კონსერვაციული ღონისძიებების დაგეგმვის აუცილებელი კომპონენტია (Frankham et al. 2000). გენეტიკური მონაცემებით ხდება შერჩეული ჯგუფის ტაქსონომიის დაზუსტება, წარმოშობით ახლოს მგომი პოპულაციების ან მაღალი ტაქსონების გამოვლენა, გენების მიმოცვლის დადგენა და ამ მიმოცვლის ინტენსივობის შეფასება, განსაზღვრა რამდენად მდიდარია პოპულაციის გენოფონდი ანუ რამდენად მაღალია პოპულაციის უნარი შეეგუოს მუდმივად ცვალებად გარემო პირობებს. ზუსტი მექანიზმი, რომელიც განაპირობებს გენების მიმოცვლას, ადაპტაციას და სახეობის გენეტიკურ სტრუქტურირებას დღემდე მეცნიერთა კვლევის საგანს წარმოადგენს. გენეტიკური მრავალფეროვნების კვლევა წარმოადგენს ფუნდამენტს ბიომრავალფეროვნების შესწავლის, დაცვითი ღონისძიებებისა და ეფექტური მენეჯმენტის განსახორციელებლად (Frankham 2005).

მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის თანამედროვე მეთოდები

ცოცხალი ორგანიზმების მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის მეთოდები სხვადასხვა პრინციპებით კატეგორიზდება. ერთი ჯგუფი აერთიანებს იმ მეთოდებს, რომლითაც დნმ-ს შესწავლა არაპირდაპირ ხდება, მაგალითად პროტეინების ელექტროფორეზი და მეორე დნმ-ს შესწავლის პირდაპირ მეთოდები, როგორცაა დნმ-ს ცალკეული ფრაგმენტების სექვენირება. არსებობს მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდების დაყოფის სხვა სისტემაც, კოდომინანტური მარკერები, როცა შესაძლებელია ორგანიზმის ორივე ალელის შესწავლა (მიკროსატელიტური ლოკუსები) და დომინანტური მარკერები, რომელთა მეშვეობით ერთი ლოკუსის სხვადასხვა ალელების კვლევა არ ხდება. ქვემოთ განხილულია მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის ის ძირითადი მეთოდები, მათი ნაკლი და უპირატესობები, რომლებიც გამოიყენება ეკოლოგიურ და ევოლუციურ კვლევებში.

პროტეინების ელექტროფორეზი

გასული საუკუნის 50-იან წლებში ევოლუციურ და პოპულაციურ-გენეტიკურ კვლევებში პროტეინების ელექტროფორეზს-გელის საშუალებით (Smitheis 1955) და ენზიმების ჰისტოქიმიური ვიზუალიზაციას (Hunter & Markert 1957; Harris 1966; Harris&Hopkinson 1976) იყენებდნენ. პროტეინებში ელექტრული მუხტის არსებობა უდევს საფუძვლად ელექტროფორეზის გამოყენებას მათი იდენტიფიცირების მიზნით. ამ მეთოდის უპირატესობა, სხვასთან შედარებით იმაშია, რომ არ მოითხოვს დიდ ფინანსურ დანახარჯებს, შედეგი სწრაფად მიიღება, ხოლო ნაკლად ითვლება ის რომ: ლეთალურია ცხოველური ორგანიზმებისთვის, (Weeden & Wendel, 1989, Crawford 1990). ახასიათებს დაბალი პოლიმორფიზმი. (Nei 2000; Opperdoes 2009; McLuaghin & Dayhoff 1973). შეუძლებელია დნმ-ს სინონიმური მუტაციების გამოვლენა. არაგენეტიკური ვარიაციის არსებობა ართულებს პროტეინების იდენტიფიცირებას (Feiden 1963; Hernandez_juvel et al., 1992)

მოლეკულური ციტოგენეტიკა -კარიოსისტემატიკა

ქრომოსომული მემკვიდრეობის თეორია განვითარდა მე-19 საუკუნის პირველ ნახევარში Sutton 1903; Morgan 1926). გასული საუკუნის 70 -იან წლებში ცოცხალი ორგანიზმების სისტემატიკურ კვლევებში კარიოსისტემატიკის მეთოდების გამოყენება პოპულარული იყო, რადგან ამ დროისთვის დაიხვეწა ჰომოლოგიური ქრომოსომების იდენტიფიცირების, ნუკლეინის მჟავების ინ-სიტუ ჰიბრიდიზაციის (Hsu 1979; Macgregor 1993) და ქრომოსომის ფრაგმენტების რადიო აქტიური იზოტოპებით შესწავლის მეთოდები (Sasavage 1992; Luke&Verma 1993, Therman 1993; Susman 1993).

ჰომოლოგიურ ქრომოსომებს შორის განსხვავება დადებითად კორელირებს ტაქსონებს შორის არსებულ გენეტიკურ მანძილთან (King 1993; Sites&Moritz 1987;) ციტოგენეტიკური კვლევების განვითარებამ ხელი შეუწყო ქრომოსომული მუტაციების და ამით გამოწვეული დაავადებების დიაგნოსტიკას.

დნმ-დნმ ჰიბრიდიზაცია

დნმ-დნმ ჰიბრიდიზაციის დროს წარმოქმნილი ჰომო - და ჰეტეროდუპლექსებს შორის ლღობის ტემპერატურის (ΔT_m) სხვაობა საფუძვლად უდევს სახეობათა სისტემატიკურ კვლევებს (Britten 1986; Kirsch et al., 1990; Sarich et al., 1989). მიუხედავად იმისა რომ, გასული საუკუნის 90-იან წლებში, დნმ-დნმ ჰიბრიდიზაციის მეთოდმა ფრინველთა (Sheldon 1987; Krajewski 1989, Krajewski & Dickerman 1990; Sybley & Ahlquist 1986, 1990) და ძუძუმწოვართა (Bledsoe 1987; Kirsch et al., 1991; Springer et al., 1992) სახეობების ტაქსონომიის დადგენაში დიდი როლი ითამაშა, დღესდღეობით ამ მეთოდს სულ უფრო ნაკლებად იყენებენ (Avisé 2004). მაღალი შიდასახეობრივი პოლიმორფიზმი და ამით გამოწვეული ჰეტეროდუპლექსების არსებობა გენომში ართულებს ზუსტი ფილოგენეტიკური კავშირების დადგენას ახლომონათესავე სახეობებში. ლაბორატორიული კვლევა ძვირია: საჭიროა დნმ-ს დიდი რაოდენობა (რამოდენიმე მილიგრამი) და რადიოაქტიური იზოტოპები.

დნმ-ს ფრაგმენტების რესტრიქტაზული ანალიზი (RFLP)

რესტრიქტაზული ენდონუკლეაზების აღმოჩენამ (Linn&Arber 1968) მნიშვნელოვანი გარდატეხა მოახდინა მოლეკულურ ბიოლოგიური კვლევებში. დნმ-ს RFLP ანალიზს ორი განსხვავებული მიდგომა აქვს: რესტრიქტაზული ენდონუკლეაზებით დაჭრილი დნმ-ს ჰომოლოგიური ფრაგმენტების სიგრძის შედარება და დნმ-ს იმ საიტების ადგილმდებარეობების შედარება სადაც რესტრიქტაზული ენდონუკლეაზები მოქმედებენ (Roberts&Macelis 1993). 1970-იანი წლებიდან 1990 წლამდე, სანამ სექვენირების მეთოდი დაიხვეწებოდა, ტაქსონების ფილოგენეტიკური კვლევები მტ დნმ-ს RFLP ანალიზით ხდებოდა (Jones et al., 1988; Palva & Palva 1985;). რესტრიქტაზული ენდონუკლეაზები ლოკუს სპეციფიკურია და დნმ-ს კოდომინანტური მარკერია.

ჯაჭვური პოლიმერაზას რეაქცია (პჯრ)

უჯრედების გაყოფას წინ უსწრებს დნმ-ს ახალი ჯაჭვის სინთეზი - უკვე არსებულის გაორმაგება. 1971 წელს ხორანა (Khorana et al., 1971) და მისი კოლეგების მიერ გამოითქვა ვარაუდი რომ დნმ-ს ორმაგი ჯაჭვის სინთეზი შესაძლებელია ხელოვნურად, რეაქციაში ოლიგონუკლეოტიდებისგან შემდგარი მოკლე ფრაგმენტების გამოყენებით. მოგვიანებით, კარი მულისმა დაადასტურა ამ ვარაუდის არსებობა, მიიღო რა პირველი ხელოვნურად სინთეზირებული დნმ-ს ფრაგმენტი (Mullis 1990). ჯაჭვური პოლიმერაზას რეაქციის (პჯრ) მეთოდის სიძლიერე მდგომარეობს იმაში, რომ შესაძლებელია დნმ-ს ფრაგმენტების ამპლიფიცირება (გამრავლება) მიუხედავად იმისა, თუ რა ქსოვილიდანაა კენთი, ლორწო, ნერწყვი, ბენვი, ექსკრემენტი, შარდი) გამოყოფილი დნმ-ი (Innis et al., 1990; Palumbi et al., 1991). პჯრ შედგება სამი ძირითადი ეტაპისგან: ორმაგი ჯაჭვის დენატურაცია, რომელიც მაღალი ტემპერატურით (92°C - 95°C) მიიღწევა; პრაიმერების დაკავშირება და ელონგაცია - დნმ-ს ახალი ფრაგმენტის სინთეზი.

ჯაჭვური პოლიმერაზას რეაქციის წარმატებისთვის აუცილებელია ქიმიური რეაქტივების ოპტიმალური კონცენტრაცია. ეს არ ნიშნავს იმას, რომ არსებობს ერთადერთი უნივერსალური რეცეპტი. რეაქციის წარმატება ქიმიური კომპონენტების სხვადასხვა ნარევით მიიღება.

ჯაჭვური პოლიმერაზას რეაქციის ძირითადი კომპონენტებია: ექსტრაგირებული დნმ, მაგნიუმის იონები (Mg^{2+}); დებოქსიზირებული ნუკლეოტიდები (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); სინთეზირებული ოლიგონუკლეოტიდები (პრაიმერები); თერმოსტაბილური ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა; PCR ბუფერი და წყალი.

თერმოსტაბილური ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა მიიღეს თერმოფილური ბაქტერია *Thermus aquaticus* (სანყისი ასოები წარმოადგენს ამ ენზიმის აბრევიატურას (Tag DNA) და პირველად 1969 წელს აღწერეს (Brock & Freeze 1969). დასაწყისში ეს ენზიმი არ იყო პოპულარული, მოგვიანებით, კვლევებში პჯრ მეთოდების გამოყენებამ განაპირობა ამ ენზიმის პოპულარობა. ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა წარმოადგენს 94 kDa

ზომის პროტეინს, მისი ნახევარდაშლის პერიოდი 40 წთ-ია 95°C-ზე, რაც შეესაბამება 50 ციკლს ჯაჭვურ პოლიმერაზას რეაქციაში (McPherson&Moller 2006). ახასიათებს ორი სახის კატალიზური აქტივობა:

1) 5'→3' დნმ პოლიმერაზული - ანუ აწარმოებს დნმ-ს მატრიცულ სინთეზს. ამ პროცესის აქტიურობა ოპტიმალურია 72-75°C-ზე, ხოლო სიჩქარე 50-60 ნუკლეოტიდი წმ⁻¹-ში.

2) 5'→3' ეგზონუკლეაზური ანუ დნმ-ის დაბოლოებიდან აპიდროლიზებს ფოსფოდიეთერულ ბმებს.

სტანდარტული ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა, როგორც წესი, აკატალიზებს დნმ-ს მატრიცულ სინთეზს 5'→3' მიმართულებით. ზოგიერთ ტაგ-დნმ-პოლიმერაზას 3'→5' მიმართულებითაც ახასიათებს ეგზონუკლეაზური აქტივობა. ამ თვისების გამო, ასეთი ტიპის ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა, გამოიყენება როგორც ე.წ. „მაკონტროლებელი“. თუ PCR რეაქციაში ახალი დნმ-ს ფრაგმენტის სინთეზისას, შემთხვევითად არასწორად მოხდა ნუკლეოტიდის დაკავშირება, მაშინ „მაკონტროლებელი“ ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა „ასწორებს“ დაშვებულ შეცდომას. ცხადია, იმ ტაგ-დნმ-პოლიმერაზას მოქმედება, რომელსაც ორივე მიმართულების ეგზონუკლეაზური აქტივობა გააჩნია, ბევრად ეფექტურია. ტაგ-დნმ-პოლიმერაზას ეფექტურობას კიდევ ერთი ფაქტორი განაპირობებს- ესაა დნმ-ს ფრაგმენტის სინთეზის სიჩქარე. რეაქციის ელონგაციის ეტაპზე, ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა ასოცირდება დნმ-ს მოლეკულასთან იწყება ახალი დნმ-ს ფრაგმენტის სინთეზი, ზოგჯერ ადგილი აქვს ამ ასოციაციის დაშლას, ტაგ-დნმ-პოლიმერაზა შორდება დნმ-ს მოლეკულას და სინთეზი ფერხდება. შესაბამისად, იზომება ენზიმის სინთეზის სიჩქარე- ამპლიფიცირებული ნუკლეოტიდების რაოდენობა დროის ერთეულში (10 წმ⁻¹, 50 წმ⁻¹, 100 წმ⁻¹).

მაგნიუმის იონები (Mg²⁺) - წარმოადგენს პჯრ-ს კოფაქტორს, უშუალოდ არ მონაწილეობს სინთეზის რეაქციაში. მისი ოპტიმალური რაოდენობა მერყეობს 0.5-3 mM. Mg²⁺-ის კონცენტრაცია სარეაქციო არეში სინთეზამდე და სინთეზის შემდეგ არ იცვლება.

ოლიგონუკლეოტიდები (პრაიმერები) - 6-25 ნუკლეოტიდისგან შედგენილი, ხელოვნური სინთეზის გზით მიღებული ფრაგმენტი. პრაიმერი წარმოადგენს დნმ-ს

ამპლიფიკაციების სასტარტო ადგილს. პრაიმერების სიგრძე დამოკიდებულია საკვლევი დნმ-ს სიგრძეზე და მის პოლიმორფიზმზე. რაც უფრო გრძელია ოლიგონუკლეოტიდები მით უფრო ფრაგმენტსპეციფიურია და პირიქით. თუ ცნობილია შესასწავლი დნმ-ს ფრაგმენტის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა შესაძლებელია პრაიმერების ხელოვნური სინთეზი ან არსებული პრაიმერების დიზაინი. ოლიგონუკლეოტიდები კომპლემენტარობის პრინციპით, წყალბადური ბმით უკავშირდებიან დნმ-ს ერთჯაჭვიან მოლეკულას. პჯრ რეაქციის წარმატებისთვის არ არის აუცილებელი საკვლევი დნმ-ს ფრაგმენტისა და პრაიმერების ზუსტი თანხვედრა. გრძელი 25 და მეტი ნუკლეოტიდისგან შემდგარი პრაიმერების შემთხვევაში დასაშვებია 6-10 ნუკლეოტიდის არაკომპლემენტარულობა. ამ შემთხვევაში ამპლიფიკირდება დნმ-ს რამოდენიმე ფრაგმენტი.

დებოქსიზირებული ნუკლეოტიდები (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, dUTP) OH ჯგუფის არქონის გამო, ერთმანეთს კოვალენტური ბმებით უკავშირდებიან. ახალი ჯაჭვის სინთეზი ხდება საკვლევი დნმ- ფრაგმენტის კომპლემენტარობის პრინციპით. PCR რეაქციაში მნიშვნელოვანია ნუკლეოტიდები იყოს ექვიმოლარული კონცენტრაციით და არ აღემატებოდეს 50-200 μM . დებოქსიზირებული ნუკლეოტიდების მაღალი კონცენტრაცია აფერხებს ტაგ-პოლიმერაზას მუშაობას, ხოლო დაბალი კონცენტრაცია ამცირებს ამპლიფიკირებული ფრაგმენტის რაოდენობას. ზოგადი PCR-პროტოკოლის მიხედვით რეკომენდირებულია 200 μM -ის ოდენობით თითოეული ნუკლეოტიდის გამოყენება. ეს შესაძლებლობას იძლევა რეაქციის წარმატებით დასრულების შემდეგ მიიღოთ 10 μg ამპლიფიკირებული პრდუქტი.

შემთხვევითად ამპლიფიკირებული დნმ-ს პოლიმორფული ფრაგმენტები RAPD

შემთხვევითად ამპლიფიკირებული დნმ-ს პოლიმორფული ფრაგმენტების RAPD ანალიზი, პჯრ-ზე დაფუძნებული ერთ-ერთი მეთოდია. არის დნმ-ს კვლევის ე.წ ბრმა მეთოდი, ანუ არაა ლოკუს სპეციფიკური და მთელს გენომს მოიცავს (Williams et al.,

1990). ამ დროს შესაძლებელია დნმ-ს ფრაგმენტების ამპლიფიცირება იმ შემთხვევაშიც, თუ პრაიმერის დაკავშირების ადგილას არსებობს მუტაციები (Hardys et al., 1992; Black 1993; Ellsworth et al., 1993). რეაქციაში გამოიყენება მოკლე პრაიმერები (6-12 ნ) და პჯრ რეაქციის პრაიმერის დაკავშირების ეტაპის დაბალი ტემპერატურა. RAPD-ის მეთოდით დნმ-ს ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების დადგენა არ ხდება და გამოიყენებოდა პოპულაციურ კვლევებში (Hardys et al., 1992; Hedrick 1996). ამ მეთოდის პოპულარობა შემცირდა დნმ-ს მიკროსატელიტური კვლევების მეთოდის დახვეწის გამო (Ritland 2000).

ცვალებადი მოკლე ტანდემური განმეორებები (მინისატელიტები)

ვარიანტული მოკლე ტანდემური განმეორებები (მინისატელიტები) წარმოადგენს დნმ-ს ფრაგმენტს, რომელიც შედგება 10-40 ნუკლეოტიდისგან და ეს ფრაგმენტი გენომში რამოდენიმე ათეულჯერ მეორდება (Armour & Jeffreys 1992; Bruford et al., 1992). მინისატელიტების რაოდენობა განსხვავებულია სხვადასხვა ორგანიზმსა და ქრომოსომაში (Shriver et al., 1993.) მინისატელიტები არ აკოდირებს ამინომჟავებს და შესაბამისად, ნეიტრალურია ბუნებრივი გადარჩევის თვალსაზრისით. მუტაციის მაღალი სიჩქარე (Jeffreys et al., 1988; Vergnaud & Denoeud 2000,) და ნეიტრალურობა იწვევს ალელების მაღალი რიცხვის არსებობას გენომში. ჰომო და ჰეტეროზიგოტული ალელების იდენტიფიცირება ფრაგმენტის სიგრძის მიხედვით ხდება, ორგანიზმებში ალელების შედარებით ადგენენ შედარებით ახლო წარსულში მომხდარ გენეტიკურ პარამეტრებს (მიგრაცია, დრეიფი.). ამპლიფიცირებული პროდუქტის ვიზუალიზაცია ხდება მაღალი რეზოლუციის გელის ელექტროფორეზის სისტემებით.

მოკლე ტანდემური განმეორებები (მიკროსატელიტური ლოკუსები)

1972 წელს ოჰნომ გამოთქვა ვარაუდი რომ ეუკარიოტული ორგანიზმების დნმ შეიცავს ისეთ ფრაგმენტებს, რომელთა ტრანლიაცია არ ხდება (Ohno 1972). სხვადასხვა

ორგანიზმში ეს ციფრი ვარირებს მაგრამ ძირითადად მხოლოდ დნმ-ს 2% აკოდირებს ამინომჟავებს.

მოკლე ტანდემური განმეორებები ანუ მიკროსატელიტები- წარმოადგენს დნმს ფრაგმენტებს, რომელიც შედგება 1-6 მრავალგანმეორებადი ნუკლეოტიდისგან. შესაბამისად, მათ მონო (G)_n, დი (TA)_n, ტრი (CAT), ტეტრა (ATGC)_n ან პენტა (TGACA)_n და ჰექსა (TAGGCA)_n ნუკლეოტიდებს უწოდებენ (Taurz 1989; Weber & May 1989; Queller et al., 1993). მიკროსატელიტებს ეძახიან დნმ-ს მარტივ განმეორებებს (simple sequence repeats (SSR) (Stafne et al., 2005), ვარიაბელურ ტანდემურ განმეორებებს variable number tandem repeats (VNTR) და მოკლე ტანდემურ განმეორებებს short tandem repeats (STR) (Selkoe & Toonen 2006). მიკროსატელიტურ ჩანართებში განმეორებადი ერთეულის n რაოდენობა ვარირებს 10-დან რამოდენიმე ასეულამდე. დი, ტრი და ტეტრანუკლეოტიდური განმეორებები უფრო ხშირად გამოიყენება მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევებში (Li et al., 2002; Ellegren 2004). პენტა და ჰექსა ნუკლეოტიდური განმეორებები ხშირად კოდირებად უბნებშია განლაგებული (Toth et al., 2000). ხოლო მონონუკლეოტიდური განმეორებების ამპლიფიცირება პრობლემურია (Li et al., 2002). მოკლე ტანდემური განმეორებების წინ, როგორც წესი, კონსერვატული დნმ-ს ფრაგმენტია განლაგებული და სწორედ ეს წარმოადგენს მიკროსატელიტური ლოკუსების პრაიმერ-საიტს. მიკროსატელიტები კოდომინანტური მარკერებია. კვლევებისას გამოიყენება ფლუორესცენტული ოლიგონუკლეოტიდური პრაიმერები. ალელების იდენტიფიცირება რეზოლუციის გელის ელექტროფორეზის სისტემებით ხდება.

მიკროსატელიტები ვერსატილური მოლეკულური მარკერებია, მაღალი პოლიმორფულობის (Eisen 1999; Schlötterer et al., 1999) და ნეიტრალურობის გამო გამოიყენება პოპულაციურ-გენეტიკურ კვლევებში (Culver et al., 2008; Loxterman 2011; Wu et al., 2009) ინდივიდებისა იდენტიფიცირებასა (Dakin & Avise JC (2004). Wang 2004) სქესის დადგენაში (Khorozyan et al., 2011) და ბიოსამედიცინო დიაგნოსტიკებაში (Bruford & Wayne 1993).

ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობების წაკითხვა - სექვენირება

უკანასკნელი სამი ათეული წლის განმავლობაში ცოცხალი ორგანიზმების ფილოგენეტიკურ კვლევებში ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობის წაკითხვა - სექვენირება ყველაზე პოპულარული მეთოდია (Sanderson et al., 1993). სექვენირების პოპულარობა რამოდენიმე ფაქტორმა განაპირობა: 1) ნუკლეოტიდები წარმოადგენს ცოცხალი ორგანიზმების გენეტიკური ინფორმაციის პირველად, საბაზისო წყაროს; 2) მოლეკულური ევოლუციის შესწავლა ადვილია (Goldman 1993; 3) არსებობს ღნმ-ს ევოლუციის მოდელები (Fitch 1966, Fitch & Margoliash 1967; Yanh et al., 1993; Jukes & Cantor 1969; Kimura 1980. 4) გაიაფდა და გაადვილდა სექვენირების პროცესი. 5) არსებობს ნუკლეინის მუჟავების მუდმივად განახლებადი მონაცემთა ბაზები (Genebank;), საიდანაც შესაძლებელია ზოგიერთ შემთხვევაში მთლიანი გენომის შესახებ ინფორმაციის მიღება და ან ცალკეული ფრაგმენტების ნუკლეოტიდური შემადგენლობების უფასოდ ჩამოტვირთვა (Benson et al., 2009). დღეისათვის, ეს მონაცემთა ბაზა 200 მილიონამდე ღნმს- ფრაგმენტს მოიცავს.

სექვენირების მეთოდები მეცნიერთა ორმა ჯგუფმა - (Maxam & Gibert 1977) და (Sanger et al., 1977) ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად და ერთდოულად გამოაქვეყნა. მაქსამ-გიბერტის მეთოდით ღნმს სექვენირებისას საჭიროა ღნმ-ს 5' ბოლოს რადიოაქტიური ფოსფორით ^{32}P მონიშვნა. რეაქციის შემდეგ ეტაპზე ღნმ-ს ფრაგმენტი იშლება ნუკლეოტიდებად შემდეგი სქემით G, A+G, C, C+T. ადენინისა და გუანინის დეპურიზაცია ხდება ჭიანჭველმუჟავით, შემდეგ ამ ნუკლეოტიდების მეთილირებას ახდენენ დიმეთილსულფატით. პირიმიდინის ფუძეების (ციტოზინის და თიმინის) დაშლისთვის გამოიყენება დიამიდი, დიამიდი აინჰიბირებს თიმინის მეთილირებას თუ მას მოსდევს ციტოზინი. შემდეგ ეტაპზე მოდიფიცირებული ღნმ-ს ფუძეები ცხელდება ჰეტეროციკლურ ამინთან ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}$) ერთად. ამ რეაქციების დასრულების შემდეგ, მიიღება ღნმ-ს ფრაგმენტები, რომელიც მოდიფიცირებულ ფუძეებს შეიცავს, ხოლო ელექტროფორეზით ხდება ფრაგმენტების ზომის მიხედვით იდენტიფიცირება. რადიოაქტიური ნივთიერებებით კი რენდგენის ფირზე აღბეჭდვა და შემდეგ ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობის წაკითხვა (Miyamoto & Cracraft 1991). 1980 წლებში

ეს მეთოდი საკმაოდ პოპულარული იყო (Ansorge & Barker 1984; Elder et al., 1986; Frank et al., 1988).

ლაბორატორიების დიდი უმეტესობა დღეს სანგერის (Sanger et al., 1977) მეთოდს იყენებს. ამ რეაქციაში არ გამოიყენება რადიოაქტიური და ტოქსიკური ნივთიერებები. ამ მეთოდის მთავარი მიგნება იყო სექვენირების რეაქციაში დიდოქსინუკლეოტიდების გამოყენება, რომელიც განაპირობებს სექვენირების რეაქციის შეწყვეტას. კერძოდ, სექვენირების რეაქციაში გამოიყენება ამპლიფიცირებული დნმ-ს ფრაგმენტი (ჰჯრ პროდუქტი), მხოლოდ ერთი მიმართულების პრაიმერი და დეოქსიზირებული ნუკლეოტიდები (dNTPs) და ფლუორესცენტულად ან რადიოაქტიულად მარკირებული დიდოქსინუკლეოტიდები (dideoxynTPs). სექვენირების რეაქცია ციკლურია და ჰგავს ჰჯრ-ს. იწყება დენატურაციით, შემდეგ ხდება პრაიმერის მიმაგრება და დეოქსიზირებული ნუკლეოტიდებით ახალი, ძველი ჯაჭვის კომპლემენტარული, ჯაჭვის სინთეზი. სექვენირებაში მონაწილე პრაიმერს, რიბოზაზე აქვს თავისუფალი 3' – OH ჯგუფი ანუ დეოქსიზირებულია. ისევე როგორც დეოქსიზირებულ ნუკლეოტიდებს (dNTPs). რის გამოც, dNTP-ები ფოსფორილაციის ბმით უკავშირდებიან პრაიმერს და მეორე, ასეთივე დეოქსიზირებულ ნუკლეოტიდს. ასე ხდება ჯაჭვის სინთეზი. აქაც, რეაქციაში მონაწილეობს დნმ-პოლიმერაზა. ხოლო დიდოქსინუკლეოტიდებს არ გააჩნია ნახშირწყლოვან ფუძის 2' და 3' ჯგუფი. თუ სექვენირების რეაქციაში ასეთი დიდოქსიზირებული ნუკლეოტიდი მოხვდა, ჯაჭვის სინთეზი წყდება. სექვენირების რეაქციაში დიდოქსინუკლეოტიდები 1:50 პროპორციით გამოიყენება. რეაქციის დასრულების შემდეგ ხდება მიღებული პროდუქტების მაღალი რეზოლუციის გელზე გაშვება და ფრაგმენტების ელექტროფორეზით განცალკევება. ამისთვის გამოიყენებოდა როგორც რენდგენის, ისე ფოტო ქაღალდი.

განსხვავება მაქსამ-გიბერტისა და სანგერის მეთოდებს შორის შემდეგია: სანგერის მეთოდით შეიძლება როგორც დნმ-ის ისე რნმ-ის ფრაგმენტების სექვენირება, მაშინ როცა მაქსამ-გიბერტის მეთოდით რნმ-ს ფრაგმენტის სექვენირება არ ხდება და თანაც, ამ მეთოდის გამოყენებისას აუცილებელია წინასწარ იყოს ცნობილი საკვლევი დნმ-ს რესტრიქტაზული რუკა, რადგან საჭიროა დნმ-ს ფრაგმენტების დაჭრა მცირე ზომის ფრაგმენტებად. სანგერის მეთოდის უპირატესობა სწორედ ამაშია, რომ დნმ-ს

ფრაგმენტის ნუკლეოტიდური შემადგენლობის წინასწარ ცოდნა არ არის საჭირო, აქ მხოლოდ პრაიმერის მიმაგრების საიტის ადგილის შესახებ ინფორმაციის არსებობაა აუცილებელი. ერთადერთი უპირატესობა რაც მაქსამ-გიბერტის მეთოდს გააჩნია არის ის, რომ დნმ-ს მეორეული სტრუქტურის არსებობის შემთხვევაში ვერ ხერხდება სექვენირების პროცესი, ამ დროს აუცილებელია დნმ-ს ქიმიური დაშლა მაქსამ-გიბერტისვე მეთოდით.

დღესდღეობით, დნმ-ს სექვენირებისთვის რადიაქტიური ნივთიერებები არ გამოიყენება. სექვენირების ავტომატური გენეტიკური ანალიზატორის მუშაობის პრინციპი ეფუძნება სანგერის მეთოდს (Sanger et al., 1977), ფლუორესცენტლად მონიშნულ დიდეოქსინუკლეოტიდებს განსხვავებული ტალღის სიგრძე აქვთ. დნმ-ს ფრაგმენტების კაპილარული ელექტროფორეზის სისტემაში გავლის შემდეგ ფლუორესცენტლად მონიშნულ დიდეოქსინუკლეოტიდების იდენტიფიცირება ლაზერის მეშვეობით ხდება. პროცესი ავტომატურია და არ არის საჭირო ავტორადიოგრაფზე ფრაგმენტების წაკითხვა. სექვენირების შედეგები ქრომატოგრამის სახით იწერება კომპიუტერში და სპეციალური პროგრამული უზრუნველყოფით (Sequencing Analysis) ხდება მიღებული ინფორმაციის წაკითხვა, რამაც სექვენირების პროცესი მნიშვნელოვნად გაამრთივა.

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის მოლეკულარ- გენეტიკური ლაბორატორია

2008 წელს, ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტისა და ფონდების CRDF, GNSF, AvH ერთობლივი ძალისხმევით, ბიომრავალფეროვნების კვლევის ცენტრში შეიქმნა და ტექნიკურად აღიჭურვა ლაბორატორია, სადაც სხვა კვლევებთან ერთად წარმატებით მიმდინარეობს ევოლუციური და პოპულაციურ-გენეტიკური კვლევები. ლაბორატორიაში არსებობს ინსტრუმენტები: გენეტიკური ანალიზატორი ABI 3130, თერმოციკლერი, მიკროცენტრიფუგები, ინკუბატორები, ავტოკლავი, გელის ელექტროფორეზის სისტემები, ულტრაიისფერი სხივების წყარო და გელის ფოტოდოკუმენტირების სისტემა, საყინულები და სხვ. კვლევისთვის საჭირო რეაქტივები და სახარჯი მასალა: - განსხვავებული მოცულობის პიპეტები, სინჯარები, მენზურები და ა.შ, რომლებიც შეესაბამება თანამედროვე სტანდარტებს, უსაფრთხოა ჯანმრთელობისთვის და აკმაყოფილებს მწარმოებლის მიერ მოთხოვნილ პარამეტრებს.

ყოველი კვლევის ცალკეული ამოცანის შესაბამისად, იცვლება როგორც ლაბორატორიული მეთოდები, ისე ანალიზისთვის საჭირო ალგორითმები. თუმცა ძირითადი კომპონენტები, როგორიცაა: სინჯების მოგროვება და შენახვა, დნმ-ს ექსტრაქცია, პოლიმერაზ-ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ), სექვენირება, მიკროსატელიტური ალელების იდენტიფიცირება, მიღებული შედეგების პირველადი ანალიზი მეტ-ნაკლებად მსგავსია ჩვენს მიერ ჩატარებულ კვლევებში.

კვლევის მიმდინარეობის ყველა ეტაპზე მჭიდროდ ვთანამშრომლობთ სამთავრობო და არასამთავრობო უწყებებთან, სამეცნიერო-კვლევით ინსტიტუტებთან, ქართველ და უცხოელ ექსპერტებთან და ადგილობრივ მოსახლეობასთან.

სინჯების მოგროვება. თითოეული ტაქსონის არეალის ფარგლებში ლიტერატურული მონაცემების, ჩვენი და ჩვენი კოლეგების წინასწარი დაკვირვებების, მოსახლეობის გამოკითხვის და ადგილის ტოპოლოგიის გათვალისწინებით ირჩევა ის ტერიტორიები, საიდანაც, საველე კვლევების დროს, სინჯები უნდა მოგროვდეს.

სინჯების მოგროვებისას, თითოეული გეოგრაფიული ლოკალიტეტიდან ნიმუშების რეპრეზენტატულ რაოდენობას ვიღებთ. იშვიათი და გადაშენების საფრთხეში მყოფი ცხოველების (დათვი, ჯეირანი) კვლევისას ვცდილობთ, სინჯები შევაგროვოთ ისე, რომ მინიმუმამდე იქნას შემცირებული ცხოველების შეწუხების ფაქტორი - ვაგროვებთ ექსკრემენტებს, ბენჯებს, დახოცილი ცხოველების ქსოვილების (კუნთი, ტყავი, სისხლი) ნაწილებს, ნიმუშებს სამუზეუმო ექსპონატებიდან და კერძო კოლექციებიდან.

ყოველი სინჯის მოგროვებისას არ ხდება სინჯების არევა და კონტამინაცია. საველე კვლევების დროს ექსკრემენტების შეგროვებისას გამოიყენება ერთჯერადი ხელთათმანები. სუფთა ჯოხით ან ტოტით ვიღებთ ექსკრემენტის ნაწილებს და ვათავსებთ სინჯარაში, რომელშიც არის 70% სპირტი 1(სინჯი)/3(სპირტი) პროპორციით. გამოყენებულ ხელთათმანს ვინახავთ ცალკე. ქსოვილების შეგროვებისას, დანა, მაკრატელი ან სკაპელი, რითიც მოიჭრა ქსოვილის ნიმუში, ყოველი გამოყენების წინ დეზინფიცირდება.

კლდის ხვლიკების მონაცემების მოგროვებისას, ყოველ დაჭერილ ინდივიდს ვუღებთ ფოტოს, სახეობის იდენტიფიცირებისთვის ვიყენებთ ტაქსონომიურ ნიშნებს. თავისა და ანალური ხვრელის ქერცლების გამოსახულებს ვიყენებთ მორფომეტრული ანალიზისთვის, ხოლო გენეტიკური კვლევებისთვის ვიყენებთ კუდის ნაწილს. ამის შემდეგ ცოცხალ ინდივიდებს ვუშვებთ ბუნებაში.

ხმელეთის ლოკოკინების სინჯების შეგროვებისას, სამუხაროდ, გვიხდება ინდივიდების დახოცვა, რადგან ლოკოკინების ტაქსონომიის დადგენა გენიტალიების მორფოლოგიური ანალიზით ხდება, ამასთან, ნიჟარის მორფომეტრული კვლევისთვის საჭიროა ნიჟარას მოშორდეს რბილი ქსოვილები, რაც ლეტალურია ცხოველებისთვის.

ყველა სინჯი ინომრება და კატალოგიზირდება. შექმნილია სინჯების მონაცემთა ბაზა, სადაც შეტანილია ყველა ნიმუშის ნომერი, ადგილის კოორდინატი, მოპოვების და/ან მოკვლის თარიღი, ინდივიდის ასაკი (თუ არის შესაძლებლობა), ჰაბიტატი, შემგროვებლის ვინაობა, ზოგიერთ სინჯს თან ერთვის ინდივიდის ფოტოც. მშრალი სინჯები - ტყავები, ბენჯები ინახება ქალაქის კონვერტებში ან პოლიეთილენის პარკებში. ხოლო ქსოვილის სინჯები 70% სპირტში.

დნმ-ს ექსტრაქცია და პჯრ. დნმ-ს ექსტრაქციის დროს ვიყენებთ ფირმა QIAGEN რეაქტივების ნაკრებს. ექსტრაქციის პროტოკოლი შედგენილია მწარმოებლის მიერ მითითებული რეკომენდაციების გათვალისწინებით და მცირედ მოდიფიცირებულია ჩვენს მიერ. ის მსგავსია ქსოვილის, სისხლის, ბენვის სინჯებისთვის (დანართი 1) და მცირედ განსხვავდება ექსკრემენტის სინჯებისთვის (დანართი 2). ყოველი ექსტრაქციის დროს გამოიყენება ნეგატიური კონტროლი, რეაქტივების დაბინძურების მონიტორინგისთვის. ექსტრაგირებულ დნმ-ს ვინახავთ -20°C .

დნმ-ს ფრაგმენტების კვლევისას, პჯრ მონაწილე პრაიმერებს ვარჩევთ გამოქვეყნებული პუბლიკაციების მიხედვით. ზოგჯერ, საჭირო ხდება პრაიმერების დიზაინი. მიტოქონდრიული და ბირთვული დნმ-ს ზოგიერთი ფრაგმენტების ამპლიფიცირებისთვის ვიყენებთ სტანდარტული ოლიგონუკლეოტიდებისგან შემდგარ პრაიმერებს (დანართი 5). ჩვენს მიერ საკვლევად შერჩეული დნმ-ს ფრაგმენტი არ აღემატება 600 ბაზურ წყვილს.

პჯრ პირობების - რეაქტივების შემადგენლობა და ტემპერატურული რეჟიმის ოპტიმიზაციას ვახდენთ ლიტერატურული წყაროების ანალიზისა და ლაბორატორიული ექსპერიმენტების საფუძველზე. ჩვენს მიერ გამოყენებული პრაიმერების ნუკლეოტიდური შემადგენლობა და პჯრ რეაქციის პირობები (თითოეული რეაქტივის კონცენტრაცია, ამპლიფიცირების ციკლების რაოდენობა და ტემპერატურული რეჟიმი) დეტალურადაა აღწერილი ყველა გამოქვეყნებულ სამეცნიერო პუბლიკაციაში.

პჯრ-ს შედეგად ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის კონცენტრაციას ვამოწმებთ ულტრაიისფერი სინათლის წყაროს მეშვეობით 1% აგაროზის გელზე, რომელიც იღებება SaberSafe-ით. თუ კონცენტრაცია მაღალია, სექვენირების დაწყებამდე, ამპლიფიცირებულ დნმ-ს ფრაგმენტს ვასუფთავებთ პოლიეთილენგლიკოლით (დანართი 3).

მიკროსატელიტური ლოკუსების კვლევა. დროისა და ფინანსური რესურსების დაზოგვის მიზნით, ძალიან ხშირად მივმართავთ რამოდენიმე ლოკუსის ერთდოულად ამპლიფიცირების მეთოდს. პრაიმერებს ვუკვებთ ისე რომ ლოკუსებს, რომლებსაც მსგავსი დიაპაზონის მქონე ალელები აქვთ სხვადასხვა სპექტრის (FAM,

NED, VIG, HEX, JOE, TMR) ფლუორესცენტული ნივთიერებით იყოს მარკირებული (დანართი 6). კვლევის დასაწყისში, 20-მდე სინჯში, ყველა ლოკუსის ამპლიფიცირება ცალ-ცალკე ხდება, ამით შეგვიძლია დავადგინოთ ალელების სიგრძის დიაპაზონი და დამახასიათებელი მოხაზულობა. თუ სხვადასხვა ლოკუსების ამპლიფიცირების ტემპერატურული რეჟიმი ერთნაირია, განსხვავდება ან ალელების სიგრძის დიაპაზონით ან პრაიმერების მარკერის სპექტრით, მაშინ ასეთი ლოკუსების ამპლიფიცირებას ერთი რეაქციით ვახდენთ. ერთდოულად ცხრა ლოკუსის წარმატებული ამპლიფიცირებაც კი გავციკეთებია. კვლევებში გამოყენებული მიკროსატელიტური პრაიმერები და ამპლიფიცირების პირობები დეტალურადაა აღწერილი ყველა პუბლიკაციის მეთოდურ ნაწილში.

მიკროსატელიტური ლოკუსების კვლევისას ხშირია გენოტიპირების შეცდომა და არასწორი ალელების ამპლიფიცირების შემთხვევები (Waits et al., 2001; Milleret al., 2002,) ჩვენ ალელებს სარწმუნოდ მივიჩნევთ თუ ალელების სარწმუნოება (RCI) 95%, რაც ნიშნავს იმას, რომ სხვადასხვა ამპლიფიცირების დროს, შემთხვევათა 95% ალელები ერთმანეთს უნდა ემთხვეოდეს, ამასთან ჰეტეროზიგოტი ორჯერ, ხოლო ჰომოზიგოტი სამჯერ უნდა გამოვლინდეს ამიტომ, ყველა ლოკუსის ამპლიფიცირებას და ვიზუალიზაციას ვახდენთ მინიმუმ სამჯერ.

გენეტიკურ ანალიზატორში (ABI 3130) მიკროსატელიტური ალელების ვიზუალიზაციისთვის (დამოკიდებულია პრაიმერის მარკერის სპექტრზე) ვიყენებთ Applied Biosystems მიერ წარმოებულ ზომის სტანდარტებს LIZ 500 და Rox 300. მათი კონცენტრაცია სინჯში 0.027-ია. ზომის სტანდარტი იხსნება დეიონიზირებულ ფორმამილში, ხდება დენატურაცია ამპლიფიცირებულ ალელებთან ერთად და მხოლოდ ამის შემდეგ მაღალი რეზოლუციის გელის ელექტროფორეზი.

სექვენირება. ამპლიფიცირებული დნმ-ს ფრაგმენტებს ვასექვენირებთ ABI 3130 გენეტიკური ანალიზატორის საშუალებით. სექვენირების რეაქციაში ვიყენებთ კომპანია Applied Biosystems -ის მიერ რეკომენდირებული Big-Dye Terminator v3.1. სექვენირების რეაქციაში ვიყენებთ იმ პრაიმერების წყვილიდან ერთ-ერთს, რომლის საშუალებითაც განხორციელდა პჯრ. სექვენირების რეაქციას ყველა სინჯში ვაკეთებთ ორივე მიმართულებით, ცალ-ცალკე რეაქციაში, რაც საშუალებას გვაძლევს, მიღებულ

დნმ-ს თანმიმდევრობებში შეცდომა მინიმუმამდე იქნას შემცირებული. ამპლიფიცირებულ პროდუქტს ვასუფთავებთ სპირტით ცენტრიფუგირების გზით (დანართი 4). მიღებული დნმ-ს ფრაგმენტების ქრომატოგრამების კორექტირებისთვის ვიყენებთ SEQSCAPE v2.5 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). ჩვენს მიერ მიღებული ყველა ფრაგმენტი განთავსებულია საერთო მონაცემთა ბაზაში (GeneBank), ფრაგმენტების ინდივიდუალური ნომრები მითითებულია შესაბამის სამეცნიერო პუბლიკაციებში.

მტ დნმ და ბდნმ-ს მონაცემების ანალიზი. სინჯებში დნმ-ის ჰომოლოგიური ფრაგმენტების ერთმანეთთან შეთანხმებისთვის (alignment) ვიყენებთ Clustal ალგორითმს პროგრამა BioEdit v7.0 (Hall 1999). სინჯებს შორის გენეტიკური დისტანციის გასარკვევად ვითვლით დნმს ჰომოლოგიურ თანმიმდევრობებში ტრაზიციების და ტრანსვერსიების რაოდენობებს (Fitch 1967; Gojobori et al., 1982; Kocher and Wilson). სხვადასხვა ავტორი ნუკლეოტიდების ცვლილების განსაზღვრის და გენეტიკური მანძილის გამოთვლისას სხვადასხვა დაშვებებს აკეთებს და შესაბამისად, განსხვავებულ მეთოდს გვთავაზობს. არსებობს ნუკლეოტიდების ცვლილების მოდელის შერჩევის ორი გზა: პარამეტრული და ემპირიული. ემპირიული მოდელები წარმატებით გამოიყენება ამინომჟავების თანმიმდევრობების შესასწავლად (Deyhoff et al., 1978). ხოლო პარამეტრული მოდელები ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობების გასაანალიზებლად. ნუკლეოტიდების ანალიზისთვის ყველაზე ფართოდ GTR (General time-reversible) ჯგუფის მეთოდები გამოიყენება. ამ მეთოდების უპირატესობა მდგომარეობს იმაში, რომ არ საჭიროებს წინაპარი ტაქსონის წინასწარ იდენტიფიცირებას. არსებობს GTR ჯგუფის 81 მოდელი, და ყველა მათგანი ოთხი ძირითადი მეთოდის: ჯუკისა და კანტორის (JC69); კიმურას (K80), ფაზელშტეინის (F81), ჰასეგავა, კიშინო და იანოს (HKY85) ალგორითმებს ემყარება (Zharkikh 1994; (Rodríguez et al., 1990).

ჯუკის და კანტორის მეთოდი (JC69) - ნუკლეოტიდების ცვლილების ყველაზე მარტივი მოდელია. ეფუძნება მთავარ დაშვებას რომ დნმ-ს ნებისმიერ მონაკვეთზე ერთი ნუკლეოტიდი ერთნაირი ალბათობით (P) შეიძლება შეიცვალოს ნებისმიერი სხვა სუბსიტუციით (Jukes & Cantor 1969).

$$P_A=P_C=P_G=P_T=1/4$$

კიშურას ორი პარამეტრის მეთოდი (K80) ემყარება დაშვებას რომ ღნმს მუტაციისას ტრანზიციების ($A \leftrightarrow G$) და ტრანსვერსიების ($C \leftrightarrow T$) სიხშირე განსხვავებულია, მაგრამ მუტაციის ალბათობა ერთნაირია ღნმ-ს ნებისმიერ საიტზე (Kimura 1980) ეს მოდელი ცალკე ითვლის მუტაციის მნიშვნელობებს ტრანსიციისთვის და ცალკე ტრანსვერსიისთვის, ამიტომაც ჰქვია 2 პარამეტრული მოდელი (Ney&Kumar 2000).

ფაზელეშტეინის მოდელი (F81) მსგავსია ჯუკის და კანტორის მეთოდისა, აქაც ნებისმიერი ნუკლეოტიდი შეიძლება მუტაციის შედეგად შეიცვალოს სხვა ნუკლეოტიდით თუმცა არაერთნაირი ალბათობით (Felsenstein 1981).

$$P_A \neq P_C \neq P_G \neq P_T.$$

ჰასეგავა, კიშინო და იანოს მოდელი (HKY85) არის K80 და F81 მოდელების კომბინაცია, მხოლოდ ის ასხვავებს ტრანზიციებისას ტრანსვერსიების სიხშირეს k პარამეტრის გამოყენებით. ამასთან ითვლის იმ პროცესების მოხდენის ალბათობას, რამაც განაპირობა ნუკლეოტიდის არსებობა კონკრეტულ ადგილას. მაგ. თუ ღნმ-თანმიდევრობაში გვხვდება ნუკლეოტიდი თიმინი მხედველობაში მიიღება ყველა ის პროცესი, რამაც განაპირობა თიმინის არსებობა ღნმ-ს თანმიმდევრობაში ამ კონკრეტულ საიტზე. მოგვიანებით ფალსეშტეინმა გააუმჯობესა ეს მოდელი და ამიტომაც მას F84 უწოდებენ.

ტამურამ და ნეიმ შეიმუშავეს ღნმ-ს თანმიმდევრობაში ნუკლეოტიდების ცვლილების ახალი მოდელი - TN93 (Tamura & Nei 1993). ეს მოდელი ეფუძნება HKY 85, მაგრამ განსხვავდება იმით რომ ამ მოდელში გათვალისწინებულია ტრანზიციებში ორი განსხვავებული სიხშირე ($A \leftrightarrow G$) და ($C \leftrightarrow T$).

ჩვენი კვლევების დროს ფილოგენეტიკურ ანალიზს ვიწყებთ ნუკლეოტიდების მუტაციის ყველა შესაძლო მოდელების შემოწმებით პროგრამების MEGA v5 (Kumar et al., 2004) და BEAST (Suchard et al., 2001) საშუალებით. GTR-ის შესაძლო 81 მოდელიდან საუკეთესო მოდელი ირჩევა ბაიების ინფორმაციული კრიტერიუმის BIC (Schwarz 1978; Tamura et al., 2011), და აკაიკის ინფორმაციული კრიტერიუმების AIC (Akaike 1974) მნიშვნელობების მიხედვით. მონაცემების ანალიზისას ვიყენებთ მარკოვ-

ჩეინ-მონტე-კარლოს (MCMC) ისეთ ნიშნულს, რომელიც თითოეულ პარამეტრზე მოგვცემს სარწმუნო შედეგს, პროგრამული სახელმძღვანელოს (MEGA; BEAST) რეკომენდაციების მიხედვით.

ევოლუციის ყველა შესაძლო სურათის დასადგენად ვიყენებთ ბანდელტის უახლოესი მეზობლის ალგორითმს NETWORK (Bandelt et al., 1999).

მოლეკულური საათი. ტაქსონომიურ ერთეულებში დივერგენციის განსასაზღვრად ვიყენებთ მოლეკულური საათის ჰიპოთეზის ტესტს (Zucherkand & Pauling 1965). დაკვირვებისას ავტორებმა გამოთქვეს ვარაუდი, რომ პროტეინებს შორის გენეტიკური დისტანცია წრფივად იზრდება სახეობების დივერგენციის პარალელურად. ამ ვარაუდის მიხედვით, პროტეინების ევოლუციის სიჩქარე მუდმივია დროის ერთეულში. ეს ჰიპოთეზა მოგვიანებით მოლეკულური საათის სახელწოდებით გადახა ცნობილი და მისი მთავარი არსი შემდეგში მდგომარეობს: მუტაცია და ნუკლეოტიდების ცვლილების სიჩქარე იცვლება სხვადასხვა გენებში, მაგრამ მუტაცია მუდმივია ერთიდაიგივე გენის ფარგლებში, თუნდაც ევოლუციურად დაშორებულ ტაქსონებში. მოლეკულური საათის ჰიპოთეზას ჰყავდა მომხრეები, რომლებიც ამტკიცებდნენ რომ საათის მოქმედება ანუ მუტაციის სიჩქარე მუდმივია დროის ერთეულში (Ayala 1982, Fitch 1976). მოგვიანებით, დნმ-ს შესწავლისას აღმოჩნდა რომ ნუკლეოტიდების მუტაციის სიჩქარე დამოკიდებულია: ნუკლეოტიდების პოზიციაზე კოდონში (სინონიური მუტაციები და არასინონიური), დნმ-ს კლასზე (ინტრონები, ფსევდოგენები და მაკოდირებელი უბნები) (Avice 2004) და გენომზე (ქლოროპლასტული, მიტოქონდრიული, ბირთვული დნმ (Caccone et al., 1988; DeSalle et al., 1987; Powell et al., 1986; Hasegawa & Kishino 1998; Gnaur & Li 2000; Avice 2004). მუტაციის სიჩქარე განსხვავდება ცივ და თბილისხლიან ცხოველებში (Kocher et al., 1989); თევზების სხვადასხვა სახეობებში (Krieger & Fuerst 2002); ხერხემლიანების სხვადასხვა კლასში (Avice et al., 1992; Bowen et al., 1993) ძუძუმწოვრების სხვადასხვა რიგში (Hasegawa & Kishino 1989), დროზოფილას სხვადასხვა კლასში (DeSalle & Templeton 1988) უხერხემლოების სხვადასხვა გვარში (Romano & palumbi 1996; van Oppen et al., 1999).

დნმ-ში მუტაციის განსხვავებული სიჩქარის გამო შემოღებულია მოლეკულური

საათის ორი ტიპი: ზუსტი მოლეკულური საათი (strict clock) - მუტაციის სიჩქარე ერთნაირია მთელს დნმ-ში და არაზუსტი მოლეკულური საათი (Relaxed clock) - მუტაციის სიჩქარე კორელაციის გარეშე განსხვავდება წინაპარ და თანამედროვე ტაქსონებში (Drummond et al., 2006).

მოლეკულური საათის ჰიპოთეზა დღესაც წარმატებით გამოიყენება ტაქსონების ევოლუციის სურათის აღსადგენად (Simon et al., 2005; Battistuzzi et al., 2010; Roger & Hug 2006) კლიმატური და გეოლოგიური მოვლენების შესასწავლად (Cooper & Penny 1997; Weir & Schluter 2004; Weir 2006), სახეობათწარმოქმნისა და სახეობათა გადაშენების ტემპების შესაფასებლად (Baldwin & Sanderson 1998; Barraclough & Vogler 2002; Weir & Schluter 2007), ორგანიზმთა გავრცელების (Drovetski 2003; Mercer & Roth 2003) და გენთა ოჯახების ევოლუციის შესასწავლად (Robinson-Rechavi et al., 2004; Vandepoele et al., 2004).

მიკროსატელიტური ლოკუსების ანალიზი. მაღალი რეზოლუციის გელზე გენოტპების იდენტიფიცირებას ვახდენთ კომპიუტერული პროგრამა Genemapper v3.5 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

პირველადი მონაცემების ანალიზის დროს, ჩვენ ვარკვევთ მიკროსატელიტური ლოკუსების ოპტიმალურ რაოდენობას. კერძოდ ვითვლით ინდივიდების იდენტიფიცირების ალბათობა, ისეთი პარამეტრებით რომ შეგველოს სიბსების გამოვლენაც კი $P < 0.01$ GIMLET v1.3.3 (Valiere 2001; Woods et al. 1999; Waits et al. 2001). მიკროსატელიტური ლოკუსების შერჩევისას ვითვალისწინებთ ალელების ვარიაციურობას, ამპლიფიცირებისა და ვიზუალიზაციის სირთულეებს.

პოპულაციის გენეტიკური პარამეტრების შესაფასებლად (AMOVA), ვიყენებთ ARLEQUIN v3.1 (Excoffier et al. 2005). ამავე პროგრამით ვითვლით ჯგუფებს შორის F_{st} , F_{is} , F_{it} , ვაფასებთ პანმიქტირობას ჯგუფებს შორის და ჯგუფებს შიგნით. ვითვლით მიგრაციის ინტენსივობას. პოპულაციაში ჰეტეროზიგოტულობის სიმცირეს და ბოთლის ყელის ეფექტის ალბათობას ვითვლით პროგრამა BOTTLENECK საშუალებით მიკროსატელიტური ლოკუსების ორ ეტაპიანი მოდელის გამოყენებით (Luikart & Cornuet 1998).

ჯგუფების გენეტიკურ სტრუქტურას ვაფასებთ ბაიზის კლასტერული ანალიზის საფუძველზე პროგრამა STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) გამოყენებით. ეს საშუალებას იძლევა გამოვალინოთ გენეტიკურად ჰომოგენური ჯგუფები, განვსაზღვროთ ჯგუფის რაოდენობა (K) და თითოეული ინდივიდი მივაკუთნოთ რომელიმე გენეტიკურ ჯგუფს. კვლევის ამოცანიდან გამომდინარე ვიყენებთ ან ინდივიდების აპრიორული დაჯგუფების (No admixture) ან ინდივიდების შერევის (admixture) ალგორითმებს, რომლებიც ალელების სიხშირის კორელაციას ითვალისწინებს. შედეგების საწარმოებას ვუზრუნველყოფთ MCMC 100000 რაოდენობით. ვაფასებთ K მნიშვნელობას ვუთითებთ მინიმალური და მაქსიმალური ჯგუფების რაოდენობას (გათვალისწინებულია ყველა შესაძლო თეორიული ბარიერი). შედეგების საწარმოების მიზნით ვიყენებთ K მნიშვნელობის დადგენის 20 დამოუკიდებელ ანალიზს. ოპტიმალური K მნიშვნელობის დადგენა ემყარება (1) $2 \log \Pr(X/K)$ მინიმალურ რიცხვით მნიშვნელობას (Pritchard et al. 2000) და (2) მონაცემების ცვლილების ალბათობის ლოგარითმის მნიშვნელობას (DK) (Evanno et al. 2005).

მიკროსატელიტური ლოკუსების ანალიზისთვის ზოგჯერ ვიყენებთ R_{st} მნიშვნელობას, რომელიც მსგავსია F_{st} (Slatkin 1995; Excoffier 2001). მანტელ ტესტის საშუალებით ვაანალიზებთ მორფოლოგიური ნიშნების, მიკროსატელიტების (R_{st}) და ჰაპლოტიპების (F_{st}) დისტანციული მატრიცას (Anderson & Legendre 1999; the software *zt* by Bonnet & Van de Peer 2002).

სახეობებში დივერგენციის დროისა და გენების მიმოცვლის ხარისხის დასადგენად ვიყენებთ IM კომპიუტერული პროგრამა (Hey 2005; Hey & Nielsen 2004; Won & Hey 2005) (<http://lifesci.rutgers.edu/~heylab/HeylabSoftware.htm>). ამ პროგრამის ალგორითმებით შესაძლებელია გამოითვალოს გენეტიკური განსხვავებები ჯგუფებს შორის რომელთა დივერგენციის ასაკი არ არის ძალიან დიდი (Won & Hey (2005)).

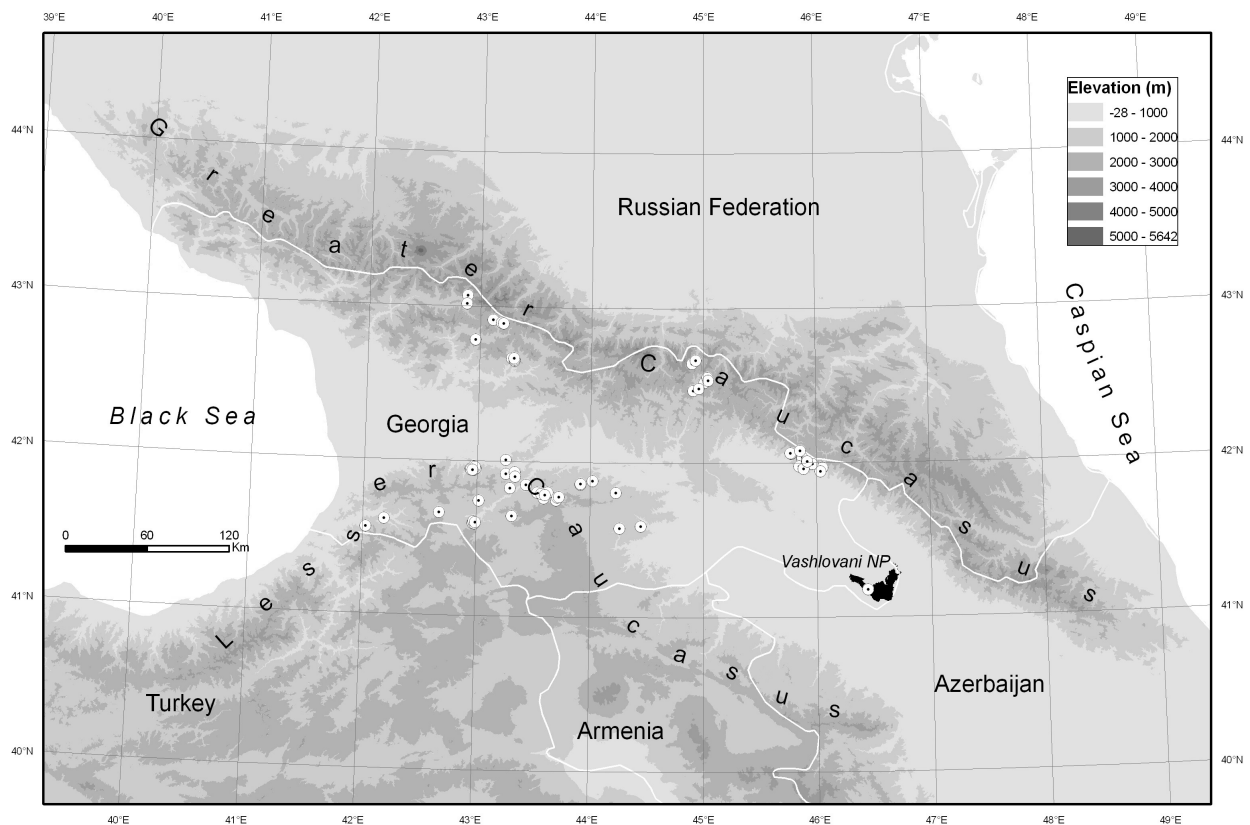
**თავი 1: მურა დათვის ტაქსონომიის კვლევა და პოპულაციის
გენეტიკური სტრუქტურის შეფასება კავკასიაში**



1.1. შესავალი

მურა დათვი (*Ursus arctos*), ფართოდ იყო გავრცელებული კავკასიაში (Radde 1899; Dinnik 1914). მე-19 საუკუნიდან შეიმჩნევა დათვის რიცხოვნობის შემცირება, რის მთავარ მიზეზად, ჰაბიტატის შემცირება და არალეგალური ნადირობა სახელდება (NACRES 2006). მურა დათვი გვხვდება ტყიან და ბუჩქნარებიან ჰაბიტატში. დათვის კავკასიის პოპულაციის ჰაბიტატი, აღმოსავლეთ ევროპის პოპულაციის ჰაბიტატისგან იზოლირებულია სამხრეთ რუსეთის ვაკით. ამავე დროს, არ უნდა იყოს იზოლირებული ანატოლიასა და შუა აზიაში გავრცელებული დათვის ჰაბიტატებისგან.

სურ 1.1. მურა დათვის სინტეზის მოპოვების ადგილები



თეთრი წრეებით აღნიშნულია მურა დათვის სინტეზის წარმოშობის გეოგრაფიული წერტილები

კავკასიაში მურა დათვის ტაქსონომიური სტატუსი არ არის დადგენილი, სხვადასხვა ავტორი დათვის ქვესახეობების განსხვავებულ რიცხვს ასახელებს. ასე მაგალითად: *U. a. meridionalis* (Middendorf 1851); *U. a. meridionalis* და *U. a. typicus*

(Dinnik 1914); *U. a. meridionalis*, *U. a. caucasicus* და *U. a. lasistanicus* (Satunin 1915); *U. a. meridionalis* და *U. a. syriacus* (Geptner et al., 1967; Tikhonov 1987). 1998 წელს ჩესტინისა და მიკეშინას მიერ გამოყოფილი იყო მურა დათვის სამი, მორფოლოგიურად განსხვავებული ტიპი *meridionalis*, *caucasicus* და *lasistanicus*. ჩესტინის და მიკეშინას კვლევა ემყარებოდა კრანოლოგიურ განაზომებს და სისხლის ზოგიერთი ცილის ელექტროფორეზით მიღებულ მონაცემებს. თუმცა არცერთი მათ მიერ გამოყოფილი ტიპი არ იყო გეოგრაფიულად იზოლირებული და/ან დაკავშირებული რომელიმე გეოგრაფიულ ადგილთან, სამივე ტიპი გავრცელებული იყო როგორც დიდ, ისე მცირე კავკასიონზე (Chestin & Mikeshina 1998).

კავკასიაში მურა დათვის არეალის ინტენსიური შემცირება მე-20 საუკუნის 50-იანი წლებიდან დაიწყო. კუდაქტინისა და ჩესტინის აზრით, დათვის რიცხოვნობა საქართველოში კლებულობს (Кудактин, Честин 1993). 2005 წელს, საქართველოს წითელი ნუსხის შემდგენელმა კომისიამ, მურა დათვი შეიყვანა საქართველოს წითელ ნუსხაში, როგორც გადაშენების საფრთხის პირას მყოფი სახეობა (საქართველოს წითელი ნუსხა 2005).

ჩვენი კვლევის მიზანი იყო: დაგვეზუსტებინა ტაქსონომია; დაგვედგინა როგორ მოხდა მურა დათვის ისტორიული განსახლება კავკასიაში; ქმნის თუ არა მურა დათვი გენეტიკურად და/ან გეოგრაფიულად იზოლირებულ ჯგუფებს კავკასიაში; როგორია გენეტიკური დისტანცია კავკასიისა და რეგიონის გარეთ გავრცელებულ მურა დათვის პოპულაციებს შორის (უფრო ზუსტად, დაგვედგინა კავკასიის მურა დათვის ადგილი ფილოგენეტიკურ ხეში).

1. 2. მასალა და მეთოდი

1.2.1. სინჯების მოგროვება, დნმ-ს ექსტრაქცია, მტ დნმ-ს კვლევა

საქართველო მოიცავს კავკასიაში გავრცელებული მურა დათვის პოპულაციის დიდ ნაწილს, რადგან დათვისთვის ხელსაყრელი ჰაბიტატის 40% სწორედ

საქართველოშია (A. Gavashelishvili, unpublished), ამიტომ სინჯების შეგროვება მხოლოდ საქართველოდან სრულყოფილ და საწრმუნო შედეგებს მოგვცემს.

2000-2008 წლებში მოგროვილი იქნა 30 ექსკრემენტისა და 67 ქსოვილის სინჯი. სინჯების მოგროვება, დნმს ექსტრაქცია, საკონტროლო რეგიონის პრაიმერები (L16345; H16751 დანართი 5), ამპლიფიცირება დეტალურადაა აღწერილი (Murtskhvaladze et al., 2010). დნმ-ს ფრაგმენტების შესახებ ინფორმაცია შეტანილია საერთო მონაცემთა ბაზაში (Genebank) ნომრებით GU057343–377.

იმისათვის რომ, ჩვენი მონაცემები თავსებადი ყოფილიყო გამოქვეყნებულთან, ჩვენ, მონაცემთა ანალიზის დროს, გამოვიყენეთ საკონტროლო რეგიონის ორი: 194 და 354 ნუკლეოტიდის სიგრძის (ნს) მქონე ფრაგმენტები. საერთო მონაცემთა ბაზაში ჩვენთვის საინტერესო ინდივიდების მხოლოდ 194 (ნს) ფრაგმენტებია გამოქვეყნებული. ამიტომ ანალიზი ჩავატარეთ ორი მიმართულებით: 194 (ნს) ფილოგენეტიკური ანალიზისთვის და 354 (ნს) ფრაგმენტი კავკასიის პოპულაციის გენეტიკური სტრუქტურის შესასწავლად. სულ 68 სინჯი ($n = 68$). დამატებით, გავაანალიზეთ 36 სინჯი. ჯგუფგარეშე ტაქსონად გამოვიყენეთ ამერიკული შავი დათვისა ($n = 2$) და ჰიმალაური შავი დათვის ($n = 2$) საკონტროლო რეგიონის ფრაგმენტები (Murtskhvaladze et al., 2010 Table 1.)

BEAST v1.5.1 ის მეშვეობით ავაგეთ ფილოგენეტიკური ხე (სურ 1.2). გამოვთვალეთ დივერგენციის დრო კავკასიის სუბპოპულაციებს შორის. დროის კალიბრაციისთვის გამოვიყენეთ რადიოქტიური ნახშირბადით დათარიღებული, ნამარხი, მურა დათვის დნმ-შესაბამისი ფრაგმენტი. ამ სინჯების ასაკი განისაზღვრება 17000-3400 წლებით (Valdiosera et al., 2007).

1.2.2. ბირთვული დნმ-ს მიკროსატელიტური ლოკუსები (გენოტიპირება)

ჩვენ გავაანალიზეთ 18 მიკროსატელიტური ლოკუსი (G10A, G10B, G10C, G10H, G10J, G10L, G10M, G10O, G10P, G10X, G1D, Mu10, Mu11, Mu15, Mu23, Mu50, Mu59, Cxx20, Waits et al., 2000; Jackson et al., 2008). პირველადი მონაცემების ანალიზის შემდეგ შევარჩიეთ რვა მიკროსატელიტური ლოკუსი (Cxx20, G10B, G10C, G10L, G10P,

G10J, Mu50, Mu59) მათგან შემდეგი ლოკუსები G10L, Mu59, G10C, G10J და G10P იყო ყველაზე ინფორმატული, ჰქონდა ალელების მაღალი ვარიაცია 5 და მეტი ალელი.

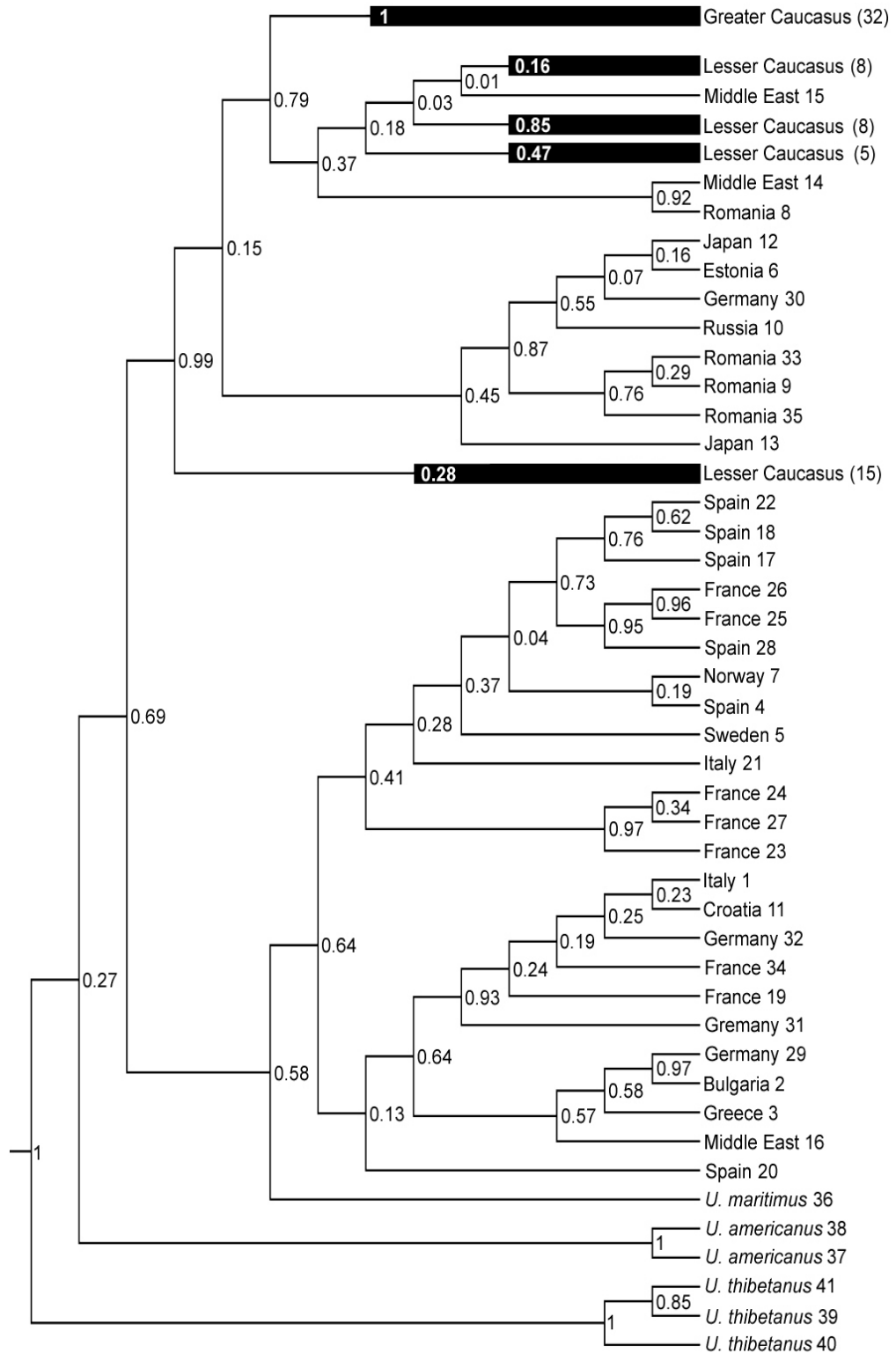
1.3. მიღებული შედეგები

1.3.1. დნმ-ს ექსტრაქცია და მტ დნმ-ს კვლევა

მოპოვებული 97 სინჯიდან ჩვენ შევძელით მურა დათვის 71 ინდივიდის კვლევის წარმატებით დასრულება. მტ დნმ-ს კვლევა შევძელით 68 სინჯზე (31 დიდი -, 36 მცირე კავკასიონიდან და 1 ვაშლოვანის ეროვნული პარკიდან), რომლებიც დათარიღებულია 1930-2008 წლებით, ხოლო მიკროსატელიტური ლოკუსების კვლევა 63 სინჯზე (31 დიდ და 32 მცირე კავკასიონიდან) - 1980-2008წწ. 60 სინჯზე გვაქვს როგორც მტ დნმ-ს ფრაგმენტი, ისე მიკროსატელიტური ალელები.

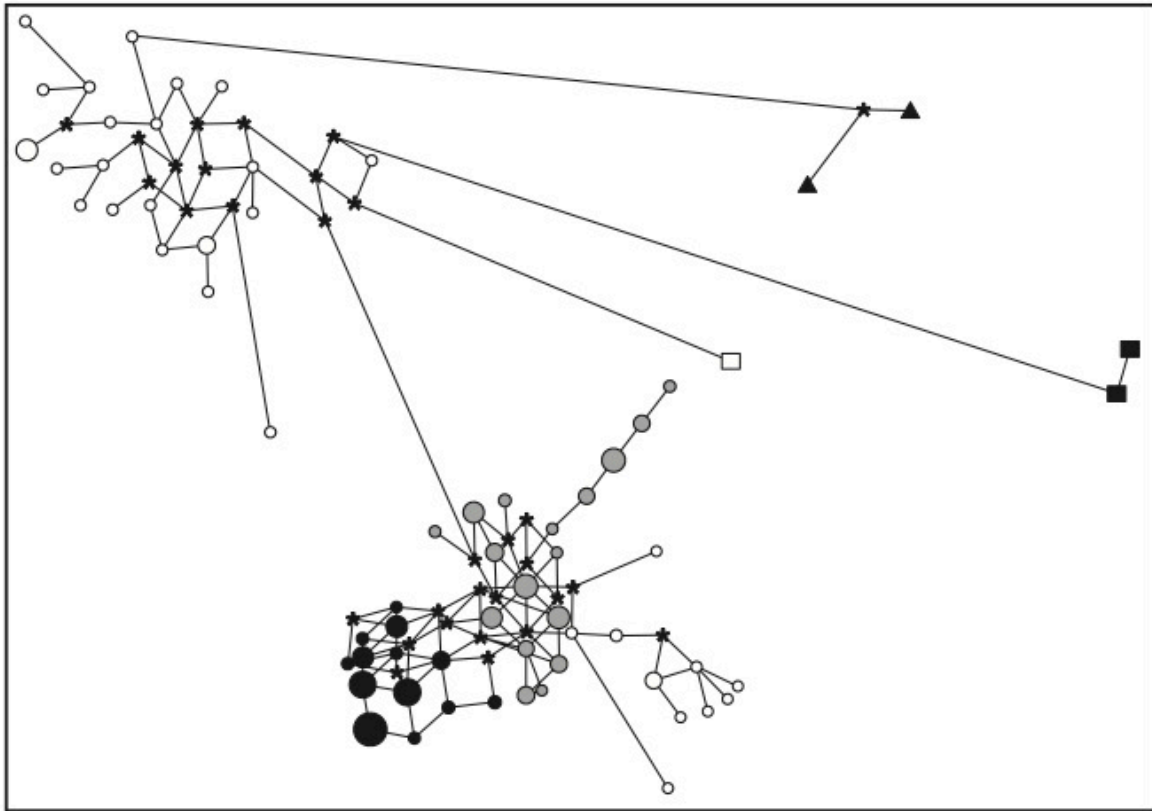
მტ დნმ-ს მუტაციის მოდელებიდან უპირატესობა მივანიჭეთ $GTR + G + I$. ბაიესური ფილოგენეტიკური ანალიზი სწორედ ამ მოდელს ეფუძნება. მონაცემების ანალიზმა გვაჩვენა რომ ყველა კავკასიურ მურა დათვი, აღმოსავლეთ ევროპულ და აზიურ დათვებთან ერთად ქმნის მონოფილეტურ კლადას (სურ 1.3). ამ კლადის შიგნით დათვები დიდი კავკასიონიდან და ვაშლოვანის ნაკრძალიდან ქმნიან მონოფილეტურ სუბ-კლადას მაღალი სტატისტიკური სარწმუნოებით (1.0). ფილოგენეტიკური ანალიზის ბაიესის მეთოდმა, აჩვენა რომ დიდი კავკასიონის მდებრობითი ხაზის დივერგენცია მოხდა ევრაზიული (მათ შორის მცირე კავკასიონიდანაც) პოპულაციებიდან 3800–41 500 წლის წინ (95% highest posterior density). ხოლო დივერგენციის საშუალო ასაკი 19800 წელია, რაც ემთხვევა ბოლო გამყინვარების პერიოდს. ინდივიდები, რომლებიც მოპოვებულია მცირე კავკასიონიდან არ ქმნის იზოლირებულ სუბპოპულაციას. მიტოქონდრიული დნმ-ს ჰაპლოტიპების MJ ანალიზის შედეგები (სურ 1.3) დაემთხვა ბაიესის მეთოდით აგებულ ფილოგენეტიკურ ხეს (სურ 1.2), რომელიც ამტკიცებს მურა დათვის დიდი კავკასიონის პოპულაციის მდებრობითი ხაზით იზოლაციას მცირე კავკასიონის მურა დათვის პოპულაციებისგან და, ამავე დროს, აჩვენებს რომ მცირე კავკასიონის დათვის პოპულაციები, პოლიფილეტურია და დაკავშირებულია დათვის ევროპულ პოპულაციებთან.

სურ.1.2. მურა დათვის ფილოგენეტიკური ხე



ნოდებთან რისკვები მიუთითებს ნოდის სარწმუნოებას. დიდი კავკასიონის კლადა მოიცავს სინჯებს დიდი კავკასიონიდან და ვაშლოვანის ეროვნული პარკიდან (მუქი ფერის მართკუთხედი), სინჯები მცირე კავკასიონიდან ქმნის სუბკლადებს (მუქი მართკუთხედები) ფრჩხილებში სინჯების რაოდენობა რეგიონიდან. ქვეყნის დასახელებები აჩვენებს სინჯების წარმოშობის ადგილებს.

სურ 1.3. უახლოესი მეზობლის ალგორითმით აგებული ფილოგენეტიკური ხე.



შავი წრე - დიდი კავკასიონის პოპულაცია, რუხი წრე - მცირე კავკასიონის პოპულაცია; თეთრი წრე - ევროპული მურა დათვი, სამკუთხედი - ამერიკული შავი დათვი. შავი კვადრათი - ჰიმალაური დათვი; თეთრი კვადრათი - პოლარული დათვი.
დამაკავშირებელი ხაზების სიგრძე პროპორციულია ჯგუფებს შორის გენეტიკური მანძილისა.

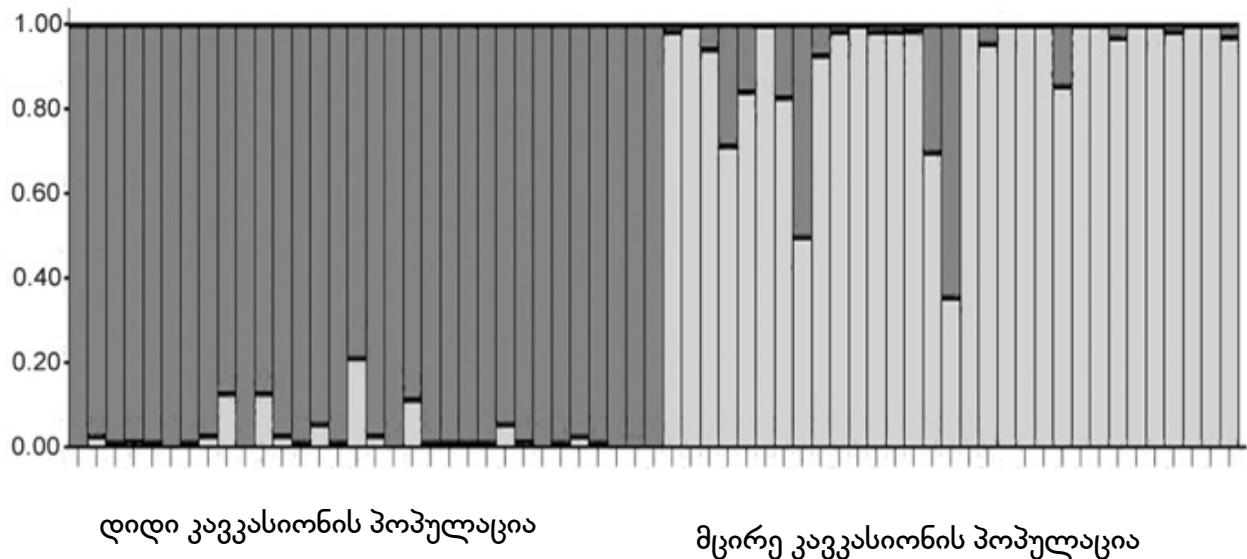
1.3.2. პოპულაციურ - გენეტიკური ანალიზი

სინჯები, რომელთა მიკროსატელიტური ლოკუსებით კვლევა შევძელით, წარმოადგენს, საშუალოდ, დათვის სამ თაობას (28 წლიანი ინტერვალი). დათვის პოპულაციაში გენების დრეიფის შესაფასებლად ჩვენი სინჯები დაყვავით ორ თანაბარ ჯგუფად. დაყოფა ეფუძნებოდა სინჯის მოპოვების დროს (14 წლიან ინტერვალს). შევაფასეთ AMOVA ამ ორ ჯგუფს შორის. F- სტატისტიკურმა მაჩვენებელმა ამ ჯგუფებს შორის განსხვავება არ მოგვცა ($F_{ST} = 0.0067$, d.f. = 1, $P = 0.8588$), თუმცა გარკვეულ სტრუქტურირებას ორივე ჯგუფის შიგნით ჰქონდა ადგილი ($F_{IT} = 0.0432$, d.f. = 63, $P =$

0.0058) უფრო მეტიც, ეს ორი ჯგუფიც განსხვავდებოდა ერთმანეთისგან ($FIS = 0.0368$, d.f. = 61, $P = 0.0116$). ამ ანალიზმა გვაჩვენა რომ ჯგუფებს შორის განსხვავება დროებითი არ იყო. რადგან მტ ღნმ-ს ფილოგენეტიკურმა ანალიზმა გვაჩვენა დივერგენცია დიდი და მცირე კავკასიონის სუბპოპულაციებს შორის.

საქართველოს მურა დათვის პოპულაცია არაა პანმიქტური. არსებობს მცირე გენეტიკური განსხვავება ამ ორ გეოგრაფიულ სუბპოპულაციას შორის. ხოლო თითოეული ჯგუფი თავის მხრივ არაა გენეტიკურად სტრუქტურირებული და შესაბამისად, პანმიქტურია ($FIT = 0.0479$, d.f. = 63, $P = 0.0336$). არ აღმოჩნდა სარწმუნო განსხვავება ინდივიდებს შორის, ჯგუფის შიგნით ($FIS = 0.0317$, d.f. = 61, $P = 0.1266$) სხვაობა ორ სუბპოპულაციას შორის სუსტია, თუმცა სარწმუნო ($FST = 0.0167$, d.f. = 1, $P = 0.0203$). ალელების პროპორცია და ინდივიდების ჯგუფში კუთვნილება გამოთვლილია STRUCTURE -ის მიხედვით (სურ 1.4).

სურ.1.4 მურა დათვის ინდივიდების განაწილების ალბათობა დიდ და მცირე კავკასიონის პოპულაციებში



თითოეული სვეტის შეფერილობა აღნიშნავს ინდივიდის კუთვნილების ალბათობას ერთ-ერთ პოპულაციაში. მუქი ნაცრისფერი აღნიშნავს დიდ და ღია ფერი- მცირე კავკასიონის პოპულაციებს.

არსებობს კავშირი FST მნიშვნელობასა და მიგრაციის ინტენსივობას შორის (Wright 1969). FST მნიშვნელობის საფუძველზე, გამოვთვალეთ მიგრანტების რიცხვი

დიდი და მცირე კავკასიონზე ერთი თაობის (დაახ 8 წელი) განმავლობაში. აღმოჩნდა რომ, მიგრაცია ინტენსიურია დიდიდან მცირე კავკასიონზე და არა პირიქით. ისეთი მიგრანტების რიცხვი, რომელიც დიდი კავკასიონიდან მიგრირებს მცირე კავკასიონზე და იქ წარმატებით მრავლდება (ეფექტური მიგრანტი), 14 ინდივიდია ერთი თაობის განმავლობაში (სურ. 1.4). კვლევის შედეგად მიღებული ალელების მრავალფეროვნება ადასტურებს, რომ არცერთ სუბპოპულაციას არ გაუვლია ბოთლის ყელის ეფექტი.

ბაიეზის ანალიზმა აჩვენა, რომ მურა დათვის პოპულაციის გენეტიკური სტრუქტურის სურათი არ განსხვავდებოდა როცა პოპულაციების რიცხვი $K=2$ ან $K=1$. უფრო მეტიც, ინდივიდების მიკუთვნება როელიმე კლასტერთან როცა $K=2$, არ იყო დამოკიდებული სინჯის მოპოვების გეოგრაფიულ ადგილზე. F სტატისტიკის მაჩვენებელსა და ბაიეზის ანალიზს შორის ასეთი უთანხმოების მიზეზი დაადასტურა თანამედროვე კვლევებმა (e.g. Faubet et al., 2007), კერძოდ, აღმოჩნდა რომ ამ ორი მეთოდის შედეგები ერთმანეთს ემთხვევა მხოლოდ მაშინ თუ პოპულაციებს შორის გენეტიკური განსხვავება არ არის ძალიან მცირე (როცა $F_{ST} \geq 0.05$).

1.4. მიღებული შედეგების ანალიზი და დისკუსია

ჩვენი კვლევა აჩვენებს, რომ კავკასიის, ევროპისა და აზიის მურა დათვის, მიტოქონდრიული ჰაპლოტიპები მიეკუთვნება ერთ კლადას (Taberlet & Bouvet 1994; Miller et al., 2006), უსაფუძვლოა ამ კლადის დაყოფა გეოგრაფიულ ქვესახეობებად, ამიტომ მართებული იქნება, კავკასიაში გავრცელებული მურა დათვები, მივაკუთვნოთ მურა დათვის ნომინალურ სახეობას *Ursus arctos*.

კავკასიაში ბინადრობს მურა დათვის ორი გენეტიკურად და გეოგრაფიულად იზოლირებული ჯგუფი, ამ იზოლაციის ასაკი ემთხვევა ბოლო გამყინვარების პერიოდს. დიდი კავკასიონის სუბპოპულაცია მდებარეობს ხაზით, მონოფილეტური წარმოშობისაა და ამ მტკიცებულებას გააჩნია მაღალი სტატისტიკური სარწმუნოება. დიდი და მცირე კავკასიონის სუბპოპულაციები არ განსხვავდებიან ბირთვული დნმ-ს მიკროსატელიტური ლოკუსებით.

მურა დათვის სუბპოპულაციებს შორის გენების მიმოცვლის მთავარი სავარაუდო შემზღუდველი ადამიანის ფაქტორია. ბოლო გამყინვარების განმავლობაში, ტერიტორია დიდ და მცირე კავკასიონს შორის არ იყო წყლით დაფარული და დათვისთვის ვარგის ჰაბიტატს წარმოადგენდა. უფრო ზუსტად, კლიმატი და რელიეფი ვერ იქნებოდა დათვის გავრცელების შემაფერხებელი ფაქტორი. ამასვე ამტკიცებს ევკლიდური დისტანციის ანალიზიც (Murtskhvaladze et al., 2009). მდედრი მურა დათვის ინდივიდუალური ტერიტორია, გაცილებით დიდია ვიდრე მანძილი დიდ და მცირე კავკასიონის უტყეო ადგილებს შორის (Mano 1994; Swenson et al., 1998; McLellan & Hovey 2001; Støen et al., 2005; Jerina & Adamic 2008). სავარაუდოდ, მურა დათვის ჯგუფებს შორის მანძილი კიდევ უფრო მცირე იქნებოდა გამყინვარების დროს, რადგან დათვის ინდივიდები კავკასიონის მთიანეთის დაბალ კალთებზე იქნებოდა გავრცელებული. უგულველსაყოფია დათვის სუბპოპულაციებს შორის იზოლაცია ქცევითი განსხვავებების გამო. ქცევით განსხვავებების გაჩენა, ერთი სახეობის ფარგლებში, ყოველთვის ნაკლებსავარაუდოა თუ მას წინ არ უსწრებს კლიმატის, ლანდშაფტის, ჰაბიტატის ან სხვა სახეობებთან ანტაგონიზმით გამოწვეული იზოლაცია. დათვის სუბპოპულაციებს შორის იზოლაცია შესაძლოა ტყის საფარის არ არსებობასაც გამოეწვია, მაგრამ პალეობოტანიკური და პალინოლოგიური მონაცემები ადასტურებს ტყის საფარის არსებობას საქართველოს დასავლეთ ნაწილში უკანასკნელი 8000 წლის განმავლობაში (Connor & Kvavadze 2008). კავკასიაში, უკანასკნელი გამყინვარების დროს (14000-22000 წწ) ტყის საფარის არსებობა დადასტურებულია ორ მთავარ ადგილას შავი ზღვის სანაპიროზე დასავლეთ საქართველო და თურქეთის ჩრდილო აღმოსავლეთით (e.g. Adams & Faure 1997; Tarkhnishvili et al., 2000, 2008).

მურა დათვის ორ სუბპოპულაციას შორის მიგრაციის არსებობა დადასტურებულია ბირთვული დნმ-ს მიკროსატელიტური ლოკუსებით. მტ დნმ-ს მონაცემებზე დაყრდნობით (მდედრობითი ხაზით იზოლაცია) დასტურდება, რომ მხოლოდ მამრი დათვისები მიგრირებენ, რაც დამახასიათებელია სტაბილური ან შემცირებადი პოპულაციებისთვის (Glenn & Miller 1980; Blanchard & Knight 1991; Swenson et al., 1998). ჩვენი ვარაუდით, ლიხის ქედი შესაძლებელია იყოს სამიგრაციო დერეფანი დათვის ინდივიდებისთვის დიდი კავკასიონიდან მცირესკენ და პირიქით. თუმცა ამ ჰიპოთეზის

შემოწმება საჭიროებს ამ ადგილებიდან, დათვის დამატებითი სინჯების მოგროვებას და ანალიზს.

ჩვენი კვლევა ადასტურებს რომ ძუ მურა დათვებს, მათთვის არახელსაყრელი ჰაბიტატების თუნდაც მცირე ფართობების გადალახვა უჭირთ (მიგრაცია დიდიდან მცირე კავკასიონზე -ჩრდილოეთიდან სამხრეთისკენ), მაშინ როცა ისინი შეუფერხებლად მოძრაობენ ხელსაყრელი ჰაბიტატის თუნდაც დიდ ფართობზე (დიდი კავკასიონის აღმოსავლეთიდან დასავლეთისკენ). ეს ხსნის მტ ღნმს ჰომოგენურობას დიდი კავკასიონის სინჯებში, რადგან ეს ადგილები დათვისთვის ხელსაყრელ გარემო პირობებს წარმოადგენს. მიუხედავად იმისა, რომ გენეტიკური განსხვავება დაბალია გეოგრაფიულ პოპულაციებში, მიგრაციის მაჩვენებელი მაღალია და შესაძლებელია ასიმეტრიული იყოს განსხვავებული სქესის ინდივიდებში.

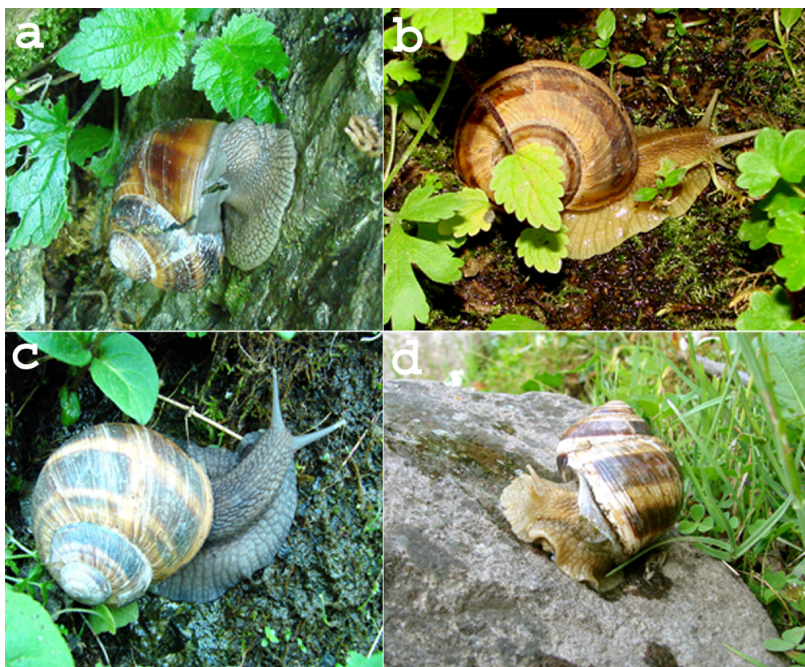
თავი 2. სახეობათწარმოქმნა და კავკასიის ხმელეთის
ენდემური ლოკოკინების (*Helix buchi* და *H. goderdziana*)
გავრცელება.



2.1. შესავალი

გვარ *Helix*-ში გაერთიანებულია ჩრდილოეთ ევრაზიის ყველაზე დიდი ზომის ხმელეთის ლოკოკინები. გვარი მოიცავს 25 სახეობას (Schütt, 2005; Egorov, 2008; Sysoev & Shileyko, 2009). *Helix buchi*, Dubois de Montepereux 1839 ბოლო დრომდე, ითვლებოდა დასავლეთ პალეარქტიკის ყველაზე დიდი ზომის ხმელეთის ლოკოკინად (სურ. 2.1 a, c). ამავე დროს, ეს სახეობა არის კავკასიის დასავლეთი მთის ტყეების ენდემი (Tuniyev, 1990; Röhrig, 1991; Mai, 1995; Veith et al., 1998; Kikvidze & Ohsawa, 1999; Denk et al., 2001; Zazanashvili et al., 2004; Milne, 2004, 2006). კიდევ ერთი დიდი ზომის ხმელეთის ლოკოკინა *Helix goderdziana* (სურ 2.1 b, d) 2008 წელს იქნა აღწერილი (Mumladze et al., 2008) მისი ნიჟარის დიამეტრი 68 მმ-ია. *Helix buchi* და *Helix goderdziana* -ს არეალი ემთხვევა ერთმანეთის, თუმცა ეს უკანასკნელი მხოლოდ მცირე კავკასიონის დასავლეთით გვხვდება (Mumladze et al., 2008;). *H. goderdziana*-ს ტაქსონომიური სტატუსი არაა ცნობილი რადგან სისტემატიკური ნიშნები (ფეხის შეფერილობა, ნიჟარის სიგრძე, ბაგის ფორმა) ვარირებს სახეობის ფარგლებში Schütt 2005; Sysoev & Shileyko (2009).

სურ. 2.1 კავკასიის ხმელეთის ლოკოკინები.



Helix buchi (a, c) და *H. goderdziana* (b,d).

ჩვენი მიზანი იყო დაგვეზუსტებინა *Helix buchi* და *H. goderdziana*-ს ტაქსონომიური სტატუსი, ამ ორი სახეობის წარმოშობის მიზეზები, გაგვერკვია კორელაცია მორფოლოგიურ, გენეტიკურ და გეოგრაფიულ მანძილებთან.

2.2. მასალა და მეთოდი

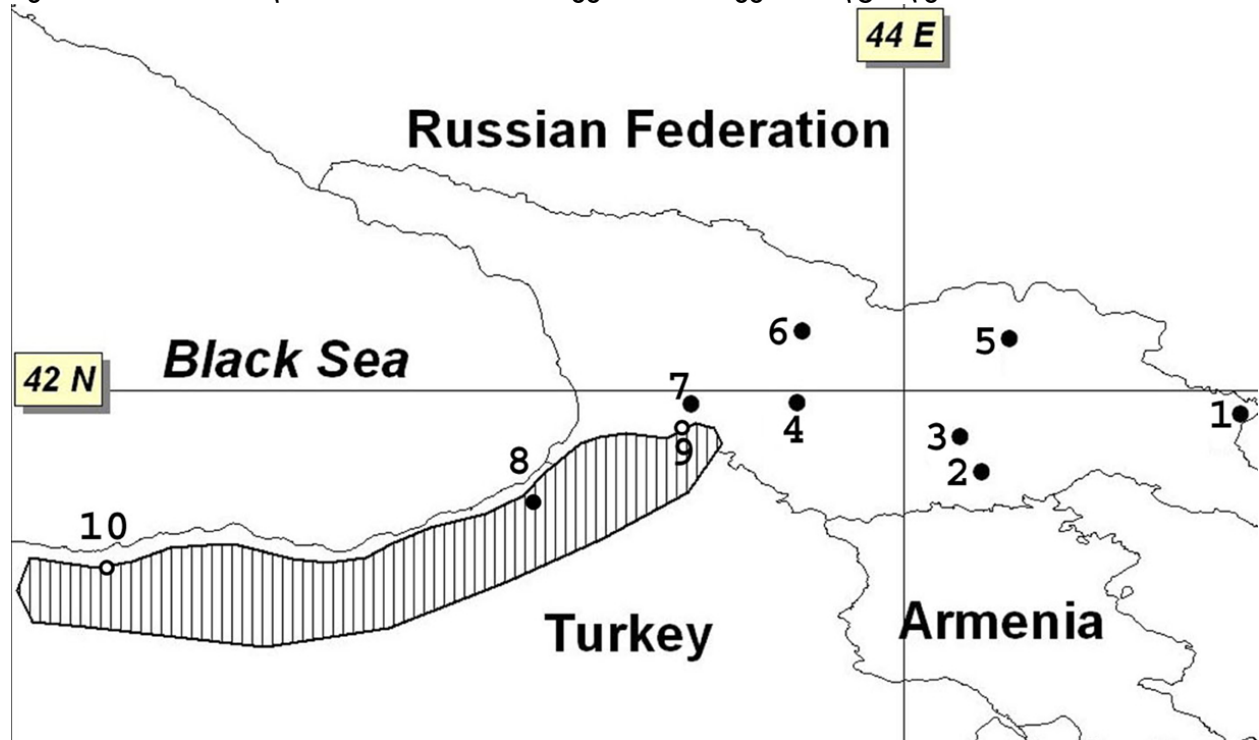
2007-2010 წლებში *H. buchi* არეალის ფარგლებში თითოეული ადგილიდან მოვაგროვეთ 6-10 ქსოვილის სინჯი (სულ რვა ლოკალიტეტი) და *H. goderdziana* 2-5 სინჯი ორი წერტილიდან საქართველოს ტერიტორიაზე და ერთი თურქეთის ჩრდილო-დასავლეთ წერტილიდან (რუკა 2.1.)

ჯგუფგარეშე ტაქსონად გამოვიყენეთ ფართოდ გავრცელებული სახეობები *H. lucorum* და *H. pomatia* (რვა და ხუთი ზრდასრული ინდივიდის სინჯი).

2.2.1. დნმ-ს ანალიზი და ჰაპლოტიპების კვლევა

შვეისნავლეთ მიტოქონდიული დნმ-ს CO1 (Folmer et al., 1994 დანართი 5) და ბირთვული დნმ-ს ITS-1 (Armbruster et al., 2000; van Moorsel et al., 2000) დანართი 5) გენები. სულ 34 *H. buchi*, ხუთი *H. goderdziana*, რვა *H. lucorum* და ხუთი *H. pomatia* ინდივიდი. ამპლიფიცირების პირობები და ტემპერატურული რეჟიმი აღწერილია (Mumladze et al., 2012) ფილოგენეტიკური კავშირების დასადგენად გამოვიყენეთ CO1 364 ნუკლეოტიდის და ITS-1 475 ნუკლეოტიდის სიგრძის ფრაგმენტები. ანალიზში გამოვიყენეთ საერთო მონაცემთა ბაზაში (GenBank) არსებული შემდეგი ინდივიდების *Lozekia deubeli* EU182506; *Marmorana scabriuscula* EU189930; *Ariantha arbustorum* EF398269; *Satsuma adelinae* AB242532; *Iberus marmoratus* EF440268 გამოქვეყნებული შესაბამისი გენები. ფილოგენეტიკური კავშირების დასადგენად გამოვიყენეთ უახლოესი მეზობლისა (NJ) და მაქსიმალური პარსიმონიის ალგორითმები (MP).

სურ 2.2 H. Buchi და H. Goderdziana სინტეზის მოპოვების ადგილები



1. ლაგოდესი დიდი კავკასიონი; 2 – დმანისი, 3 – დიდგორი, 4 –ბორჯომი (მცირე კავკასიონი), 5 – ხევზა, 6 – მოქვა (დიდი კავკასიონი), 7 – ბახმარო (მცირე კავკასიონი); 8 ჭამილი–(კაჩკარის მთები თურქეთი); 9 – გოდერძის უღელტეხილი; 10 – თურქეთი (კოვალნიკი).

სამწუხაროდ, ჩვენ არ გვქონდა ისეთი განამარხებული ხმელეთის ლოკოკინის გენის ფრაგმენტი, რომლის ასაკი ზუსტად არის განსაზღვრული, არაა ცნობილი რომელ გეოლოგიურ ეპოქაში მოხდა ამ სახეობების იზოლაცია რეგიონში. ორი გვარის Gastropoda და Bivalvia CO1 გენის მოლეკულური ევოლუციის შესწავლამ არ აჩვენა საგრძნობი განსხვავება ამ ორ არამონათესავე სახეობებს შორის (Marko, 2002; Ketmaier et al., 2006), ჩვენი მოლეკულური საათის კალიბრაცია ეფუძვნება მარკოს (Marko 2002) მიერ შემოთავაზებულს, კერძოდ, CO1 მუტაციის საშუალო სიჩქარე ტოლია 1.21% ყოველ მილიონ წელიწადში. რადგან ITS-1 გენის ფრაგმენტები იდენტური იყო სამი სახეობის ინდივიდებში, ამიტომ ფილოგენეტიკური ანალიზის დროს ეს ფრაგმენტი არ გამოვიყენეთ.

ხმელეთის ლოკოკინების მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდებით შესწავლის

პარალელურად ჩატარდა *H. buchi*, *H. goderdziana*, *H. pomatia*, და *H. lucorum* ნიჟარების და გენიტალიების მოფრომეტრული კვლევა. შესწავლილი იქნა ამავე სახეობების რეპროდუქციული სისტემა. ორივე კვლევის მეთოდები და მიღებული შედეგები დეტალურად აღწერილია შემდეგ პუბლიკაციაში (Mumladze et al., submitted).

2.3. მიღებული შედეგები

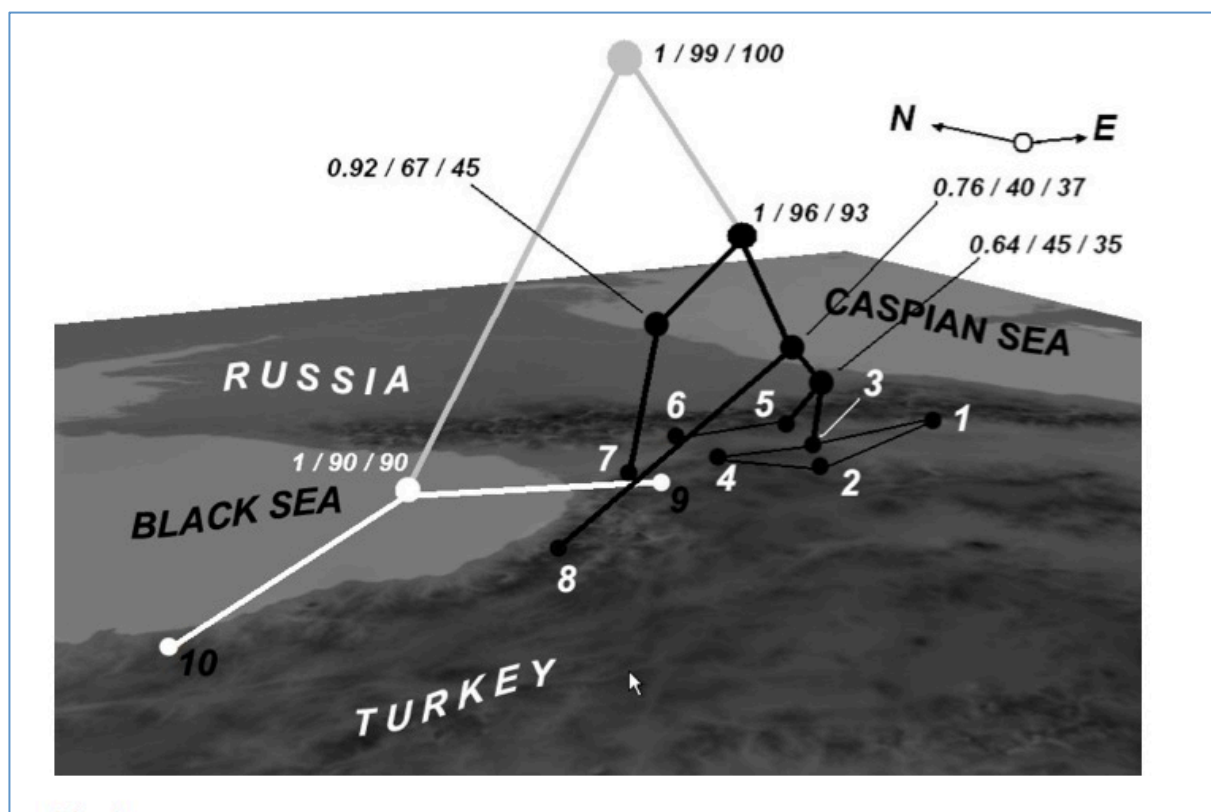
2.3.1. ტაქსონებს შორის ფილოგენეტიკური კავშირი

სექვენირების შედეგების ანალიზისას აღმოჩნდა, რომ ITS-1 გენის ღნმ-ს ფრაგმენტი (475 ნ) მცირე ვარიაციულობით ხასიათდებოდა შემდეგ ტაქსონებში: *H. goderdziana*, *H. buchi* და *H. lucorum*, სამივე სახეობა მხოლოდ ხუთი ნუკლეოტიდით განსხვავდებოდა *H. pomatia* ინდივიდებისგან. ხმელეთის ლოკოკინებში CO1 გენის ფრაგმენტის (3646) შესწავლამ გამოავლინა *H. buchi* -ის ხუთი, *H. goderdziana*- ს ორი, სამი - *H. lucorum* და ერთი of *H. pomatia*-ს ჰაპლოტიპების არსებობა, რომლებიც ერთმანეთისგან 1-15 ნუკლეოტიდით განსხვავდებოდა.

სახეობის 53 ინდივიდის 364 ნუკლეოტიდის ფრაგმენტის შესწავლისას აღმოჩნდა 92 ინფორმატიული საიტი. BA, NJ, და MP ალგორითმებით აგებული ფილოგენეტიკური ხე (სურ. 2.2) აჩვენებს 1) კავკასიის *Helix* -ების მონოფილეტურ წარმოშობას, სადაც ჯგუფგარეშე ტაქსონებია (*H. pomatia*, *H. lucorum*, და გვარ *Helicids* ხუთი სხვა სახეობა GenBank) გარდა ამისა აჩვენებს (2) *H. buchi* და *H. goderdziana* ს რეციპროკულ მონოფილეტურობას.

ხუთივე ჰაპლოტიპს CO1 გენის მიხედვით, ყველა ჩვენს მიერ ჩატარებული ანალიზის მიხედვით, აგებულ ფილოგენეტიკურ ხეში უკავია ბაზური პოზიცია. სახეობის ერთი ჯგუფი (სინჯები ბახმაროდან) იკავებს იგივე არეალს რასაც *H. goderdziana* (Bakhmaro; სურ.2.2).

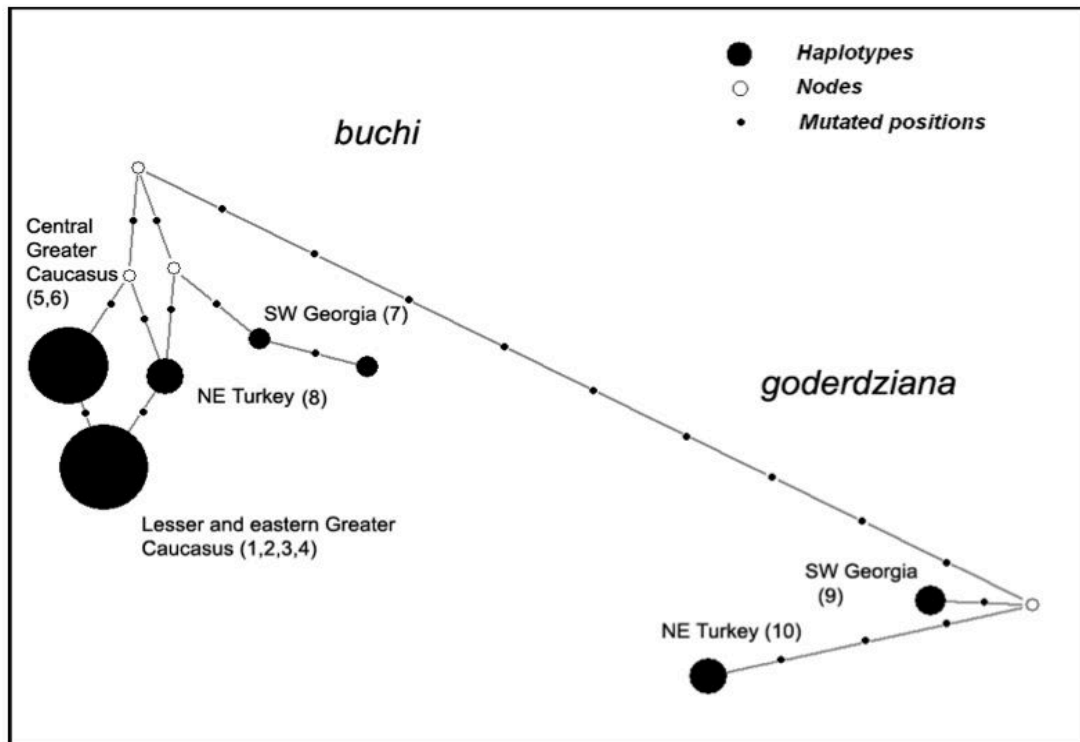
სურ.2.3. კავკასიის (*Helix*) ფილოგენეტიკური ხე



H. buchii: შავი წრეები; *H. goderdziana*: თეთრი წერილები. შავი და თეთრი ხაზები აერთიანებს ამ ორი სახეობის ინდივიდებს მათი სინჯების მოპოვების ადგილებთან. ნოდებთან მითითებული ციფრები გამოხატავს ალბათობას BA/NJ/MP. ჯგუფგარეშე ტაქსონები არაა ნაჩვენები.

ბანდელტის უახლოესი მეზობლის ალგორითმით აგებული ფილოგენეტიკური ხე (სურ.2.3) აჩვენებს *H. goderdziana* და *H. buchii* არსებულ სუსტ კავშირს. შვიდივე ჰაპლოტიპი განსხვავებული გეოგრაფიული წერტილებიდანაა. *H. goderdziana* -ს ორი ჰაპლოტიპიდან, ერთი, თურქეთის ჩრდილო დასავლეთიდან (კოვალნიკი), ხოლო

სურ. 2.4 გენეტიკური კავშირი *H. goderdziana* და *H. buchi* ჰაპლოტიპებს შორის.



შავი დიდი წრე - ჰაპლოტიპები, თეთრი წრე ნოდები. შავი მცირე წრე მუტაციები, ციფრები მიუთითებს სინჯის მოპოვების ადგილებს. რუკა 2.1-ზე

მეორე საქართველოს სამხრეთ დასავლეთი ტერიტორიიდან (გოდერძის უღელტეხილიდანაა. *H. buchi*, ორი ჰალოტიპი, სინჯის სარწმუნო ზომით, დიდი კავკასიონის ცენტრალური ნაწილიდან (მოქვა, ხევშა) ხოლო დანარჩენი ჰაპლოტიპები გავრცელებულია როგორც დიდ, ისე მცირე კავკასიონზე (ბორჯომი, ლაგოდეხი, დიდგორი, დმანისი). (სურ. 2.4). *H. buchi*-ის სამი, ბაზალური ჰაპლოტიპი წარმოშობით მცირე კავკასიონიდანაა (ჯამილი, ბახმარო).

CO1 გენის ფრაგმენტში, მოლეკულური საათის ჰიპოთეზის სარწმუნოება მხარდაჭერილია (LRT=56.8, $P<0.001$) ნუკლეოტიდების პოზიციის გათვალისწინების გარეშე. თუ მოლეკულურ საათს, მარკოს მიერ შემოთავაზებული პარამეტრებით (Marko 2002), დავაკალიბრებთ მაშინ *H. buchi* სახეობის ორ ხაზს შორის დივერგენციის ასაკი 0.1-1.1 მილიონი წელია. საშუალო ასაკი როცა ორი სახეობა *H. buchi* და *H. goderdziana* ერთმანეთს გაემიჯნა 3.36 მილიონი წელია (95% CI 1.7- 4.5 მილიონი წელი). ცხადია, ეს გათვლები არაა ზუსტი, მაგრამ გვარ *Helix* ორი სახეობის *H. buchi* და *H. goderdziana* წარმოშობა გამყინვარებამდე უნდა მომხდარიყო.

ნიუარის მორფომეტრული და რეპროდუქციული სისტემის კვლევა დეტალურად აღწერილია (Mumladze et al., 2012).

2.4. შედეგების ანალიზი და დისკუსია

Helix buchi და *H. goderdziana* -ს მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდებით კვლევამ აჩვენა ამ ორი სახეობის რეციპროკული მონოფილეთურობა. თუ მხედველობაში მივიღებთ მათ მორფოლოგიურ მსგავსებას, გეოგრაფიულ გავრცელებას, ეკოლოგიურ ნიშებს, მაშინ ეს ორი სახეობა შეიძლება ჩაითვალოს და სახეობებად. მაგრამ ამ ვარაუდის დასამტკიცებლად საჭიროა გვარ *Helix* -ის სხვა სახეობების კვლევა.

ორი სახეობის *H. goderdziana* და *H. buchi* -ის მოლეკულურ-გენეტიკურმა კვლევამ და ნიუარის მორფომეტრიულმა (Mumladze et al., 2012) კვლევამ დაასაბუთა რომ ისინი არიან დისტინქტური ევოლუციური სახეობები, რომელთა წინაპრების იზოლაცია გამონწველი იყო ტენიანი ტყეების ფრაგმენტაციით, ტყის საფარის აღდგენის შემდეგ ამ ორ ჯგუფს შორის იმდენად დიდი განსხვავებები დაგროვდა რომ არ მოხდა მათი პანმიქსია. თუ მხედველობაში მივიღებთ იმ გარემოებასაც რომ ამ სახეობების წინაპრები მსგავს გეოგრაფიულ და კლიმატურ პირობებსი ცხოვრობდნენ გასაკვირი აღარ უნდა იყოს მათ შორის არსებული მორფოლოგიური მსგავსება.

თავი 3. გენების ინტროგრესია *Gazella subgutturosa* და *G. marica*- შორის, არის მიტოქონდრიული დნმ-ს კვლევა საკმარისი სახეობის დასადგენად?



3.1. შესავალი

ვაჩერისა და მისი თანაავტორების (Wacher et al. 2011) მიერ გამოითქვა ვარაუდი რომ ჯეირნის ორი ტრადიციული სახეობა *Gazella subgutturosa subgutturosa* და *Gazella subgutturosa marica* არის დედის საზით პარათილეტური წარმოშობის. მათი რეკომენდაციით, რეინტროდუქციის დაწყებამდე, სახეობების იდენტიფიცირება უნდა მომხდარიყო მტ დნმ-ს ციქრომ ბ გენით. სხვა მკვლევარები (Groves & Harrison 1967; Groves 1997; Mallon & Kingswood 2001; Durmus 2010) აღნიშნავენ რომ საკმაოდ დიდ გეოგრაფიულ ტერიტორიაზე (სირია, ჩრდილო ერაყი, დასავლეთ ირანი) გავრცელებულია ისეთი ინდივიდები, რომლებსაც ორივე ნომინალური სახეობების მორფოლოგიური ნიშნები აქვთ. მათი ვარაუდით ასეთი ინდივიდები არიან ბუნებრივი ჰიბრიდები. ტიპური *G. subgutturosa*-ს მდედრებს არ აქვთ რქები, ხოლო *G. marica*-ს მდედრებს აქვს კარგად განვითარებული რქები. არსებობს მდედრების ჯგუფი, რომელთაც აქვთ სუსტად განვითარებული რქები (Groves & Harrison 1967; kingswood 2001. Wacher et al., 2011).

მეცნიერთა ჯგუფმა, შეისწავლა რა ხუთი *Gazella subgutturosa*-ს ინდივიდი ჩრდილოეთ ერაყიდან, გამოთქვა ვარაუდი რომ თუ ადგილი აქვს ჰიბრიდიზაციას, მაშინ ის მხოლოდ მამის საზით ხდება (Wacher et. al 2011).

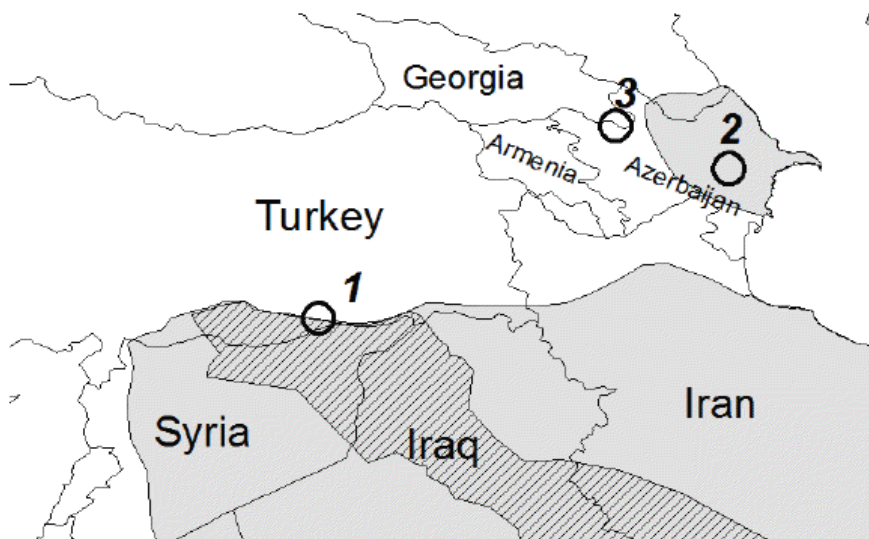
ჩვენ შევისწავლეთ *Gazella subgutturosa* ორი პოპულაცია: ერთი კავკასიის აღმოსავლეთიდან (აზერბაიჯანი) და მეორე სამხრეთ-აღმოსავლეთ თურქეთიდან. ჩვენი მიზანი იყო დაგვედგინა არის თუ არა ეს ორი ჯგუფი გენეტიკურად განსხვავებული და შესაძლებელია თუ არა ორივე ჯგუფის ინდივიდების რეინტროდუქცირება ვაშლოვანის ეროვნულ პარკში.

3.2. მასალა და მეთოდი

ჩვენ შევისწავლეთ ჯეირნის 12 ინდივიდი აზერბაიჯანიდან (შირვანის ეროვნული პარკი)(# 2, რუკა 3.1) და 4 ინდივიდი თურქეთიდან, ცეილანპინარის მეურნეობიდან (# 1, რუკა 3.1) (Kasperek 1986; Dormus 2010) - ეს ინდივიდები, თურქეთიდან საქართველოში ჩამოიყვანეს რეინტროდუქციის მიზნით (# 3, სურ. 3.1). აზერბაიჯანის პოპულაცია

ვრცელდება *Gazella subgutturosa* არეალში, მაშინ როცა ცეილანპინარის მეურნეობა ახლოსაა სავარაუდო ჰიბრიდულ ზონასთან (Groves 1997; Wacher et al., 2011), თუმცა ორივე პოპულაციის ინდივიდები აღწერილია როგორც *Gazella subgutturosa* (Drumus 2010).

სურ 3.1. ჯეირნის სინჯების მოპოვების ადგილები



1- აღმოსავლეთ თურქეთის პოპულაცია, 2- აზერბაიჯანის პოპულაცია, 3- საქართველოს პოპულაცია. რუხი ფერით აღნიშნულია ჯეირნის არეალი, დაშტრიხულია ორი ქვესახეობის *G. subgutturosa* და *G. marica* ჰიბრიდიზაციის ადგილი

დნმ-ს ექსტრაქციის, პჯრ და სექვენირების პირობები აღწერილია პუბლიკაციაში (Murtskhvaladze et al., 2010). მტ დნმ-ს ციტოქრომ ბ შვეისწავლეთ პრაიმერების წყვილით L14724 და H15149 (დანართი 5) (Kocher et al 1989; Wacher et al 2011). ანალიზისთვის გამოვიყენეთ Gnebank-ში გამოქვეყნებული სიჯნები ნომრებით: HQ316150-HQ316165; AF030611-AF030612; AF187718; AF187696 Rebholz &Harley 1999; Hammond et al., 2001; Wacher et al., 2011). ჩვენს მიერ მიღებული ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობებში აღმოჩნდა 18 ვარიანტული საიტი, რითაც *Gazella subgutturosa*

subgutturosa და *Gazella subgutturosa marica*-ირჩევა ერთმანეთისგან (Murtskhvaladze et al., 2012 Table 2)

3.3. მიღებული შედეგები და მათი ანალიზი

ყველა სინჯს, რომელიც აზერბაიჯანიდან იყო მოპოვებული, აქვს დედის ხაზით ისეთივე ჰაპლოტიპი, როგორც *G. subgutturosa* და იდენტურია გამოქვეყნებული HQ 316159 სინჯისა. თურქეთიდან მოპოვებულ ყველა სინჯი იდენტურია HQ316162 სინჯისა და აქვს *G. marica* დამახასიათებელი ჰაპლოტიპი. ამავე დროს, ორივე პოპულაციის მდებრებს არ აქვთ რქები და მორფოლოგიურად იდენტიფიცირება როგორც *G. subgutturosa* (სურ.3.1). ამის ახსნა შესაძლებელია *G. subgutturosa* და *G. marica* მდებრებს შორის ჰიბრიდიზაციის არსებობით, რასაც თან სდევს გენების ინტროგრესია. გეოგრაფიული ტერიტორია, სადაც ამ ორი ტაქსონომიური ჯგუფის ინდივიდების ჰიბრიდიზაციას შეიძლება ჰქონდეს ადგილი ძალიან დიდია. ჩვენი ვარაუდით *G. subgutturosa* და *G. marica* შორის ჰიბრიდიზაცია, დასავლეთ აზიაში, ბუნებრივი პროცესია და ადამიანის საქმიანობასთან კავშირი არ აქვს. მიტოქონდრიული დნმ-ს ინტროგრესია არ არის იშვიათი და აღწერილია მრავალ ახლომონათესავე ტაქსონში (Senn&Pemberton 2008; Senn et al., 2010; Trigo et al, 2008). შესაძლებელია, მიტოქონდრიული დნმ-თ და რეკომბინანტული მარკერებით ან მორფოლოგიური ნიშნებით დადგენილი სახეობების ბიოლოგიური საზღვარი განსხვავდებოდეს, ამიტომაც სახეობების იდენტიფიცირებაში ბირთვულ მარკერებს უფრო მეტი მნიშვნელობა ენიჭება ვიდრე მტ დნმ-ს სექვენირებით მიღებული ფრაგმენტების ანალიზს (Prager et al., 1993; Beysard et al., 2012). ინტროგრესია არ არღვევს სახეობების გენეტიკური საზღვარს (Hagen and Taylor 2001; Mallet 2005), არამედ ზრდის გენოფონდს და შესაბამისად, მრავალფეროვნებას (Neaves et al., 2010). ზოგიერთი მოსაზრებებით ბუნებრივი ჰიბრიდები შესაძლებელია წარმატებით იქნან გამოყენებული რეინტროდუქციის მიზნით (Hutchings et al., 2008)

სურ. 3.2. ჯეირნის მდედრი (ურქო) და მამრი (რქებით) ინდივიდები აღმოსავლეთ თურქეთის პოპულაციიდან.



ჯეირნის ჰაბიტატი აღმოსავლეთ აზიასა და კავკასიაში მრავალი ასეული წლის განმავლობაში განიცდის ადამიანის ზემოქმედებას (Abbo et al., 2010). ადამიანის სამეურნეო საქმიანობას უკავშირდება ამ რეგიონის ლანდშაფტის ცვლილებაც (Zazanashvili et al., 2004; Abbo et al., 2010; Tarkhnishvili et al., 2012). დღესდღეობით, ჯეირნისთვის ვარგისი ჰაბიტატი ფრაგმენტირებულია, ხოლო სახეობის კავკასიური პოპულაცია მცირე რიცხოვან იზოლირებული ჯგუფების სახითაა წარმოდგენილი (Mallon 2008; Durmuş, 2010). სახეობის ფრაგმენტაციას მოჰყვება გენეტიკური მრავალფეროვნების შემცირება და გენების დრეიფით გამოწვეული ნეგატიური ეფექტის გაზრდა რაც თავის მხრივ ამცირებს სახეობის გადარჩენადობის უნარს (Frankham et al., 2004). ასეთ შემთხვევებში რეინტროდუქცია და რესტოკინგი ოპტიმალური კონსერვაციული სტრატეგიებია (Kleiman 1989; Abbott 2000; Grey-Ross et al., 2009; Hayward 2011; Wronski et al., 2012). მნიშვნელოვანია განისაზღვროს, რომელი პოპულაციის ინდივიდები გამოვიყენოთ რეინტროდუქციის წყაროდ? ბუნების დაცვის მსოფლიო კავშირის (IUCN) რეკომენდაციით, სარეინტროდუქციო და აბორიგენი პოპულაციები გენეტიკურად მსგავსი უნდა იყოს. მეორეს მხრივ, რეინტროდუქციისთვის განსაზღვრული ინდივიდები მაღალი გენეტიკური მრავალფეროვნებით უნდა

ხასიათდებოდნენ რომ ინბრიდინგის რისკი მინიმუმამდე იქნას შემცირებული (Frankham et al., 2004; Hutchings et al., 2008). დიდი ალბათობით შეგვიძლია ვთქვათ რომ არ არსებობს ბუნებრივად შექმნილი გეოგრაფიული ბარიერი, რომელიც, დასავლეთ აზიაში, ჯეირნის პანმიქტურობას შეუშლიდა ხელს. მორფოლოგიურად გარდამავალი ფორმების არსებობა *G. subgutturosa* -ს კიდურა პოპულაციებში, *G. marica*-ს ჰაპლოტიპის არსებობა მიუთითებს იმაზე, რომ გენების ინტოგრესია და ჰიბრიდიზაცია ბუნებრივი მოვლენაა. მნიშვნელოვანია გავითვალისწინოთ რომ საქართველოში, რეინტროდუქციის მიზნით შერჩეული ინდივიდები, მორფოლოგიურად და ეკოლოგიურად არ უნდა განსხვავდებოდნენ 1970 წლებში გადაშენებული ჯეირნის პოპულაციისგან. შესაძლოა აღმოჩნდეს რომ *G. subgutturosa*-ს ინდივიდები, რომელთაც *G. marica*-ს ჰაპლოტიპი აქვთ გენეტიკურად უფრო ახლოს იდგნენ ჯეირნების იმ ჯგუფთან, რომელიც გავრცელებულია დასავლეთ აზიაში, ვიდრე მონღოლეთსა და ჩინეთში გავრცელებულ *G. subgutturosa*-ს ინდივიდებთან, რომელთაც *G. subgutturosa*-ს ჰაპლოტიპი აქვთ. ასეთი ტენდენცია დამახასიათებელია გეოგრაფიულად ახლომდგომ, მაგრამ მატრილინეარულად განსხვავებული ჯგუფებისთვის (Prager et al., 1993; Tarkhnishvili et al., 2001).

მართალია, ყოველთვის არსებობს საფრთხე იმისა რომ, კონსერვაციული ქმედებების განხორციელებისას მოხდეს ადგილობრივი მცირერიცხოვანი ან გადაშენებული პოპულაციისგან გენეტიკურად მცირედ განსხვავებული ინდივიდების რეინტროდუქცია. მიუხედავად ამისა, ზოგჯერ ფრაგმენტირებული, გადაშენების საფრთხეში მყოფი პოპულაციების გენოფონდის გამრავალფეროვნება ასეთი ინდივიდების ინტროდუქციის გზით შეიძლება ერთადერთი გამოსავალი იყოს.

დანამდვილებით შეგვიძლია განვაცხადოთ რომ, ჯეირნის პოპულაციის შუააზიური, თუნდაც ჰიბრუდული ინდივიდები, შესაძლებელია, გამოყენებული იქნას საქართველოში ჯეირნის რეინტროდუქციის განსახორციელებლად, მიუხედავად იმისა რომ ჯეირნის ახლოაღმოსავლური პოპულაცია დედის ხაზით უფრო სახლოსაა მასთან წარმოშობით. ამასთან ჯეირნის რეინტროდუქციის მიზნით ინდივიდების შესარჩევად მხოლოდ მტ ღნმ-ს ფრაგმენტების გენეტიკური კვლევა არაა საკმარისი, აუცილებელია ბირთვული ღნმ-ს მარკერების და მორფოლოგიურ ნიშნების საფუძვლიანი კვლევა.

თავი 4. კავკასიის კლდის ხვლიკების სახეობათწარმოქმნა
(*Rudis*) ჯგუფის მაგალითზე



4.1. შესავალი

სახეობათწარმოქმნის მთავარ მიზეზად დივერგენცია ითვლება, რაც საბოლოოდ იწვევს ევოლუციურად დამოუკიდებელი ჯგუფების ფორმირებას (Hey 2001; de Queiroz 2007). დივერგენცია გამოწვეულია სივრცული იზოლაციით (Mayr 1982), განსხვავებულ ბუნებრივ პირობებთან ადაპტაციით (Turelli et al., 2001; Dobzhansky 1937), და ქცევითი გასხვავებებით (Hoskin et al., 2005; Lukhtanov et al., 2005). ქუერიოზას (Queiroz 2007) მიხედვით ახლომონათესავე ჯგუფების სხვადასხვა სახეობად გამოყოფის მთავარი კრიტერიუმია მათი განსხვავებული ევოლუციური ხაზების წარმოქმნა. ამ დროს მნიშვნელოვანია განიმარტოს რას დავარქმევთ განსხვავებულად ევოლუირებად ხაზს? მრავალ ახლომონათესავე სახეობებში, მათი არეალის გადაფარვის ადგილებში, აღწერილია ჰიბრიდული ზონის არსებობა, თუმცა უმრავლეს შემთხვევაში, ჰიბრიდები ბუნებრივი გადარჩევის წნეხის ზემოქმედების ქვეშ იმყოფებიან და გადარჩევა მშობელი სახეობების სასარგებლოდ მიმდინარეობს (Barton & Hewitt 1985; Jiggins et al., 1997; Arias et al., 2008).

არ შეიძლება დაბეჭითებით ითქვას რა მოხდება გარკვეული დროით იზოლაციის შემდეგ, შესაძლებელია თუ არა სრული ასიმილაცია მეორადი კონტაქტის შემთხვევაში? დივერგენტული პოპულაციების ევოლუციური სტატუსის კვლევისას მნიშვნელოვანია დადგინდეს ის მექანიზმები, რაც აფერხებს ასიმილაციის პროცესს ამ ჯგუფებში.

კავკასიის კლდის ხვლიკების, *Darevskia "rudis"* კლადის, სამი სახეობის: *Darevskia rudis*, *D. portschinskii*, და *D. valentini* ევოლუციის სურათის აღსადგენად, ჩვენ გამოვიყენეთ კვლევის ფილოგენეტიკური და პოპულაციურ-გენეტიკური მეთოდები (Murphy et al., 2000). დასაწყისში, ეს სახეობები "*Lacerta saxicola*" ქვესახეობებად აღიწერა (Nikolsky, 1913), მოგვიანებით გამოიყო როგორც ცალკე სახეობები (Bannikov et al., 1977). დარევსკიმ (Darevskii 1967) შეიმუშავა ის დიაგნოსტიკური ნიშნები, რომლის მიხედვითაც ხდება კლდის ხვლიკების სახეობების იდენტიფიცირება. ზრდასრული *D. rudis* და *D. valentini* დიდი ზომისაა ვიდრე *D. portschinskii*; სამივე სახეობა ერთმანეთისგან ანალური ქერცლებითაც განსხვავდება (Tarkhnishvili et al., 2012) სამი

სახეობის გეოგრაფიული არეალი არ გადაიფარება (სურ. 4.1; 4.2). *D. valentini* ბინადრობს მცირე კავკასიონის მშრალ და ცივ ადგილებში, ზღვის დონიდან 1500-3000მ. *D. portschinskii* მცირე კავკასიონის ცენტრალურ ნაწილში, სადაც მაღლი ტემპერატურა და სიმშრალეა, ზ.დ 500-1500მ. *D. rudis* აქვს უფრო ფართო გავრცელება, მისი არეალი მოიცავს მთელ კავკასიას და მცირე აზიას ზ.დ. 0-2000 მ (Darevskii, 1967).

გვარ *Darevskia*-ს მტ დნმ-ის და პოლიმორფული ალომიმების შესწავლამ ამ გვარის ფილოგენიის განსხვავებული შედეგები აჩვენა (Fu *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 2000; MacCulloch *et al.*, 2000; Tarkhnishvili, 2012). აღნიშნული კვლევა თითოეული სახეობის ინდივიდების მცირე რიცხვს ემყარებოდა, გაანალიზდა ერთი *D. rudis*, ოთხი *D. portschinskii*, და ხუთი *D. valentine* სინჯი (Murphy *et al.*, 2000). თითოეული სახეობის ასეთი მცირე რაოდენობის ინდივიდების ანალიზი არ იძლევა სარწმუნო შედეგს. ამ კვლევებით შეუძლებელია ამ სამი სახეობის პოპულაციების გენეტიკური სტრუქტურის შეფასება.

ჩვენ შევისწავლეთ კავკასიის კლდის ხვლიკების, *Rudis* ჯგუფის გავრცელების 187 წერტილი და გავაანალიზეთ *D. rudis*, *D. portschinskii*, და *D. valentini* სინჯები საქართველოს მთელი ტერიტორიიდან და აღმოსავლეთ თურქეთის ნაწილიდან (რუკა 4.1). ჩვენ შევისწავლეთ მათი გეოგრაფიული გავრცელება, მიტოქონდრიული ჰაპლოტიპები და მიკროსატელიტური გენოტიპები.

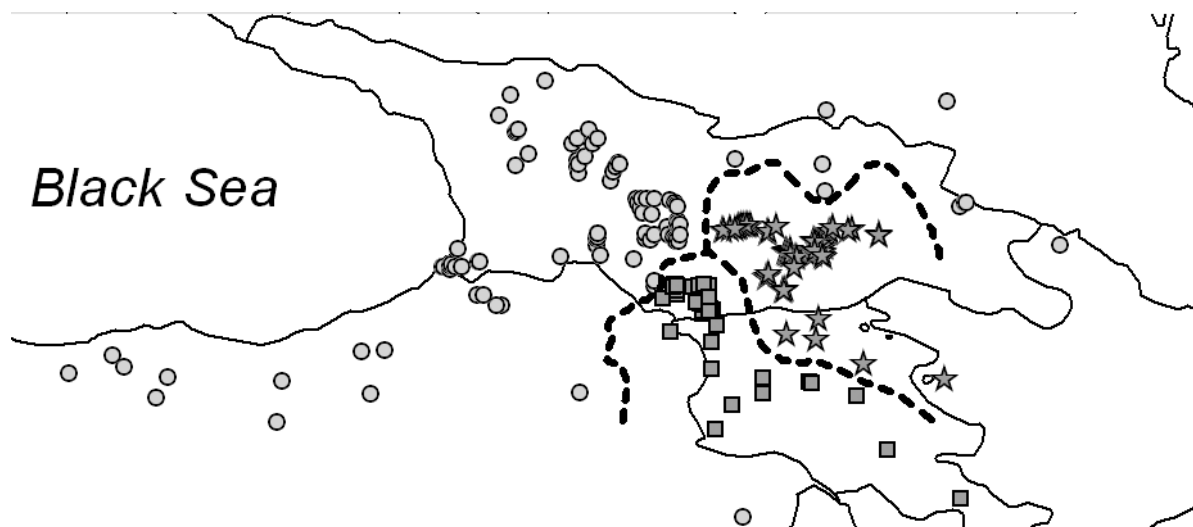
Rudis კლადის სახეობების გენეტიკური კვლევა (მტ დნმ, მიკროსატელიტური მარკერებით გენოტიპირება) მიზნად ისახავდა ამ კლადის ევოლუციური ისტორიის რეკონსტრუირებას. უფრო კონკრეტულად: გაგვეჩვენა რომელი ნომინალური სახეობა არის მონოფილეთური, მიმდინარეობს თუ არა ჰიბრიდიზაცია ამ კლადის სახეობებს შორის, როგორ ხდება გენების მიმოცვლა ჰიბრიდულ ზონაში, რა კავშირია გენების მიმოცვლის ინტენსივობასა და დივერგენციას შორის.

4.2. მასალა და მეთოდი

4.2.1. სინჯების შეგროვება, დნმ-ს ექსტრაქცია და მტ დნმ-ს კვლევა

სამი წლის განმავლობაში (2008-2011), ჩვენმა კვლევითმა ჯგუფმა, კლდის ხელიკების არეალის ფარგლებში შეისწავლა და სინჯები შეაგროვა *D. portschinskii*-ის 67, *D. valentini*-ის 30 და *D. rudis* t-ის 90 ლოკალიტეტიდან. ტერიტორია მოიცავდა საქართველოს მთლიანად და თურქეთის აღმოსვალეთ ნაწილს. საერთო ჯამში შესწავლილია არეალის *D. portschinskii* 70%; *D. rudis* და *D. valentini*, 30%. სახეობების იდენტიფიცირებისთვის ვიყენებდით იმ სადიაგნოსტო ნიშნებს, რომელიც აღწერილია დარევსკის მიერ (Darevskii, 1967). ჰაბიტატის აღწერის მეთოდოლოგია დაწვრილებით განხილულია (Tarkhnishvili et al., 2010).

სურ. 4.1. Rudis კლადის სამი სახეობის სინჯების მოპოვების ადგილები



Darevskia rudis (წრე), *D. portschinskii* (ვარსკვლავი) და *D. valentini* (კვადრატი).

დნმს ექსტრაქცია მოხდა 131 *rudis*, 81 *portschinskii* და 42 *valentini* სინჯებიდან. მტ დნმ-ს ციტოქრომ ბ ფრაგმენტის ამპლიფიცირებისთვის გამოვიყენეთ პრაიმერების წყვილი: L14841 და H15149 (დანართი 5) (Kocher et al., 1989; Murphy et al., 2000). პჯრ-ს რეაქციის პირობები და ტემპერატურული რეჟიმი აღწერილია (Tarkhnishvili et al., 2012)

ჩვენს მიერ მიღებული დნმ-ს ფრაგმენტებში ნუკლეოტიდების თანმიმდევრობები განთავსებულია საერთო მონაცემთა ბაზაში (Genebank) ნომრებით: JN546146-JN546194. ანალიზი ეფუძნებოდა 320 ნუკლეოტიდის სიგრძის მქონე ფრაგმენტებს. ანალიზში გამოვიყენეთ საერთო მონაცემთა ბაზიდან Genebank (*D. rudis* 1, *D. portschinskii* 1, *D. valentini*, 3 და გვარ *Darevskia* 12 სხვა სახეობის დნმ-ს ჰომოლოგიური ფრაგმენტები).

მოლეკულური საათის კალიბრაციისთვის გამოვიყენეთ ახლომონათესავე სახეობის *Iberolacerta*-ს ციტოქრომ ბ მუტაციის სიჩქარე (Crochet *et al.*, 2004).

4.2.2 ბირთვული დნმ-ს კვლევა

კლდის ხვლიკების 226 სინჯში (125 *D. rudis*, 76 *D. portschinskii* და 25 *D. valentini*) შევისწავლეთ 5 მიკროსატელიტური ლოკუსი: Du215, Du281, Du323, Du418 და Du47 (Korchagin *et al.*, 2007). ჰჯრ-ს და გენოტიპირების პირობები, ანალიზური ალგორითმები დეტალურად აღწერილია (Tarkhnishvili *et al.*, 2012)

მიგრაცია, ხშირად დამოკიდებულია ორგანიზმების სქესზე, ამიტომ ჩვენ ჩავატარეთ ანალიზი ცალკე მტ დნმ-ს და ცალკე ბირთვული დნმს მიხედვით. გამოვთვალეთ ლოკუსებზე ალელების შეჭიდულობა გეოგრაფიულ პოპულაციებში (Tarkhnishvili *et al.*, 2012 Table 2).

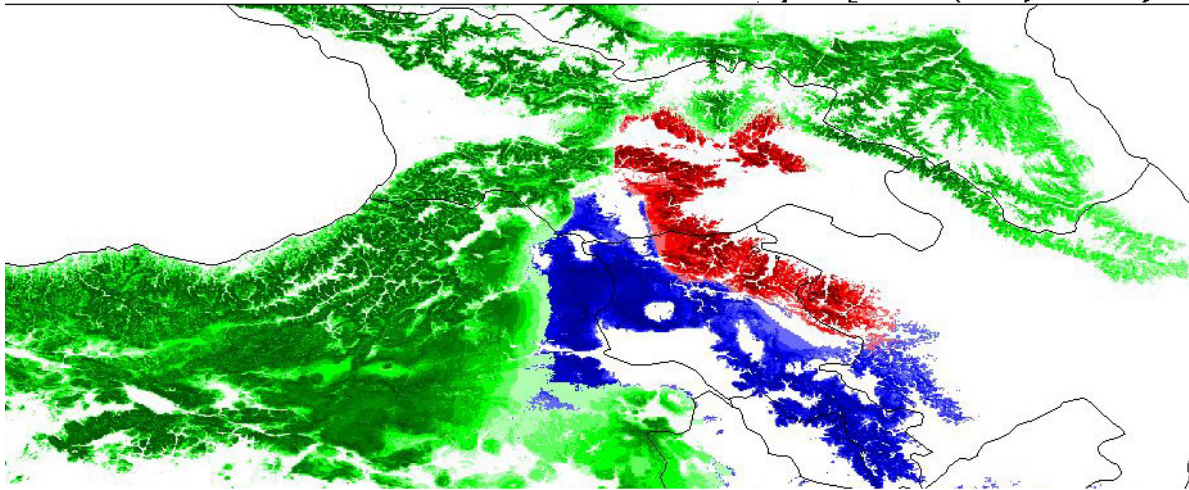
4.3 მიღებული შედეგები

4.3.1 ჰაპლოტიპების სივრცული გავრცელება და მტ დნმ-ს ფილოგენია

კლიმატური პარამეტრების ანალიზის მიხედვით “*Darevskia rudis*” კლადის სახეობების გავრცელების მოდელი ნაჩვენებია სურ. 4.2. მოდელის მიხედვით კარგადაა *D. portschinskii*, *D. rudis* და *D. valentini*, სახეობების არეალი გამოყოფილი (Tarkhnishvili *et al.*, 2012. fig. 3).

სამი სახეობის მორფომეტრული ანალიზის შედეგები დეტალურად აღწერილია (Tarkhnishvili *et al.*, 2012).

სურ.4.2. *Rudis* კლადის სამი სახეობის არეალი მოდელირების (Tarkhnishvili et al., 2012 მიხედვით)



Darevskia rudis (მწვანე), *D. valentini* (ლურჯი) და *D. portschinskii* (წითელი).

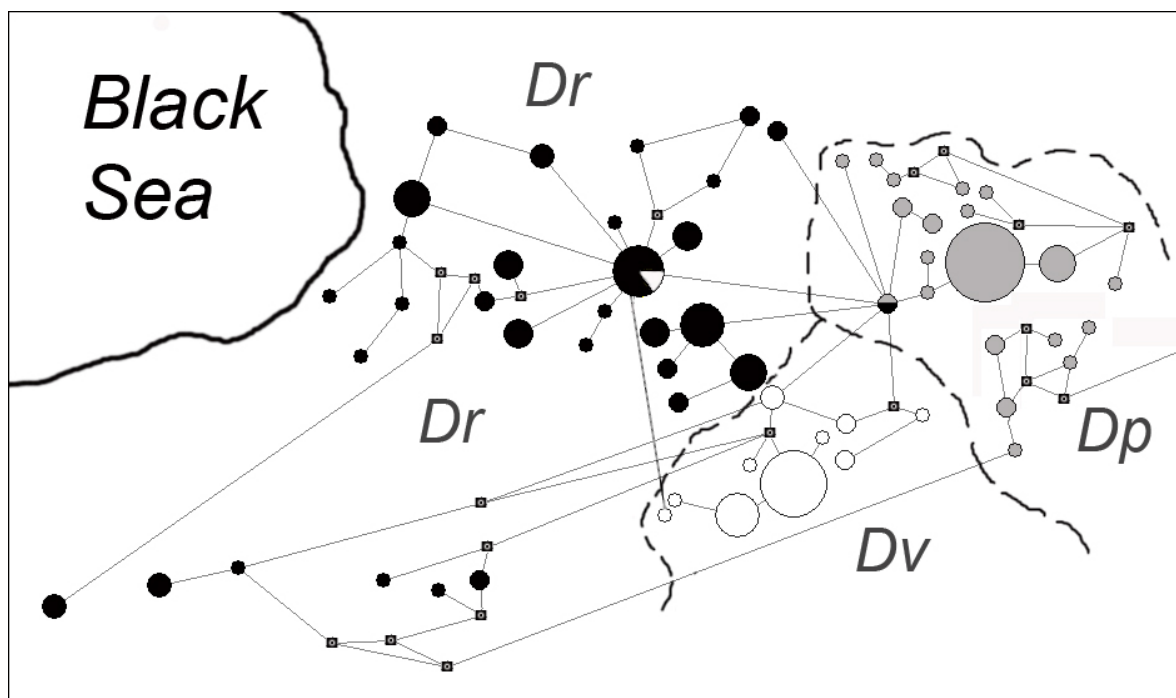
მტ ღნმ-ს 320 ნუკლეოტიდის სიგრძის ფრაგმენტს, სამი სახეობის კლდის ხვლიკებში, აქვს 55 ვარიანტული საიტი. ნუკლეოტიდების ცვლილების მოდელელებში ყველაზე დაბალი აკაიკის (AIC) კოეფიციენტი აქვს ჰასეგავა-კიშინო-იანო-ს (HKY+G) მოდელს.

ბაიეზის ანალიზი, ალბათობის მაღალი მაჩვენებლით (> 0.99), აჩვენებს შიდაჯგუფურ მონოფილეტურობას. სტატისტიკურად ყველაზე სარწმუნო ხე აერთიანებს 4 მთავარ კლადას, საიდანაც ორ კლადაში გაერთიანებულია სამივე ნომინალური სახეობის ჰაპლოტიპები, ერთი კლადა კი ერთიანებს მხოლოდ *D. rudis* და *D. valentini* ჰაპლოტიპებს, რამაც დაასაბუთა ამ სახეობების პოლიფილეტიური წარმოშობა დედის ხაზით, ამიტომაც კლადების სტატისტიკური მხარდაჭერა არ იყო მაღალი (< 0.5 ოთხი მთავარი კლადისთვის).

უახლოესი მეზობლის ალგორითმით აგებული ხე მოცემულია (სურ. 4.3). სამი ნომინალური სახეობიდან არცერთი არ წარმოადგენს ჰომოგენურ მონოფილეტურ ჰაპლო-ჯგუფს. ბაზალური ჰაპლოტიპი ეკუთვნის *D. portschinskii*-ს სინჯებს სამხრეთ

საქართველოდან და სომხეთიდან, ეს წინაპარ ფორმად შეიძლება ჩაითვალოს, მეორე ბაზალური ჰაპლოტიპისთვის, რომელიც აერთიანებს *D. valentine*-ს და *D. rudis*-ის იმ ინდივიდებს, რომელთა სინჯებიც თურქეთიდანაა მოპოვებული. თავის მხრივ, ეს ჰაპლოტიპი წარმოადგენს წინაპარს იმ ერთი *D. rudis* და ერთი *D. portschinskii*, რომლებიც დაკავშირებული არიან ექვს სხვა ტერმინალურ ჰაპლოტიპებთან. ეს უკანასკნელი აერთიანებს *D. portschinskii* და *D. rudis* უმრავლესობას და რამოდენიმე *D. valentini* ინდივიდს (სურ. 4. 3).

სურ. 4.3. Rudis კლადის სახეობების ევოლუციის სცენარი.



წრეებით აღნიშნულია ნოდები, ნოდებში ფერები მიუთითებს და ჰაპლოტიპების წილს. რუხი = *portschinskii*, თეთრი = *valentini*, შავი = *rudis*. საზღვრით აღნიშნულია კავშირი ჯგუფებს შორის.

მტ დნმ-ს IM ალგორითმით ანალიზისას აღმოჩნდა, რომ დედის ხაზით დივერგენციის ასაკი 483 ათასი წელი *D. rudis*-სა და *D. portschinskii*-ს შორის, 348 ათასი წელი *D. portschinskii*-სა და *D. valentini* შორის, ხოლო 220 ათასი წელი *D. rudis*-სა და *D. valentine*-ს შორის (სურ. 4.5 (a)). მიგრაციის პარამეტრების ანალიზი აჩვენებს მტ დნმს ჰაპლოტიპების ინტროგრესიას, გენების მიმოცვლას *D. valentini* -დან *D. rudis* -

ისკენ და *D. valentine*-დან ან *D. rudis*-დან *D. portschinskii*-კენ. მიგრაციის ალბათობა სხვა მიმართულებით თითქმის ნულის ტოლია (სურ.4.5 (a)).

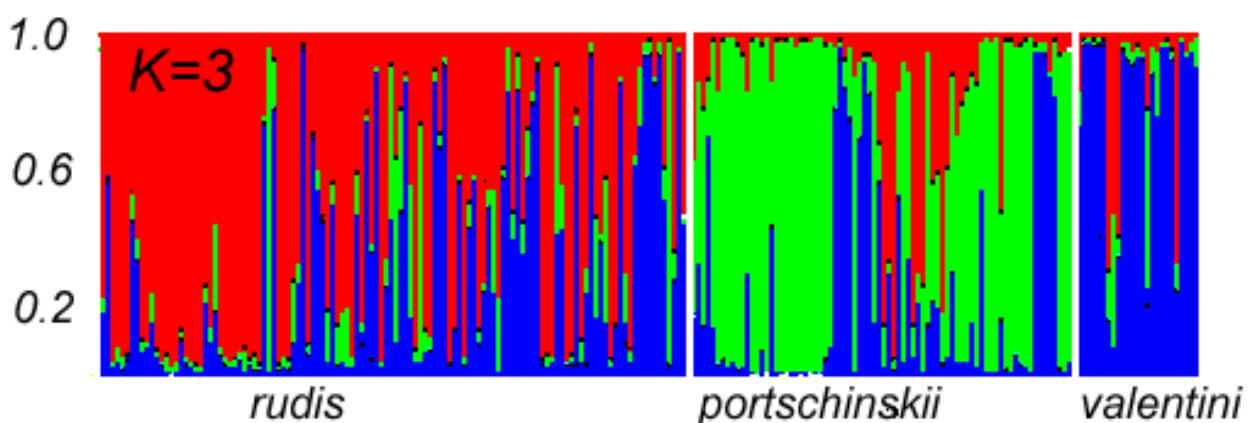
4.3.4. გენოტიპირების შედეგები

მიკროსატელიტების კვლევამ აჩვენა, რომ ალელების რიცხვი მერყეობს 7-16 თითოეულ შესწავლილ ლოკუსზე. ალელების საშუალო რიცხვი მერყეობს 8.2 *valentini* -ს და 12.6 *rudis* -ის სახეობებში. DK მნიშვნელობები მოცემულია. ანალიზმა აჩვენა ყველაზე მაღალი ალბათობა, როცა კლასტერების რაოდენობა $K=3$ (Tarkhnishvili et al., 2012).

სვეტების ვიზუალური ანალიზი აჩვენებს, რომ პირველ კლასტერში გაერთიანებულია *D. rudis*, მეორეში *D. portschinskii*, მესამეში *D. valentini*. ზოგიერთ სინჯში ჩანს გენეტიკურად “არასუფთა” ინდივიდები (სურ. 4.4). კლასტერების გეოგრაფიული გავრცელების ალბათობებმა აჩვენა რომ პირველი კლასტერის ყოფნის ალბათობა ემთხვევა *D. rudis* -ის გავრცელებას და *D. portschinskii* უკიდურეს დასავლურ გეოგრაფიულ პოპულაციას.

მე-2 კლასტერში გაერთიანებული ინდივიდები *D. portschinskii* არეალს, გარდა დასავლეთ პოპულაციებისა. ხოლო მესამე კლასტერი გავრცელებულია იქ, სადაც გეოგრაფიულად ვრცელდება *D. valentini* (სურ. 4.6)

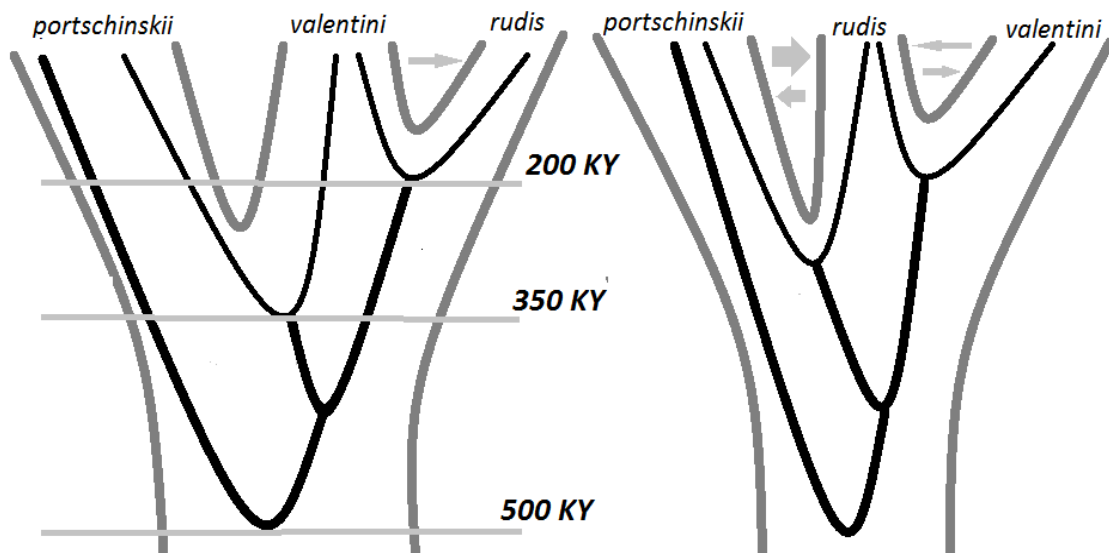
სურ.4.4. *D. rudis*, *D. portschinskii* და *D. valentini* გენოტიპების ანალიზი STRUCTURE-ის მიხედვით.



თითოეული სვეტის ფერი მიუთითებს ინდივიდის კლასტერში კუთვნილების ალბათობას.

თითქმის ყველა შესწავლილ გეოგრაფიულ პოპულაციებში, ალელები ჰარდი-ვაინბერგის წონანორობაში იმყოფება. თუმცა, სამი გეოგრაფიული პოპულაციის ალელების 5-6 წყვილი, შესწავლილი 10-დან სარწმუნოდ ($P < 0.05$) გადახრილია წონასწორობიდან, ესენია ხრამის, მადატაფას და მტკვრის გეოგრაფიული პოპულაციები და ვრცელდებიან *D. valentini* და *D. rudis* ან *D. portschinskii* სახეობების ჰიბრიდულ ზონაში.

სურ. 4.5. იზოლაციის და მიგრაციის შეფასება მითოქონდრიული (მარცხნივ) და ბირთვული (მარჯვნივ) დნმ-ს მიხედვით.



რუხი ხაზები = სახეობის ფილოგენეტიკური ხე; რუხი ისრები = გენების მიმოცვლა წარსულში და ახლანდელ დროში; შავი ხაზები = გენების ხე.

მიკროსატელიტური ალელების ანალიზმა IM მოდელის მიხედვით დივერგენციის დროის დასადგენად აჩვენა უფრო ადრეული დივერგენცია *D. rudis*-სა და *D. portschinskii*-ს შორის ვიდრე *D. rudis*-სა და *D. valentini*-ს შორის.

ნომინალურ სახეობებში ნებისმიერი მიმართულებით მიგრაციული პარამეტრების შეფასებამ აჩვენა რეკომბინანტული გენების მიმოცვლის არსებობა ყველა

მიმართულებით, გარდა *D. valentine*-სა და *D. portschinskii*-ს შორის, ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი იყო *D. portschinskii*-დან *D. rudis* -ში.

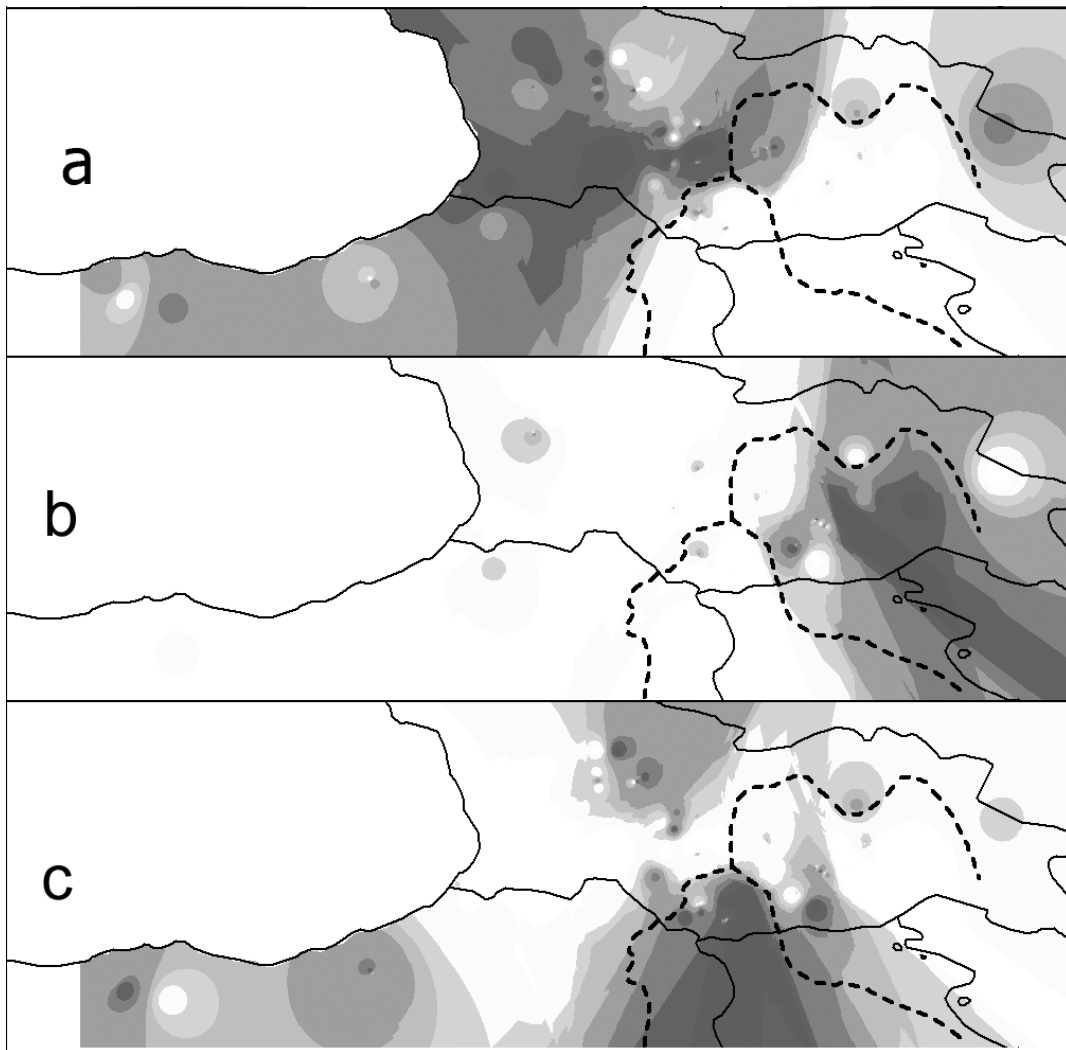
მანტელტესტმა აჩვენა სარწმუნო კორელაცია ($R_{xy}=0.402$, $P=0.012$) მორფოლოგიურ დისტანციასა და R_{st} -შორის.

4.4 მიღებული შედეგების ანალიზი და დისკუსია

ჩვენმა მტ ღნმ-ს ანალიზმა აჩვენა რომ *D. rudis* კლადის არცერთი სახეობა არ არის მონოფილეტური. ამის მიზეზია არასრული დივერგენცია ნომინალურ სახეობებს შორის, გამყინვარების დროს ჰაბიტატის დანაწევრება იწვევდა იზოლაციას, ხოლო ინტერგლაციის დროს ხდებოდა ინტროგრესია, რაც გამოწვეულია გენების მიმოცვლით და გარკვეული ასიმილაციით ჰიბრიდულ ზონებში. დღესდღეობით, გენების მიმოცვლის ინტენსივობა უფრო მაღალია იმ სახეობებში, რომლებიც კლიმატურად მსგავს ჰაბიტატებს იკავებს (*D. rudis* და *D. portschinskii*) (სურ. 4.6) ვიდრე განსხვავებულ ჰაბიტატებში (*D. valentini* და დანარჩენი ორი სახეობა), ნომინალური სახეობების არეალის ფართობის ცვლა გეოლოგიურ წარსულში, გამყინვარების და დათბობის ციკლების მონაცვლეობა, რეფუგიუმების წარმოქმნა იწვევდა ლანდშაფტზე დამოკიდებულ გადარჩევას და ჰიბრიდული ორგანიზმების გაცხრილვას, რაც აბალანსებს გენების მიმოცვლას სახეობებს შორის. სახეობათწარმოქმნას ყოველთვის წინ უსწრებს სივრცული იზოლაცია (Darwin 1859; Mayr 1982). ზოგჯერ, სახეობათწარმოქმნისას სრული გეოგრაფიული იზოლაცია არ არის აუცილებელი თუ დივერგენტული პოპულაციები განსხვავებულ ჰაბიტატებში ცხოვრობას შეეგუენ და გადარჩევა განსხვავებული მიმართულებით მოქმედებს მათზე (Endler 1977). მთიან რეგიონებში, სივრცული იზოლაცია და განსხვავებული მიმართულების გადარჩევა ყველაზე მნიშვნელოვანი ფაქტორებია სახეობათწარმოქმნის პროცესში. პლეისტოცენში, გამყინვარების ციკლებმა (Maasch 1988; Imbrie *et al.*, 1993) განაპირობა ჰაბიტატის ფრაგმენტაცია მრავალი სახეობისთვის (Zeist & Bottema 1989; Tarkhishvili *et al.*, 2012;). მთის ლანდშაფტი განაპირობებს საგრძნობ კლიმატურ განსხვავებებს გეოგრაფიულად ახლოს მყოფ ჰაბიტატებს შორის, რაც თავის მხრივ იწვევს

ლანდშაფტზე დამოკიდებულ გადარჩევას. რისი შედეგაცაა გენეტიკური განსხვავებების გაჩენას ვიწროდ სპეციალიზირებულ ცხოველებში, მაგ. მურა ბაყაყებში (Tarkhnishvili *et al.*, 2001). აქედან გამომდინარე, შეგვიძლია დაბეჭითით ვთქვათ რომ “*Darevskia rudis*” კლადის ნომინალურ სახეობებს შორის განსხვავება, გამყინვარების დროს ჰაბიტატის ფრაგმენტაციამ და განსხვავებულ პირობებთან ადაპტაციამ განაპირობა. რამაც საბოლოო ჯამში სახეობათწარმოქმნა გამოიწვია.

სურ.4.6. Rudis კლადის კლასტერების სივრცული განაწილება



კლასტერების სივრცული განაწილება (K=3) (a) პირველი *Rudis*; (b) მეორე *portchinskii* და (c) მესამე *valentini* (Tarkhnishvili *et al.*, 2012)

სახეობათწარმოქმნის შესახებ კამათი დიდი ხანია მიმდინარეობს (Ruse 1969; Mayden 1977; Hey 2001; Avise 2004; de Queiroz, 2007; Mallet, 2010). ახლომონათესავე სახეობებს შორის გენების მიმოცვლა შეიძლება ხანგრძლივი დროის განმავლობაში მიმდინარეობდეს, თუმცა ეს დივერგენციის პროცესს ვერ შეაჩერებს (Mallet *et al.*, 2007), თუ გენების მიმოცვლის ინტენსივობა არ არის მაღალი (i.e. $Nm < 1$) და ევოლუციური ხაზების ასიმილაციისკენ არ არის მიმართული. დივერგენციას აჩქარებს გენების დრეიფი, ლანდშაფტზე დამოკიდებული გადარჩევა და ჰიბრიდული გენოტიპების გაცხრილვა პოპულაციიდან. (Wright, 1931; Endler 1977; Barton & Hewitt 1985).

ჩვენი აზრით, სახეობათწარმოქმნა ორი პარალელური პროცესის შედეგია მორფოლოგიური და გენეტიკური განსხვავებების გაჩენა და იმ მექანიზმების წარმოქმნა, რომელიც გენების მიმოცვლის ინტენსივობას აფერხებს წინაპარ სახეობებში. მტ დნმ-ს ანალიზმა აჩვენა ყველაზე დიდი განსხვავება *D. portschinskii* და *D. rudis* დედის ხაზებს შორის (ca. 500 KY) და ყველაზე მცირე *D. rudis* და *D. valentini* (ca. 200 KY) შორის. ჰაპლოტიპების გეოგრაფიულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ კლადის ბაზალური განშტოება მოხდა ცივი კავკასიონის შედარებით მშრალ მთებში, ხოლო ყველაზე გვიანდელი შავი ზღვის აუზის რეფუგიუმის ტყეებში (*D. rudis*)-ის და მთის მდელოებზე (*D. valentini*)-ის შემთხვევაში. სამივე სახეობის მდედრობითი ხაზის ევოლუციის შესაძლო სურათი ნაჩვენებია (სურ. 4.3.)

მიკროსატელიტური ალელების ანალიზმა ოდნავ განსხვავებული სურათი აჩვენა, კერძოდ IM მოდელის მიხედვით, *D. rudis* და *D. portschinskii* უფრო ადრე დაშორდნენ, ვიდრე *D. rudis* და *D. valentini*, რასაც, მოგვიანებით, მოჰყვა *D. portschinskii* და *D. valentini*-ის განცალკევება. ანალიზი მიუთითებს ინტროგრესიის არსებობაზე *D. rudis* და დანარჩენ ორ სახეობას შორის და მცირე ინტროგრესიას *D. portschinskii*-სა და *D. valentini*-ს შორის.

გენების მიმოცვლა უფრო ინტენსიურია *D. rudis* და *D. portschinskii* -ს შორის ვიდრე *D. rudis* და *D. valentini*-ს შორის. ორმხრივი მიგრაციის (Nm) მაჩვენებელი ასეთია: 4.5 *D. rudis*-სა და *D. portschinskii*-ს შორის, 1.0 *D. rudis*-სა და *D. valentine*-ს

შორის, და 0.8 *D. valentini*-სა და *D. portschinskii*-ს შორის. ამ ვარაუდს პროგრამა STRUCTURE-ის შედეგებიც ადასტურებს შესწავლილი *D. rudis*-ის 38%, *D. portschinskii* 35%, და *D. valentini* 20% ინდივიდები მაღალი ალბათობით ასოცირდებიან “არა თავიანთ”, სხვა სახეობის კლასტერში (Tarkhnishvili et al., 2012 Table 6). Rst ანალიზიც აჩვენებს გენების მიმოცვლის დაბალ ინტენსივობას *D. rudis* და *D. valentini* -ს შორის ვიდრე *D. rudis* და *D. portschinskii*-ს შორის. ეს ლოგიკურიცაა თუ მხედველობაში კლიმატურ ფაქტორებს მივიღებთ. *D. valentini*-ს საცხოვრებელი გარემო მაღალი და ცივი მთებია, მაშინ როცა *D. portschinskii* და *D. rudis* -ის. საცხოვრებელი გრემოს კლიმატური ფაქტორები მსგავსია. ოდესღაც ერთი ჯგუფისგან წარმოქმნილი სახეობები, რამოდენიმე ათასი წლის განმავლობაში განსხვავებულ კლიმატურ პირობებს შეეგუენ, დაბალი ინტენსივობით ქმნიან სახეობათშორის ჰიბრიდებს, რომელთაც გადარჩენის უფრო დაბალი შანსი აქვთ ვიდრე მშობელ სახეობებს.

დივერგენციის დროის ანალიზი აჩვენებს, რომ შესწავლილი სახეობები ერთმანეთს პლეისტოცენში, გამყინვარების დროს გაემიჯნენ. ეს იზოლაცია დიდი ალბათობით ჰაბიტატის ფრაგმენტაციამ და სხვადასხვა რეფუგიუმებში ადაპტაციამ გამოიწვია. შეიძლება ერთი შეხედვით ვიფიქროთ რომ, ჰოლოცენში, გამყინვარების ციკლების დასრულების შემდეგ, განახლებულიყო გენების მიმოვლა იზოლატებს შორის. გენების მიმოცვლის ინტენსივობა *D. portschinskii* და *D. rudis* -ს შორის თითქმის 4-ჯერ მაღალია ვიდრე *D. rudis* და *D. valentini*-ს შორის. მიგრაციის მაჩვენებელი ($Nm = 4.5$) იმდენად მაღალია, რომ შეიძლებოდა დაებალანსებინა გენების დრეიფით გამოწვეული დივერგენცია. *D. rudis* და *D. portschinskii* გარეგნულად განსხვავდებიან ერთმანეთისგან, მოსაზღვრე პოპულაციებში არსებობს ჰიბრიდული ფორმები, რომლებსაც შუალედური მორფოლოგიური ნიშნები ახასიათებთ (Tarkhnishvili et al., 2012). რაც მიუთითებს იმაზე რომ ამ სახეობებს შორის არ არსებობს გენეტიკური იზოლაცია (პრე- ან პოსტ- ზიგოტური) არამედ იმას, რომ “ჰიბრიდებსა” და “მშობელ” სახეობებს შორის შეჯვარება არ არის შემთხვევითი და რომ ჰიბრიდული ინდივიდებს აქვთ რაღაც, რაც “არ მოსწონთ” მშობელ სახეობებს.

გენების ინტროგრესია *D. portschinskii* და *D. rudis*-ს შორის აჩვენებს გარკვეულ ასიმილაციას მათი კონტაქტის ზონებში. ფენოტიპური სხვაობა მიუთითებს, რომ

ჰოლოცენში მათი მეორადი კონტაქტის შემდეგ არ გასულა საკმარისი დრო რომ სრული ასიმილაცია მომხდარიყო. ეს არ ეხება *D. valentini* -ს და დანარჩენ ორ სახეობას, არსებული გენების მიმოცვლის ინტენსივობა არაა საკმარისი კონაქტის ზონაში ჰიბრიდული პოპულაციების წარმოსაქმნელად.

მეცნერების მოსაზრებას ტაქსონომიის შესახებ გამოვიყენებთ (Mallet et al., 2007; Mallet 2010) თუ ევოლუციურ კრიტერიუმს (De Queiroz 2007) Rudis კლადის სამივე სახეობას *D. portschinskii*, *D. valentini* და *D. rudis* გააჩნია საკმარისი განმასხვავებელი ნიშნები როგორც მორფოლოგიური, ისე გენეტიკური და ფიზიოლოგიური, რომ ისინი სამ დამოუკიდებელ სახეობად ჩაითვალოს.

ციტირებული ლიტერატურა:

- Adams JM, Faure H (eds) (1997) QEN Members. Review and Atlas of Palaeovegetation: Preliminary Land Ecosystem Maps of the World Since the Last Glacial Maximum. Oak Ridge National Laboratory, TN, USA. <http://www.esd.ornl.gov/projects/qen/>.
- Agusti J, Rook L, Andrews P (1999) The evolution of Neogene terrestrial ecosystems in Europe. Cambridge Univ. Press.
- Akaike H (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19, (6): 716–723.
- Ansorge W, Barker R (1984) System for DNA sequencing with resolution up to 600 base pairs. *J.Biochem. Biophys. Meth* 9, 33-47.
- Arias CF, Muñoz AG, Jiggins CD, Mavárez J, Bermingham E, Linares M (2008) A hybrid zone provides evidence for incipient ecological speciation in *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology*, 17, 4699–4712.
- Armbruster Gfj, Van Moorsel CHM, Gittenberger E (2000). Conserved Sequence Patterns In Non-Coding Ribosomal Its-1 Of Distantly Related Snail Taxa. *Journal Of Molecular Studies*, 66, 570–573.
- Armour JAL, Jeffreys AJ (1992) Biology and applications of human minisatellite loci. *Curr. opin Getnet. Dev.* 2, 850-856.
- Arnason U, Adegoke JA, Bodin K et al. (2002) Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 8151-8156.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Arribas OJ (1999) Phylogeny and relationships of the mountain lizards of Europe and Near East (*Archaeolacerta Mertens*, 1921, sensu lato) and their relationships among the Eurasian *Lacertid* radiation. *Russian Journal of Herpetology*, 16, 1-22.
- Awise J (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution, Second Edition*. Sinauer Associates Inc. Publ., New York.
- Awise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Ba'rtá J (1989) Hunting of brown bears in the Mesolithic: evidence from the Medvedia Cave near Ruz'ín in Slovakia. In: *The Mesolithic in Europe* (ed Bonsall C), 456-460. John Donald, Edinburgh.

Balanovsky O, Dibirova K, Dybo A, Mudrak O, Frolova S, Pocheshkhova E, Haber M, Platt D, Schurr T, Haak W, Kuznetsova M, Radzhabov M, Balaganskaya O, Romanov A, Zakharova T, Hernanz D, Zalloua P, Koshel S, Ruhlen M, Renfrew C, Wells RS, Tyler-Smith C, Balanovska E (2011) The Genographic Consortium Parallel Evolution of Genes and Languages in the Caucasus Region. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/msr126.

Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.

Bannikov AG, Darevsky IS, Ishchenko VG, Rustamov AK, Szczerbak NN (1977) *Opredelitel Zemnovodnykh i Presmykayushchikhsya Fauny SSSR [Guide to Amphibians and Reptiles of the USSR Fauna]*. Moscow: Prosveshchenie Publ. [in Russian]

Barton NH (1979) The dynamics of hybrid zones. *Heredity*, 43, 341-359.

Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 113-148.

Barton NH, Hewitt GM (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341, 497-503.

Battistuzzi F, Filipinski U, Hedges B, Kumar S (2010) Performance of Relaxed-Clock Methods in Estimating Evolutionary Divergence Times and Their Credibility Intervals. *Mol Biol Evol* 27 (6): 1289-1300.

Beacham TD, McIntosh B, Wallace C (2010) A comparison of stock and individual identification for sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in British Columbia provided by microsatellites and single nucleotide polymorphisms *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67, 8 1274-1290.

Benson D *et al.* (2009). "GenBank". *Nucleic Acids Research* 37.

Berger W, Jansen E (1996) Mid-Pleistocene climate shift - the Nansen connection. In: *The polar oceans and their role in shaping the global environment* (eds Johannessen O, Muench R, Overland J), *Geophysical Monograph*, 85, 295-311.

Black IWC (1993) PCR with arbitrary primers: Approach with care. *Insec. Mol. Biol.* 2, 1-6.

Blanchard BM, Knight RR (1991) Movement of Yellowstone grizzly bears. *Biological Conservation*, 58, 41-67.

Bledsoe AH (1987) DNA evolutionary rates in nine-primaried passerine birds. *Mol.Biol. Evol.* 4, 559-571.

Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93, 153-154.

Bonnefille R (1996) A reassessment of the Plio-Pleistocene pollen record of east Africa, 299-310. In; Vrba E., Denton G.H., Partridge T.C. & Burckle L.H. *Palaeoclimate and Evolution, with emphasis on human origins*. Yale University Press, New Haven.

Bonner TI, Brenner DJ, Neufeld BR, Britten RJ (1973) Reduction in rate of DNA reassociation by sequence divergence. *J. Mol. Biol.* 81, 123-135.

Bonnet E, Van de Peer Y (2002) ZT, A Software Tool for Simple and Partial Mantel Tests. *Journal of Statistical Software*, 7, 1-12.

Bookstein FL (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge University Press.
Bradley RS, Vuille M, Hardy DR, Thompson LG (2003) Low latitude ice cores record pacific sea surface temperatures. *Geophysical Research Letters*. 30, 4, 1174-1177.

Britten RJ (1986) Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 231, 1393-1398.

Brock TD, Freeze H (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol* 98, 289-297.

Brosou AS, Yang Z (2002) Effects of models of rate evolution on estimation of divergence dates with special reference to the metazoan 18s ribosomal RNA phylogeny. *Syst Biol.* 51, 703-714.

Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JF, Burke T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. in *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. IRL press Oxford.

Bruford MW, Wayne (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr.Pin. Genet. Dev.* 3, 939-943.

Brzustowski J (2002) Clustering calculator. www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/cluster.php.

Buard J, Vergnaud G (1994) Complex recombination events at the hypermutable minisatellite CEB1 (D2S90). *EMBO J.* 13 (13)

Butler RWH, McClelland E, Jones RE (1999) Calibrating the duration and timing of the Messinian Salinity Crisis in the Mediterranean: linked tectono-climatic signals in thrust-top basins of Sicily. *J. Geol. Soc. London*, 156, 827-835.

Calvignac S, Hughes S, Hanni C (2009) Genetic diversity of endangered brown bear (*Ursus arctos*) populations at the crossroads of Europe, Asia and Africa. *Diversity and Distributions*, 15, 742-750.

Chardon JP, Adriaensen F, Matthysen E (2003) Incorporating landscape elements into a connectivity measure: a case study for the Speckled wood butterfly (*Pararge aegeria* L.). *Landscape Ecology*, 18, 561-573.

Chatwin ME, Kikodze D, Svanidze T, Chikvaidze J, Gvritishvili M, and Tarkhnishvili DN (Eds.) (1997) Georgian Biodiversity Country Study Report, 1996 (the UNEP biodiversity country study programm). Tbilisi, Noah's Arc Center for Recovery of Endangered Species.

Chauvet JM, Deschamps EB, Hillaire C (1996) Dawn of Art: the Chauvet Cave. Harry N. Abrams, New York, USA.

Chestin IE, Mikeshina NG (1998) Variation in skull morphology of brown bears (*Ursus arctos*) from Caucasus. *Journal of Mammalogy*, 79, 118-130.

Churcher CS, Morgan AV (1976) A grizzly bear from the middle Wisconsin of Woodbridge, Ontario. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 13, 341-347.

Collins GH, Kovach SD, Hinkes MT (2005) Home range and movements of female brown bears in southwestern Alaska. *Ursus*, 16, 181-189.

Connor SE, Kvavadze EV (2008) Modelling late quaternary changes in plant distribution, vegetation and climate using pollen data from Georgia, Caucasus. *Journal of Biogeography*, 36, 529-545.

Costedoat C, Pech N, Salducci MD, Chappaz R, Gilles A (2005) Evolution of mosaic hybrid zone between invasive and endemic species of *Cyprinidae* through space and time. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 135-155.

Coulon A, Cosson JF, Angibault JM et al. (2004) Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13, 2841-2850.

Crawford DJ Plant Molecular systematics. 1990. New York.

Crochet PA, Chaline O, Surget-Groba Y, Debain CM, Cheylan M (2004) Speciation in mountains, phylogeography and phylogeny of the rock lizards genus *Iberolacerta* (Reptilia, Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 860-866.

Culver M, Hedrick PW, Murphy K, O'Brien S, Hornocker MG (2008) Estimation of the bottleneck size in Florida panthers. *Animal Conservation* 11(2), 104-110.

Dahle B, Swenson JE (2003) Seasonal range size in relation to reproductive strategies in brown bears *Ursus arctos*. *Journal of Animal Ecology*, 72, 660-667.

Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504-509.

Darevskii IS (1967) *Rock lizards of the Caucasus, systematics, ecology and phylogenesis of the polymorphic groups of Caucasian rock lizards of the subgenus*. Nauka, Leningrad [in Russian, English translation published by the Indian National Scientific Documentation Centre, New Delhi 1978].

Darwin C (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London.

Dawnay N, Ogden R, Wetton JH, Thorpe RS, McEwing R (2009) Genetic data from 28 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in 6 bird of prey species *Forensic Science International: Genetics*: 3. (2), 63-69.

Dayhoff MO, Schwartz R, Orcutt BC (1978) "A model of Evolutionary Change in Proteins". *Atlas of protein sequence and structure*. Nat. Biomed. Res. Found. 5, 345-358.

De Queiroz K (2007) Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879-886.

Denk T, Frotzler N, Davitashvili N (2001) Vegetational Patterns And Distribution Of Relict Taxa In Humid Temperate Forests And Wetlands Of Georgia (Transcaucasia). *Biological Journal Of The Linnean Society*, 72, 287-332.

Diamond J (1997) *Guns, Germs, and Steel: The Fates of Human Societies*. W.W. Norton & Company.

Dinnik NI (1914) Zveri Kavkaza, Khishchnye. *Khishnie*, 2, 342-401. Tiflis: Tipografiya K. P. Kozlovskogo [Animals of the Caucasus. Carnivores, 2, 342-401. Tbilisi: Typography of K.P.

Dobzhansky T (1937) *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.

- Dolukhanov PM, Kadurin SV, Larchenkov EP (2008) Dynamics of the coastal North Black Sea area in Late Pleistocene and Holocene and early human dispersal. *Quaternary International*, 197, 27-34.
- Donnelly P, Tavaré S (1986) The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability*, 18, 1-19.
- Drake CL, Girdler RW (1964) A Geophysical Study of the Red Sea: *Geophys. J. Roy. Astron. Soc. London*, v.8, 473-495.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006): Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4.(5).
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST, Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214-220.
- Duggen S, Hoernle K, Van Den Bogaard P [who led the 2004 Eifel field trip], Rupke L & Phipps Morgan J (2003), Deep roots of the Messinian salinity crisis, *Nature*, 422, 602-606.
- Dwyer GS, Chandler MA (2009) Mid-Pliocene sea level and continental ice volume based on coupled benthic Mg/Ca palaeotemperatures and oxygen isotopes. *Phil. Trans. Royal Soc. A*, 367, 157-168.
- Edwards MA (2009) Collision and collapse at the Africa-Arabia-Eurasia subduction zone. Geological Society of London.
- Egorov R (2008) Illustrated Catalogue Of The Recent Terrestrial Molluscs Of Russia And Adjacent Regions. *Treasure Of Russian Shells Supplement 5*, Moscow.
- Ehlers J, Gibbard PL (2004) *Quaternary Glaciations: Extent and Chronology 3: Part III: South America, Asia, Africa, Australia, Antarctica*.
- Eisen, J.A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein, D.B. & Schlotterer, C.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34-48.
- Elder JK, Green DK, Souther EM (1986) Automatic reading of DNA sequencing gel autoradiographs using a large format digital scanner. *Nucleic Acids Res.* 14, 417-424.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5, 435-445.

Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL (1993) Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns *Bio Techniques* 14, 214-217.

Endler JA (1977) *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton University Press, Princeton (NJ).

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.

Excoffier L (2001) Analysis of population subdivision. In: *Handbook of Statistical Genetics* (eds. Balding DJ, Bishop M, Cannings C), 271-324. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0), An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes, application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.

Faubet P, Waples RS, Gaggiotti OE (2007) Evaluating the performance of a multilocus Bayesian method for the estimation of migration rates. *Molecular Ecology*, 16, 1149-1166.

Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17, 368-376.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Fitch WM (1966) An improved method of testing for evolutionary homology. *J. Mol. Biol* 16, 9-16.

Fitch WM, Margoliash E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science* 155: 279-284.

Folmer O, Black M, Heah W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) Dna Primers For Amplification Of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I From Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology And Biotechnology*, 3, 294-299.

Fortelius M, Eronen J, Jernvall J, Liu L, Pushkina D, Rinne J, Tesakov A, Vislobokova I, Zhang ZH, Zhou L (2002) Fossil Mammals Resolve Regional Patterns Of Eurasian climate change over 20 million years. *Evolutionary Ecology Research*, 4, 1005-1016.

Frankham R (2005) Genes and extinction. *Biological Conservation*. 126, 131-140.

Frankham R, Briscoe DA, Ballo JD (2000) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.

Fu J, Murphy RW, Darevsky IS (1997) Towards the phylogeny of Caucasian rock lizards, Implications from mitochondrial DNA gene sequences (*Reptilia*, *Lacertidae*). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 121, 463-477.

Geptner VG, Naumov NP, Yurgenson PB, Sludskiy AA, Chirkova AF, Bannikov AG (1967) Mammals of the Soviet Union, 2, 1–1004. Moscow: Vysshaya Shkola (in Russian).

Glenn LP, Miller LH (1980) Seasonal movements of an Alaska Peninsula brown bear population. Proceedings of the International Conference on Bear Research and Management, 4, 307-312.

Goldman N (1993) Statistical Tests Of Models Of Dna Substitution. *Journal Of Molecular Evolution*, 36, 182-198.

Griffin DL (2002) Aridity and humidity: two aspects of the late Miocene climate of North Africa and the Mediterranean. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 182, 65-91.

Hadrys H, Balcik M, Schierwater B (1992) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol.Ecol.* 1, 55-63.

Hall TA (1999) BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hamilton AC, Taylor D (1991) History of climate and forests in tropical Africa during the last 8 Million years. *Climate Change* 19, 65-78.

Harland WB, Armstrong RL, Cox AV, Craig, LE, Smith AG, Smith DG (1990) A geologic time scale .Cambridge University Press.

Harland, W.B., Cox, A.V., Llewellyn, P. G., Pickton, C.A.G., Smith, A.G., and Walters, R., 1982, A geologic time scale 1982, Cambridge University Press.

Harris H (1966) Enzyme polymorphism in man. *Proc. Roy.Soc. London B* 164, 298-310.

Harris H, Hopkinson DA (1976) Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland, Amsterdam.

Harrison RG, Rand DM, Wheeler WC (1987) Mitochondrial-DNA variation in field crickets across a narrow hybrid zone. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 144-158.

Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160-174.

Haywood AM, Valdes PJ (2006) Vegetation cover in a warmer world simulated using a dynamic global vegetation model for the mid Pliocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 237 (2-4), 412-427.

Hedrick PW (1996) Conservation genetics and molecular techniques: a perspective. Pp. 459-477 *In* Molecular Genetic Approaches to Conservation (T.B. Smith, and R.K. Wayne, eds.). Oxford Univ. Press, NY.

Henikoff S, Henikoff JG (1992) Amino Acid Substitution Matrices from Protein Blocks. *PNAS* 89 (22), 10915–10919.

Hennig W (1966) Phylogenetic Systematics. University of Illinois press.

Hernandez-Juvel JM, Morafka DJ, Delgado I, Scott GD, Murphy RW (1992) Effect of enzyme dilution on the relative mobility of glytamate dehydrogenase isozymes in the prairie rattlesnake, *Crotalus viridis viridis*. *Copeia* 4, 1117-1119.

Hewitt GM (2011) Mediterenian peninsulas: The evolution of hotspots. *Biodiversity hotspots*. 2, 123-147.

Hey J (2001) The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 326-329.

Hey J (2005) On the Number of New World Founders: A Population Genetic Portrait of the Peopling of the Americas. *PLoS Biol* 3, 0965-0975.

Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*, 167, 747-760.

Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jonesc PG, Jarvisc A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965-1978.

Hille A, Tarkhnishvili D, Meinig H, Hutterer R (2002) Morphometric, biochemical and molecular traits in Caucasian wood mice (*Apodemus/Sylvaemus*), with remarks on species divergence. *Acta teriologica* 47, 389-416.

Hillis DM, Moritz C, Mable BC (1996) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Ho SYW, Phillips MJ, Drummond AJ, Cooper A (2005) Accuracy of Rate Estimation Using Relaxed-Clock Models with a Critical Focus on the Early Metazoan Radiation. *Mol Biol Evol* 22 (5), 1355-1363.
- Hoskin CJ, Higgie M, McDonald KR, Moritz C (2005) Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature*, 437, 1353-1356.
- Hsu TC (1979) Human and Mammalian Cytogenetics. Springer-Verlag, Berlin;
- Huber D, Roth HU (1986) Home ranges and movements of brown bears in Plitvice Lakes National Park, Yugoslavia. *International Association of Bear Research and Management*, 6, 93-97.
- Huelsenbeck JP, Larget B, Swofford D (2000) A compound Poisson process for relaxing the molecular clock. *Genetics*. 154, 1879-1892.
- Hunter RL, Markert RK (1957) Histochemical demonstration of Enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125, 1294-1295.
- Huxley J (1942) *Evolution: The modern Synthesis*. Allen and Unwin, London.
- Imbrie J, Berger A, Boyle EA, Clemens SC, Duffy A, Howard WR, Kukla G, Kutzbach J, Martinson DC, McIntyre A, Mix AC, Molino B, Morley JJ, Peterson LC, Pisias NG, Prell WL, Raymo ME, Shackleton NJ, Toggweiler JR (1993) On the structure and origin of major glaciation cycles 2. 100,000-year cycle. *Paleoceanography*, 8, 699-735.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) *PCR Protocols*. Academic press, New York.
- Ishibashi Y, Saitoh T (2004) Phylogenetic relationships among fragmented Asian black bear (*Ursus thibetanus*) populations in western Japan. *Conservation Genetics*, 5, 311-323.
- Jackson JV, Talbot SL, Farley S (2008) Genetic characterization of Kenai Brown Bears (*Ursus arctos*): microsatellite and mitochondrial DNA control region variation in Brown bears of the Kenai Peninsula, south central Alaska. *Canadian Journal of Zoology*, 86, 756-764.
- Jeffreys AJ (2005) Genetic fingerprinting. *Nat. Med.* 11 (10), 1035-1044.
- Jeffreys AJ, Royle NJ, Wilson V, Wong Z (1988) Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 332, 278-281.

Jerina K, Adamic M (2008) Fifty years of brown bear population expansion: effects of sex-biased dispersal on rate of expansion and population structure. *Journal of Mammalogy*, 89, 1491-1501.

Jiggins CD, McMillan WO, King P, Mallet J (1997) The maintenance of species differences across a *Heliconius* hybrid zone. *Heredity*, 79, 495-505.

Jones CS, Tegelstrom H, Latchman DS, Berry RJ (1988) An improved rapid method for mitochondrial DNA isolation suitable for use in the study of closely related populations. *Biochem Genet.* 26, 83-88.

Kelly RL (1983) Hunter-gatherer mobility strategies. *Journal of Anthropological Research*, 39, 277-306.

Ketmaier V, Giusti F, Caccone A (2006) Molecular Phylogeny And Historical Biogeography Of The Land Snail Genus *Solatopupa* (Pulmonata) In The Peri-Tyrrhenian Area. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 39, 439-451.

Khorana HG (1971) Total synthesis of a gene. *Science* 203 4381, 614-25.

Kikvidze Z, Ohsawa M (1999) Adjara, East Mediterranean Refuge Of Tertiary Vegetation. In: *Anaga Cloud Forest, A Comparative Study On Evergreen Broad-Leaved Forests And Trees Of The Canary Islands And Japan* (M. Ohsawa, W. Wildpret & M.D. Arco, Eds), 297- 315. Chiba University Publications, Chiba, Japan.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.

King M (1993) *Species Evolution: The role of Chromosome Change*. Cambridge University press, Cambridge.

Kirsch J, Dickerman AW, Reig OA, Springer MS (1991) DNA hybridization evidence for the Australian affinity of the American marsupial *Dromiciops australis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10465-10469.

Kirsch J, Springer MA, Krajewski C, Archer M, Aplin K, Dickerman W (1990) DNA/DNA hybridization studies of carnivorous marsupials. II relationships among dasyurids. *Australian J.Zool.* 38, 637-696.

Kishino H, Thorne JL, Bruno W (2001) Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Mol Biol Evol.* 18, 352-361.

Kleppe K, Ohttsuka E, Kleppe R, Molineux R, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J. Mol. Biology 56, 341-346.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals, amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86, 6196-6200.

Kohne DE (1970) Evolution of Higher-organism DNA. *Quart. Rev. Biophys.* 33, 327-375.

Korchagin VI, Badaeva TN, Tokarskaya ON, Martirosyan IA, Darevsky IS, Ryskov AP (2007) Molecular characterization of allelic variants of (GATA)_n microsatellite loci in parthenogenetic lizards *Darevskia unisexualis* (Lacertidae). *Gene*, 392, 126-133.

Krajevski C (1989) Phylogenetic relationships among cranes (Gruiformes: Gruidae) based on DNA hybridization. *Auk* 106, 603-618.

Krajevski C, Dickerman AW (1990) Bootstrap analysis of phylogenetic trees derived from DNA hybridization distances *Syst.Zool.* 39, 383- 390.

Krijgsman W, Hilgen F J, Raffi I, Sierro FJ, Wilson DS (1999) Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, Issue 6745, 400, 652-655.

Kumar S (2005). Molecular clocks: four decades of evolution. *Nat. Rev. Genet.* 6(8), 654–662.

Kumar S, Tamura T, Nei M (2004) MEGA3, Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150-163.

Kvavadze E, Bar-Yosef O, Belfer-Cohen A et al. (2009) 30,000- year-old wild flax fibers. *Science*, 325, 1359-1362.

Laughton AS (1966) The Gulf of Aden: *Roy. Soc. Phil Trans., Series A*, 259, 150-171.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 11, 2453-2465.

Likharhev IM, Rammel'meier ES (1962) *Terrestrial Mollusks Of The Fauna Of The U.S.S.R.* [In Russian: *Nazemnye molyuski fauny SSSR*]. USSR Academy of Sciences Publications, 43, Moscow-Leningrad.

Linn S., Arber, W. (1968). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 59, 1300-1304.

Linnell DC, Swenson JE, Andersen I, Barnes B (2000) How vulnerable are denning bears to disturbance? *Wildlife Society Bulletin*, 28, 400-413.

Lomolino MV, Riddle BR, Brown JH (2006) *Biogeography*, third edition. USA , 145-176.

Loxterman JL (2011) Fine scale population genetic structure of pumas in the Intermountain West. *Cons. Genet.* 12, 4.

Luikart G, Cornuet J (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12, 228-237.

Luke S, Verma RS (1993) The genomic synteny at DNA level between human and Chimpanze chromosomes. *Chromosome Res.* 1, 215-219.

Lukhtanov VA, Kandul NP, Plotkin JB, Dantchenko AV, Haig D, Pierce NE (2005) Reinforcement of pre-zygotic isolation and karyotype evolution in *Agrodiaetus* butterflies. *Nature*, 436, 385-389.

Maasch K (1988) Statistical detection of the mid-Pleistocene transition. *Climate Dynamics*, 2, 133-143.

MacCulloch RD, Fu J, Darevsky IS, Murphy RW (2000) Genetic evidence for species status of some Caucasian rock lizards in the *Lacerta saxicola* group. *Amphibia-Reptilia*, 21, 69-176.

Macgregor HC (1993) *An Introduction to Animal Cytogenetics*. Chapman and Hall, London;
Mai DH (1995) *Tertiäre Vegetationsgeschichte Europas*. Gustav Fischer Verlag, Jena.

Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 229-23.

Mallet J (2010) Why was Darwin's view of species rejected by twentieth century biologists? *Biology and Philosophy*, 25, 497-527.

Mallet J, Beltrán M, Neukirchen W, Linares M (2007) Natural hybridization in *heliconiine* butterflies, the species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 28.

Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 189-197.

Mangerud J, Ehlers J, Gibbard P (2004) *Quaternary Glaciations : Extent and Chronology 1: Part I Europe*. Elsevier, Amsterdam. 129-135.

Manly BFJ (1994) *Multivariate statistical methods, a Primer*. Chapman and Hall, London.

- Manly, B. F. J. 1994. *Multivariate Statistical Methods. A Primer*. 2nd ed. Chapman and Hall.
- Mano T (1994) Home range and habitat use of brown bears in the southwestern Oshima Peninsula, Hokkaido. International conference on bear research and management, 9, 319-325.
- Market CL, Moller F (1959) Multiple forms of Enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 753-763.
- Marko P (2002) Fossil Calibration Of Molecular Clocks And Divergence Times Of Geminant Species Pairs Separated By The Isthmus Of Panama. *Molecular Biology And Evolution*, 19, 2005-2021.
- Matsushashi T, Masuda R, Mano T, Yoshida MC (1999) Microevolution of the mitochondrial DNA control region in the Japanese brown bear (*Ursus arctos*) population. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 676-684.
- Mattson DJ, Merrill T (2002) Extirpations of grizzly bears in the contiguous United States, 1850–2000. *Conservation Biology*, 16, 1123-1136.
- Maxam A, Gilbert W (1977) A new Method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564.
- Maxam A, Gilbert W (1980) Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavage. *Methods Enzymol* 65, 499-560.
- Mayden RL (1997) A hierarchy of species concepts, the denouement in the saga of the species problem. In: *Species, The units of biodiversity* (eds. Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR), 381–424. Chapman and Hall, London.
- Mayr E (1982) Processes of speciation in animals. In: *Mechanisms of Speciation* (ed. Liss ARI), 1-19. Alan R. Liss, inc., New York.
- McLaughlin PJ, Dayhoff M (1973) *J.Mol.Evol.* 2, 99-116.
- McLellan BN, Hovey FW (2001) Natal dispersal of grizzly bears. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 838-844.
- Menard S (2002) *Applied Logistic Regression Analysis*. Thousand Oaks (CA), Sage Publication Series, Quantitative Applications in the Social Sciences, No. 106.

- Mertzanis Y, Ioannis I, Mavridis A et al. (2005) Movements, activity patterns and home range of a female brown bear (*Ursus arctos*, L.) in the Rodopi Mountain Range, Greece. *Belgian Journal of Zoology*, 135, 217-221.
- Micheels A, Bruch A, Mosbrugger V (2009) Miocene Climate Modelling Sensitivity Experiments For Different Co₂ Concentrations. *Palaeontologia Electronica*, 12 (2), 6a, 1-20.
- Middendorf AF (1851) The brown bear. In: Russian Fauna. Mamals (ed. Simashko YI), 187–295. Sanct-Peterburg, Russia.
- Miller CR, Joyce P, Waits LP (2002) Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160, 357–366.
- Miller CR, Waits LP, Joyce P (2006) Phylogeography and mitochondrial diversity of extirpated brown bear (*Ursus arctos*) population in the contiguous United States and Mexico. *Molecular Ecology*, 15, 4477–4485.
- Milne RI (2004) Phylogeny And Biogeography Of *Rhododendron* Subsection *Pontica*, A Group With A Tertiary Relict Distribution. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 33, 389-401.
- Milne RI (2006) Northern Hemisphere Plant Disjunctions: A Window On Tertiary Land Bridges And Climate Change? *Annals Of Botany*, 98, 465-472.
- Milne RI, Abbott RJ (2002) The Origin And Evolution Of Tertiary Relict Floras. *Advances In Botanical Research*, 38, 281-314.
- Mittermeier, R.A., Robles Gil, P., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J., da Fonseca, G.A.B., 2004. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and most Endangered Terrestrial Ecoregions. CEMEX, Mexico City.
- Miyamoto MM J. Cracraft J, (eds.) (1991) Phylogenetic analysis of DNA sequences Oxford Univ. Press, New York.
- Moore EM, Fairbridge RW (1998) Encyclopedia of European and Asian regional geology. (Caucasus by Khain VE., Koronowsky NV.) 127-136.
- Morgan T (1926) The Theory of the Gene, New Haven: Yale University Press.
- Mountain JL, Cavalli-Sforza LL (1997) Multilocus genotypes, a tree of individuals, and human evolutionary history. *The American Journal of Human Genetics*, 61, 705-718.
- Mullis 1990.

Mullis, K (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Scientific American* 262 (4): 56–61.

Mumladze L, Tarkhnishvili D, Pokryszko BM (2008) A New Species Of The Genus *Helix* From The Lesser Caucasus (Sw Georgia). *Journal Of Conchology*, 39, 483–485.

Murphy M, Waits LP, Kendall K, Wasser S, Higbee J, Bogden R (2002) An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation Genetics*, 3, 435–440.

Murphy MA, Waits LP, Kendall K. (2000) Quantitative evaluation of faecal drying methods for brown bear DNA analysis. *Wildlife Society Bulletin*, 28, 951–957.

Murphy RW, Fu J, MacCulloch RD, Darevsky IS, Kupriyanova LA (2000) A fine line between sex and unisexuality, the phylogenetic constraints on parthenogenesis in lacertid lizards. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 130, 527–549.

Myers NRA, Mittermeier CG, Mittermeier GAB, da Fonseca, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.

Nakhutsrishvili G (1999) The Vegetation Of Georgia (Caucasus). *Braun-Blanquetia*, 15, 5–74.

Nei M. Molecular evolution and phylogenetics 2000.

Nikolsky AM (1913) *Presmykayushchiesya i Zemnovodnye Kavkaza [Reptiles and Amphibians of Caucasus]*. Chancellary of the Governor of H.I.M. in the Caucasus, Tiflis [in Russian].

Ohnishi N, Uno R, Ishibashi Y, Tamate HB, Oi T (2009) The influence of climatic oscillations during the Quaternary Era on the genetic structure of Asian black bears in Japan. *Heredity*, 102, 579–589.

Ohno S (1972) So much „junk“ DNA in our genome, In *Evolution of Genetic Systems*. H. H. Smith. ed. Gordon and Breach, New York. 366–370.

Ollier C, Pain C (2000) The origin of mountains. London. 90–93.

Onorato DP, Hellgren EC, Van Den Bussche RA, Doan-Crider DL (2004) Phylogeographic patterns within a metapopulation of black bears (*Ursus americanus*) in the American southwest.

Opperdoes FR (2009) Phylogenetic Analysis Using Protein sequences: in *Phylogenetic handbook*.

Palumbi SP, Martin AP, Romano S, Mcmillan WO, Stice L, Grabowski G (1991) The Simple Fool's guide to PCR. Special publ. Dept. Zoology, University of Hawaii, Honolulu.

Palva TK, Palva ET (1985) Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction. *FEBS Letters* 192, 267-270.

Park HC, Han TY, Kim DC, Han SY, Kim KS (2011) Individual identification and sex determination of Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Daegu city based on genetic analysis of otter spraint GENES & GENOMICS.

Pocock MJO, Hauffe HC, Searle JB (2005) Dispersal in house mice. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84, 565-583.

Posada D, Crandall K (1998) Modeltest: Testing The Model Of Dna Substitutions. *Bioinformatics*, 14, 817-818.

Prager EM, Sage RD, Gyllensten U, Thomas WK, Hübner R, Jones CS, Noble L, Searle JB, Wilson AC (1993) Mitochondrial DNA sequence diversity and the colonisation of Scandinavia by house mice from East Holstein. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50, 85-122.

Pritchard KJ, Matthew S, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.

Pritchard KJ, Matthew S, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945-959.

QIAGEN®. 2007. *Qiaamp® DNA Mini And Blood Mini Handbook, Second Ed.* QIAGEN® Sample & Assay Technologies.

Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and Kinship. *Trends Ecol. Evol.* 8, 285-288.

Radde GI (1899) *Museum Caucasicum*, 1, 61-62, Tipografiya Kantselyarii Glavnonachal' stvuyushchago grazhdanskoyu chastiyu na Kavkaze, Tiflis [Tbilisi] (in Russian).

Ravelo AC, Andreasen DH, Lyle M, Lyle AO, Wara MW (2004) Regional climate shifts caused by gradual cooling in the Pliocene epoch. *Nature* 429, 263-267.

Raymo ME (1992) Global climate change: a 3 million year perspective. In: Kukla, G., Went, E. (Eds.), *Start of a Glacial*, NATO ASI Series I, vol. 3, *Proceedings of the Mallorca NATO ARW*. Springer, Heidelberg, 207-223

Raymo ME, Ganley K, Carter S, Oppo DW, McManus J (1998) Millennial-scale climate instability during the early Pleistocene epoch. *Nature* 392, 699–702.

Rea DK, Snoeckx H, Joseph LH (1998) Late Cenozoic eolian deposition in the North Pacific: Asian drying, Tibetan uplift, and cooling of the northern hemisphere. *Paleoceanography* 13, 215–224.

Ritland K (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology* 9, 1195–1204.

Roberts RJ (1984) Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucl Acids Res.* 12, 167–204.

Roberts RJ, Macellis D (1993) REBASE-Restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids. Res.* 21, 3125–3137.

Rodríguez F, Oliver JF, Marín A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142, 485–501.

Roger AJ, Hug LA (2006) The origin and diversification of eukaryotes: problems with molecular phylogenetics and molecular clock estimation *Phil. Trans. R. Soc. B* 361 1039–1054.

Rogers LL (1981) A bear in its lair. *Natural History*, 90, 64–70. Roon D, Waits LP, Kendall K (2003) A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes*, 3, 163–166.

Rögl F (1998) Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 99, 279–310.

Rohlf FJ (1996) Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. 117–129 In: Markus, L. F. et al. (eds.), *Advances in Morphometrics*, Plenum Press, NY.

Röhrig E (1991) Deciduous Forests Of The Near East. In: *Ecosystems Of The World* (E. Röhrig & B. Ulrich, Eds), 527–537. Elsevier, Amsterdam.

Roogl F, Steininger FF (1984) Neogene Paratethys, Mediterranean and Indo-Pacific seaways. Implications for the paleobiogeography of marine and terrestrial biotas. In: Brenchley, P.J. (Ed.), *Fossils and Climate*. Wiley, Chichester, 171–200.

Ruse M (1969) Definitions of species in biology. *British Journal for the Philosophy of Science*, 20, 97–115.

Saintot A, Marie-Franc , Brunet O, Yakovlev , Brier M, Stephenson R, Ershov A, Franc , Chalot-Prat O, Mccann T, The Mesozoic–Cenozoic tectonic evolution of the Greater Caucasus.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) '*Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd ed.*', Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanderson MJ (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol Biol Evol.* 14, 1218–1231.

Sanderson MJ (2002) Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Mol Biol Evol.* 19, 101–109.

Sanderson MJ, Baldwin BG, Bharathan G, Campbell CS, Dohlen C, Feruson D, Poter JM, Wojciechowski MF, Donodhue MJ (1993) The grows of phylogenetic information and the need for phylogenetic data base. *Syst. Biol.* 42, 562–568.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.

Sarich VM, Schmid CM, Marks J (1989) DNA hybridization as a guide to Phylogenies: A critical analysis. *Cladistics* 5, 3–32.

Sasavage N (1992) Painting by chromosome numbers. *J. NIH Res.* 4, 44–46.

Satunin KA (1915) Mammals of Caucasian region. *Notes of Caucasian Museum*, 1A, 1–410. (in Russian).

Schlötterer, C. and Zangerl, B. 1999. The use of imperfect microsatellites for DNA fingerprinting and population genetics. In *DNA profiling and DNA fingerprinting* (eds. J.T. Epplen and T. Lubjuhn), pp. 153–165. Birkhäuser, Basel, Switzerland.

Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, Haeseler AV (2000) *TREE-PUZZLE*, version 5.0. München.

Schütt H (2005) *Turkish Land Snails*. Verlag Natur & Wissenschaft, Solingen.

Schwarz GE (1978). "Estimating the dimension of a model". *Annals of Statistics* 6 (2), 461–464.

Selkoe K, Toonen R (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 615–629.

Serebryanny L, Andreev A, Malyasova E Tarasov P, Romanenko F (1998) Late-Glacial and Early Holocene environment in the Russian Arctic. *The Holocene* 8, 323–330.

Sheldon FH (1987) Rates of Single copy DNA evolution in herons. *Mol.Bio. Evol.* 4, 56-69.

Shriver MD, Jin L, Chakraborty R, Boerwin-Kle E (1993) VNTR allele frequency distributions under a stepwise mutation model: a computer simulation approach. *Genetics* 134, 983-993.

Sibley CG, Ahlquist JE (1990) *Phylogeny and Classification of birds*. Yale University press. New haven.

Sibrava V, Bowen DQ, Richmond GM (1986) *Quaternary Glaciations in the Northern Hemisphere, Quaternary Science Reviews*. 5, 1-514.

Sites JW, Moritz C (1987) Chromosome Change and speciation revisited. *Syst. Zool.* 36, 153-317.

Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462.

Smitheis O (1955) Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem J.* 61, 629-641.

Solounias N, Plavcan JM, Quade J, Witmer L (1999) The palaeoecology of the Pikermian Biome and the savanna myth. In: Agustí, J., Rook, L., Andrews, P. (Eds.), *The Evolution of Neogene Terrestrial Ecosystems in Europe*. Cambridge University Press, Cambridge, 436–453.

Sosson M, Kaymakci K, Stephenson R (2010) Sedimentary basin tectonics from the Black Sea and Caucasus to the Arabian Platform: introduction. *Geological Society, London, Special Publications*; (340), 1-10.

Spinger M, Davidson EH, Britten RJ (1992) Calculation of sequence divergence from the thermal stability of DANN Duplexes. *J. mol Evol.* 34, 379-382.

Stafne ET, Clark JR. Courtney A, Weber J, Graham K, Lewers S (2005) Simple Sequence Repeat (SSR) Markers for Genetic Mapping of Raspberry and Blackberry. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 130(5).

Stiner MC (1994) *Honor among Thieves: A Zooarchaeological Study of Neandertal Ecology*. Princeton University Press, Princeton,NJ.

Støen OG, Zedrosser A, Sæbø S, Swenson JE (2005) Inversely density-dependent natal dispersal in brown bears *Ursus arctos*. *Oecologia*, 148, 356–364.

Suchard MA, Weiss RE, Sinsheimer JS (2001) Bayesian Selection of Continuous-Time Markov Chain Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 1001–1013.

Sutton W S, (1903) The chromosomes in heredity. *Biol. Bull* 4:231–251.

Swenson JE, Gerstl N, Dahle B, Zedrosser A (2000) Action Plan for the conservation of the Brown Bear (*Ursus arctos*) in Europe. Nature and Environment, Council of Europe Publishing. 114, 15–18.

Swenson JE, Sandegren F, Soderberg A (1998) Geographic expansion of an increasing brown bear population: evidence for presaturation dispersal. *Journal of Animal Ecology*, 67, 819–826.

Swofford DL (2002) ‘*PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 3.1*’, Computer program . Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.

Sysoev A, Schileyko A (2009) *Land Snails And Slugs Of Russia And Adjacent Countries*. Pensoft, Sofia-Moscow.

Taberlet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings Biological Sciences (The Royal Society)*, 255, 195–200.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5, Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 1093.

Tan AM, Orrego C (1992) DNA stabilisation and amplification from museum collections of extracts originally intended for allozyme analysis. *Molecular Ecology*, 195–197.

Tarasov PE (1998) Present day and mid-Holocene biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from the former Soviet Union and Mongolia, *J. of Biogeography*, 25, 1029–1053.

Tarasov PE, Andreec AA, Romanenko FA, Sulerzhitskii LD (1995) Palynostratigraphy of uper Quaternary deposits.

Tarkhnishvili D, Gavashelishvili A, Avaliani A, Murtskhvaladze M, Mumladze L (2010) Unisexual rock lizard might be outcompeting its bisexual progenitors in the Caucasus. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 447–460.

Tarkhnishvili D, Gavashelishvili A, Mumladze L (2012) Palaeoclimatic models help to understand current distribution of Caucasian forest species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105, 231-248.

Tarkhnishvili D, Hille AA, Böhme W (2001) Humid forest refugia, speciation and secondary introgression between two evolutionary lineages, differentiation in a near eastern brown frog, *Rana macrocnemis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74, 141-156.

Tarkhnishvili D, Kaya U, Gavashelishvili A, Serbinova S (2008) Ecological divergence between two evolutionary lineages of the Caucasian salamander: evidence from GIS analysis. *Herpetological Journal*, 18, 155–163.

Tarkhnishvili D, Thorpe RS, Arntzen JW (2000) Pre-Pleistocene refugia and differentiation between populations of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 414–422.

Tarkhnishvili DN (2012) Evolutionary History, Habitats, Diversification, and Speciation in Caucasian Rock Lizards. In: *Advances in Zoology Research, Volume 2* (ed. Jenkins OP), Nova Science Publishers, Hauppauge (NY) (in press).

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nuc. Acids Res.* 17, 6437-6471.

Therman E, Susman M (1993) Human chromosomes, structure, behavior and effects. Springer-Verlag, New York.

Therman E, Susman M (1993) Human chromosomes: structure, behavior, and effects 14.

Thorne JL, Kishino H, Painter IS (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol Biol Evol.* 15, 1647-1657.

Thorpe RS, Leamy L (1983) Morphometric Studies In Inbred And Hybrid House Mice (*Mus Sp.*): Multivariate Analysis Of Size And Shape. *Journal Of Zoology*, 199, 421-432.

Thulin CG, Tegelstrom H (2002) Biased geographical distribution of mitochondrial DNA that passed the species barrier from mountain hares to brown hares (genus *Lepus*), an effect of genetic incompatibility and mating behaviour? *Journal of Zoology*, 258, 299-306.

Tikhonov AN (1987) Systematics, biology and ecology of brown bears from the southern mountain ridges of the USSR. 6–12. In *Ecology of bears. Proceedings of the Third All-Union Meeting of Bear Specialists*. Nauka, Novosibirsk, Russia, 191. (in Russian).

Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10, 967–981.

Tuniyev BS (1990) On the independence of the Colchic Center of Amphibian and Reptile Speciation. *Asiatic Herpetological Research* 3, 67-84.

Tuniyev BS (1990) On The Independence Of The Colchic Center Of Amphibian And Reptile Speciation. *Asiatic Herpetological Research*, 3, 67-84.

Turelli M, Barton NH, Coyne JA (2001) Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 7.

Vachot AM, Monnerot M (1996) Extraction, amplification and sequencing of DNA from formaldehyde-fixed specimens. *Ancient Biomolecules*, 1, 1-14.

Valdiosera CE, Garcia N, Anderung C, Dalen L, Cregut-Bonnoure E, Kahlke RD, Stiller M, Brandstrom M, Thomas MG, Arsuaga JL, Gotherstrom A, Barnes I (2007) Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Molecular Ecology*, 16, 24, 5140–5148.

Valiere N (2001) Genetic Identification Using Multilocus Tags, Universite Claude, Bernard Lyon I, France. Van Den Bussche RA, Lack JB, Onorato DP et al. (2009) Mitochondrial DNA phylogeography of black bears (*Ursus americanus*) in central and southern North America: conservation implications. *Journal of Mammalogy*, 90, 1075–1082.

Van Andel TH, Tzedakis PC (1996) Palaeolithic Landscapes Of Europe And Environs: 150,000-25,000 Years Ago: An Overview. *Quaternary Science Reviews*, 15, 481-500.

Van Dam J (2006) Geographic and temporal patterns in the late Neogene (12–3 Ma) aridification of Europe: The use of small mammals as paleoprecipitation proxies. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 238, 190–218.

Veith M, Steinfartz S, Zardoya R, Seitz A, Meyer A (1998) A Molecular Phylogeny Of ‘True’ Salamanders (Family Salamandridae) And The Evolution Of Terrestriality Of Reproductive Modes. *Journal Of Zoological Systematic And Evolutionary Research*, 36, 7-16.

Velichko AA, Kurenkova AA (1990) Landscapes Of The Northern Hemisphere During The Late Glacial Maximum. In: *The World At 18,000 Bp* (O. Soffer & G. Gamble, Eds), 255-265. Unwin Hyman, London.

Vergnaud G, Denoeud F (2000) Minisatellites: mutability and genome architecture“. *Genome Res.* 10 (7), 899–907.

- Voelker G, Outlaw RK, Rauri CK, Bowie R (2010) Pliocene forest dynamics as a primary driver of African bird speciation. *Global Ecology and Biogeography*, (Global Ecol. Biogeogr.) 19, 111-121.
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10, 249–256.
- Waits LP, Taberlet P, Swenson J, Sandegren A, Franzen R (2000) Genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear. *Molecular Ecology*, 9, 421-431.
- Wang J (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166, 1963-1979.
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase Chain Reaction. *Am. J. Human Genet.* 44, 388-396.
- Weeden NF, Wendel JF (1989) Genetics of plant isozymes. 46-72.
- Werman SD, Springer MS, Britten (1996) Nucleic Acids I: DNA-DNA Hybridisation. In *Molecular systematics* 2nd edition.
- Won YJ, Hey J (2005) Divergence population genetics of chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 297-307.
- Woods JG, Paetkau D, Lewis D, McLellan BN, Proctor M, Strobeck C (1999) Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin*, 27, 616-627.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97–159.
- Wright S (1969) Evolution and the genetics of populations. In: *The Theory of Gene Frequencies*, vol. 2, 291–295. University of Chicago Press, Chicago, IL
- Wu B, Liu N, Zhao H (2006) PSMIX: an R package for population structure inference via maximum likelihood method. *BMC Bioinformatics*, 7, 317.
- Wyman AR, White R (1980) A highly polymorphic locus in human DNA“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (11), 6754-6762.
- Yang Z (1993) Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Mol. Biol. Evol.* 10, 1396-1401.
- Yoder A, Yang Z (2000) Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Mol Biol Evol.* 17, 1081–1090.

Zazanashvili N, Sanadiradze G, Bukhnikashvili A, Kandaurov A, Tarkhnishvili D (2004) Caucasus In: *Hotspots Revisited, Earth's Biologically Richest And Most Endangered Terrestrial Ecoregions* (R.A.Mittermaier, P.G. Gil, M. Hoffmann, J. Pilgrim, T. Brooks, C.G. Mittermaier, J. Lamoreux & Da G.A.B. Fonseca, Eds), 148-153. Cemex/Agrupacion Sierra Madre, Mexico.

Zeist van W, Bottema S (1991) *Late Quaternary vegetation of the Near East*. Reichert, Weisbaden.

Zeist WV, Bottema S (1988) Late Quaternary Vegetational And Climatic History Of Southwest Asia. *Proceedings Of The Indian National Science Academy* 54, 461-480.

Zharkikh A (1994) Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *J Mol Evol* 39, 315-329.

Zimmermann W (1943) *Phylogenetic Methods*;

Zucherandl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins In *evolving genes and proteins* 96-166 New York: Academic press.

დანართი 1: ღნმ-ს ექსტრაქცია ქსოვილების, სისხლის, ბეწვის სინჯებიდან QIAGEN- რეაქტივებით

1. გაასუფთავეთ თქვენი სამუშაო მაგიდა. თქვენს ლაბორატორიულ რვეულში მოამზადეთ ჩანაწერი: სინჯის ნომერი, თარიღი და დეტალურად ჩაიწერეთ რასაც გააკეთებთ. ერთდროულად რამოდენიმე სინჯზე მუშაობისას გაიმეორეთ ყველა საფეხური ყოველი სინჯისთვის ცალ-ცალკე.
2. 1.5ml ეპენდორფის მილს დააწერეთ სინჯის ნომერი და ჩაასხით 180 μ l ATL ბუფერი და დაუმატეთ 20 μ l Proteinase K. დაავორტექსეთ.
3. მოათავსეთ 25 mg ქსოვილი (დაახლოებით 2 ასანთის თავის-ოდენა. მეტი ქსოვილი არ არის უკეთესი. შეიძლება რეაქციის ინჰიბირება გამოიწვიოს), სასაგნე მინაზე და სტერილური ინსტრუმენტებით დააქუცმაცეთ. მოათავსეთ შესაბამის ეპენდორფის მილში და დაავორტექსეთ.
4. ეპენდორფის მილები მოათავსეთ 55°C და დაავორტექსეთ. ახალი ქსოვილის შემთხვევაში რამოდენიმეჯერ დავორტექსების შემდეგ, დაინახავთ ქსოვილი როგორ იშლება ხსნარში. თუ მუშაობთ სამუზეუმო მასალაზე მაშინ მიზანშეწონილია ქსოვილი მთელი ღამითაც მოათავსოთ ინკუბატორში.
5. დაუმატეთ 200 μ l AL ბუფერი ყოველ სინჯს და დაავორტექსეთ.
6. გაცხელეთ ინკუბატორი **70°C!** მოათავსეთ სინჯები 70°C 10 წუთის განმავლობაში..
7. დაუმატეთ 210 μ l 100% სპირტი და დავორტექსეთ.
8. მოათავსეთ სინჯები ფილტრიან მილებში, დააცენტრიფუგირეთ 8000 rpm 1 წთ.
9. გადაღვარეთ გამოდევნებული ბუფერი და დაუმატეთ 500 μ l AW1 ყველ სინჯს. დააცენტრიფუგეთ 8000 rpm 1 წთ.
10. გადაღვარეთ გამოდევნებული ბუფერი, დაუმატეთ 500 μ l AW2 ბუფერი და დააცენტრიფუგეთ 11000 rpm 3 წთ.
11. მოათავსეთ ფილტრიანი სინჯარა **ახალ სინჯარაში**, დაუმატეთ 200 μ l AE ბუფერი მოათავსეთ ოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ. დააცენტრიფუგირეთ 8000 rpm 1 წთ.
12. **არ გადაღვართ! გამოდევნებულ ბუფერში ღნმ-ია გახსნილი!**
13. მოამზადეთ 2 მლ ხრახნიანი მილები, დააწერეთ სინჯის სახელი, სახეობა, თარიღი და თქვენი ინიციალები. გადაიტანეთ ღნმ შესაბამის მილში. გამორთეთ

გამოყენებული ინსტრუმენტები და შეინახეთ სინჯები მაცივარში ჰკრ რეაქციის ჩატარებამდე.

დანართი 2: დნმ-ს ექსტრაქცია ექსკრემენტის სინჯებიდან QIAGEN რეაქტივებით

1. გაასუფთავეთ თქვენი სამუშაო მაგიდა. თქვენს ლაბორატორიულ რვეულში მოამზადეთ ჩანაწერი: სინჯის ნომერი, თარიღი და დეტალურად ჩაიწერეთ რასაც გააკეთებთ. ერთდროულად რამოდენიმე სინჯზე მუშაობისას გაიმეორეთ ყველა საფეხური ყოველი სინჯისთვის ცალ-ცალკე.
2. დარწმუნდით რომ ASL ან AL ბუფერში მარლები არა, თუ კრისტალებს შეამჩნევთ მოათავსეთ თბილ წყალში მარილების სრულ გახსნამდე.
3. ჩართეთ ინკუბატორი 70 C.
4. შეარჩიეთ სინჯები არ არის რეკომენდირებული 20 სინჯზე მეტის გაკეთება. Select Label დააწერეთ სინჯის ნომრები 1.5 ml მილებს. ჩანაწერი გააკეთეთ ლაბორატორიულ რვეულში.
5. მოათავსეთ 0.1 – 0.2 ml ექსკრემენტი მიკროცენტრიფუგის მილში.
6. დაუმატეთ 1.4 ml (1400 µl) ASL ბუფერი ყველა სინჯს. დაავორტექსეთ, სანამ მასა ჰომოგენური არ გახდება. დააცენტრიფუგეთ (13,500 rpm) 1 წთ-ის განმავლობაში.
7. გადაიტანეთ 1.4 მლ თხევადი მასა ახალ 2 მლ მილებში.
8. ამ ეტაპისთვის გააკეთეთ მხოლოდ 10 სინჯი. თუ სინჯებს დიდხანს დატოვებთ ნალექი შეფრევს!
9. დაუმატეთ 1 InhibitEX აბი ყოველ სინჯს. დაავორტექსეთ, სანამ აბი მთლიანად არ გაიხსნება. გააჩერეთ სინჯები ოთახის ტემპერატურაზე 1 წთ.
10. დააცენტრიფუგეთ 3 წთ-ის განმავლობაში. სასწრაფოდ ამოიღეთ სითხე (700 µl) დამოათავსეთ ახალ 1.5 მლ მილში, დაუმატეთ 25 µl Proteinase K. და დაავორტექსეთ.
11. ეპენდორფის მილები მოათავსეთ 55°C და დაავორტექსეთ. ახალი ქსოვილის შემთხვევაში რამოდენიმეჯერ დავორტექსების შემდეგ, დაინახავთ ქსოვილი როგორ იშლება ხსნარში. თუ მუშაობთ სამუზეუმო მასალაზე მაშინ მიზანშეწონილია ქსოვილი მთელი ღამითაც მოათავსოთ ინკუბატორში.

12. დაუმატეთ 600 μ l AL ბუფერი ყოველ სინჯს და დაავორტექსეთ.
13. გააცხელეთ ინკუბატორი 70°C! მოათავსეთ სინჯები 70°C 10 წუთის განმავლობაში..
14. დაუმატეთ 600 μ l 100% სპირტი და დაავორტექსეთ.
15. მოათავსეთ სინჯები ფილტრიან მილებში (Qiagen მოჰყვება) დააცენტრიფუგირეთ 8000 rpm 1 წთ. თუ არ ჩაეტევა გაიმეორეთ ეს საფეხური.
16. გადაღვარეთ გამოდევნებული ბუფერი.
17. დაუმატეთ 500 μ l AW1 ყველ სინჯს. დააცენტრიფუგეთ 8000 rpm 1 წთ.
18. გადაღვარეთ გამოდევნებული ბუფერი, დაუმატეთ 500 μ l AW2 ბუფერი და დააცენტრიფუგეთ 11,000 rpm 3 წთ.
19. მოათავსეთ ფილტრიანი სინჯარა ახალ სინჯარაში, დაუმატეთ 200 μ l AE ბუფერი მოათავსეთ ოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ. დააცენტრიფუგირეთ 8000 rpm 1 წთ.
20. **არ გადაღვაროთ! გამოდევნებულ ბუფერში დნმ-ია გახსნილი!**
21. მოამზადეთ 2 მლ ხრახნიანი მილები, დააწერეთ სინჯის სახელი, სახეობა, თარიღი და თქვენი ინიციალები. გადაიტანეთ დნმ შესაბამის მილში.
22. გამორთეთ გამოყენებული ინსტრუმენტები და შეინახეთ სინჯები მაცივარში პჯრ რეაქციის ჩატარებამდე.

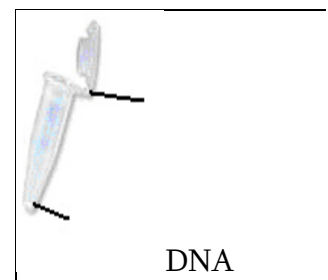
დანართი 3: ჰჯრ პროდუქტების გასუფთავება პოლიეთილენგლიკოლით

მომზადეთ:

20% პოლიეთილენგლიკოლ (PEG) 8000/2.5 M NaCl ხსნარი (შეათბეთ ნივთიერებების სრულ გახსნამდე)

ჰჯრ პროდუქტების გასუფთავება:

1. დაადგინეთ რა მოცულობისაა თქვენი ჰჯრ პროდუქტი (როგორც წესი, 10-15 მკლ უნდა იყოს).
2. აიღეთ 1.5 მლ ეპენდორფის სინჯარა, დანომრეთ თქვენი ჰჯრ-ის სინჯების მიხედვით.
3. ეპენდორფის სინჯარაში მოათავსეთ ისეთივე მოცულობის PEG 8000/2.5 M NaCl ხსნარი, რამდენი მკლ-იცაა თქვენი ჰჯრ პროდუქტი. (შესაბამისად 10-15 მკლ). გამოიყენეთ მხოლოდ ერთი პიპეტის წვერი.
4. ეპენდორფის სინჯარას, ნომრების შესაბამისად დაუმატეთ ჰჯრ პროდუქტი - ყოველ ჯერზე გამოიყენეთ ახალი პიპეტის წვერი.
5. დაავორტექსეთ და მოათავსეთ ინკუბატორში 37°C 15 წთ -ის განმავლობაში.
6. ეპენდორფის სინჯარები მოათავსეთ მიკროცენტრიფუგაში ისე, რომ სახურავების ცენტრი გარეთ იყოს მიმართული (ცენტრიფუგირების დასრულების შემდეგ თქვენი ღნმ სწორედ სახურავების გასწვრივ დაილექება!!! იხ. ფოტო).
7. დააცენტრიფუგირეთ 14 000rpm 8 წთ-ის განმავლობაში. მიკროპიპეტით ამოტუმბეთ ხსნარი ეპენდორფის მილიდან ისე, რომ პიპეტის წვერით არ შეეხოს ღნმ ყოფნის ადგილს.
8. დაუმატეთ 100 მკლ ცივი 70% სპირტი, ფრთხილად გარეცხეთ - მხოლოდ ერთხელ პიპეტირების გზით.
9. დააცენტრიფუგეთ 14 000rpm 3 წთ-ის განმავლობაში და ამოღეთ სპირტი.
10. მოათავსეთ ეპენდორფის მილები ინკუბატორში 25°C 15-20 წთ-ის განმავლობაში, სითხის სრულ გამოშრობამდე.
11. თითოეულ სინჯარას დაუმატეთ 10 მკლ dH₂O.
12. თქვენი სინჯები თავისუფალია ჰჯრ რეაქციის პროდუქტებისგან. სექვენირების დაწყებამდე, რეკომენდირებულია, სინჯები შეამოწმოთ 1.5% აგაროზის გელზე.



დანართი 4: სექვენირებული დნმ-ს გასუფთავება

1. 1.5 მლ ეპენდორფის მილში გააიტანეთ თქვენი სექვენირების რეაქციის პროდუქტი. დაუმატეთ 1 მკლ 3M NaCH₃COO (PH=5.6).
2. დაავორტექსეთ და დაუმატეთ 20 მკლ 100% სპირტი
3. გაყინეთ (მოათავსეთ საყინულეში!) 20 წთ.
4. დააცენტრიფუგეთ 15 წთ 13000 rpm სიჩქარეზე ისე, რომ თავსახურის ნაწიბური წრის გარეთ იყოს მოთავსებული. თქვენი დნმ სწორედ ნაწიბურის ქვეშ დაილექება და ამ გზით ზუსტად გეცოდინებათ სადაა (დანართი 3).
5. ფრთხილად ამოიღეთ სითხე, ისე რომ არ შეეხოთ დნმს ყოფნის ადგილს.
6. დაუმატეთ 150 მკლ 70% ცივი! (მაცივრიდან ახლად გამოღებული) სპირტი ყველა სინჯს.
7. დააცენტრიფუგეთ 13000 rpm 3 წუთის განმავლობაში (თავსახურის ნაწიბური ისევ წრის გარეთ უნდა იყოს მიმართული).
8. ფრთხილად ამოიღეთ სითხე (მაქსიმალურად დიდი რაოდენობის), ისე რომ არ შეეხოთ დნმ-ს ყოფნის ადგილს.
9. დატოვეთ სინჯები ოთახის ტემპერატურაზე 15 წთ ან მეტი დარჩენილი სპირტის სრულ აორთქლებამდე.
10. 10 მკლ დეიონიზირებული ფორმამიდი ჩაასხით თქვენს ეპენდორფის მილში და დაარესუსპენზრეთ პიპეტით რამოდენიმეჯერ აწოვით და ისევ მილში ჩაასხით.
11. ერთი სინჯის რესუსპენზირების დასრულების შემდეგ გადაიტანეთ სექვენირების ყუთში, აუცილებლად ჩაიწერეთ რომელ ველშია თქვენი სინჯი!!!
12. შემდეგ დაარესუსპენზირეთ შემდეგი სინჯი და ა.შ.
13. სექვენირების ყუთს დაახურეთ სეპტა და მოათავსეთ საყინულეში სექვენირების დაწყებამდე.

დანართი 5. გამოყენებული პრაიმერები

პრაიმერი	ნუკლეოტიდური შემადგენლობა	ავტორი	სახეობა, გენი
L16345	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3',	Miller et al. 2006	მურა დათვი (CR)
H16751	5'-CCTGAAGTAGGAACCAGA-3'	Miller et al. 2006	მურა დათვი (CR)
CO1	5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al., 1994	მოლუსკები, CO1
CO1	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer et al., 1994	მოლუსკები, CO1
ITS1	5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3'	Armbruster et al., 2000	მოლუსკები, ITS1
ITS1	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	Armbruster et al., 2000	მოლუსკები, ITS1
L14841	5'-CCA TCCAACATCTCAGCATGATGAAA -3'	Kocher et al. 1989	ხვლიკები, cyt b
H15149	5'-GCCCCTCAGAAATGATATTTGTCCT CA-3'	Kocher et al. 1989	ხვლიკები, cyt b
L14724	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTT -3'	Kocher et al. 1989	ჯეირანი, cyt b
H15149	5'-GCCCCTCAGAAATGATATT TGTCCTCA -3'	Kocher et al. 1989	ჯეირანი, cyt b

დანართი 6: გამოქვეყნებული შრომები:

Murtskhvaladze M, Gavashelishvili A, Tarkhnishvili D. (2010) Geographic and genetic boundaries of brown bear (*Ursus arctos*) population in the Caucasus. *Molecular Ecology*, 19, 1829–1841

Murtskhvaladze M, Gurielidze Z, Kopaliani N, Tarkhnishvili D. (2012) Gene introgression between *Gazella subgutturosa* and *G. marica*: limitations of maternal inheritance analysis for species identification with conservation purposes, *Acta Theriologica*, accepted.

Murtskhvaladze M, D. Tarkhnishvili. 2006. Estimation of brown bear abundance and population structure in Borjomi-Kharagauli National Park with molecular-genetic methods. Volume 4. 43–50. in *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences, Biological series B*, Tbilisi Georgia.

Khorozyan I, MaLKhaSyam A, **Murtskhvaladze M**. (2011) The striped hyaena *Hyaena hyaena* (Hyaenidae, Carnivora) rediscovered in Armenia, *Folia Zool.* 2011, 60 (3): 253–261

Tarkhnishvili D, Gavashelishvili A, Avaliani A, **Murtskhvaladze M**, Mumladze L. 2010, Unisexual rock lizard might be outcompeting its bisexual progenitors in the Caucasus. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2010, 101, 447–460.

Tarkhnishvili D, **Murtskhvaladze M**, Gavashelishvili A. (2012) Speciation In Caucasian Lizards: Habitat Dissimilarity Is More Important Than Isolation Time., submitted.

Mumladze L, Tarkhnishvili D, **Murtskhvaladze M** (2012) Systematics and evolutionary history of Caucasian endemic species of the genus *Helix* (Gastropoda: Helicidae), submitted.