

**TARTU ÜLIKOOL**  
**ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT**  
**ZOOLOOGIA OSAKOND**  
**LOOMAÖKOLOOGIA ÕPPETOOL**

**Killu Timm**

**DRD4 GEENI POLÜMORFISM JA KÄITUMISTUNNUSED**  
**RASVATIASEL (*PARUS MAJOR*)**

Magistritöö

Juhendaja: PhD Vallo Tilgar

**Tartu 2013**

# Sisukord

1. Sissejuhatus .....	3
2. <b>DRD4 geeni polümorfism ja selle mõju käitumisele erinevates loomarühmades</b> .....	<b>5</b>
2.1 Imetajad .....	5
2.2 Linnud.....	6
2.2.1 Varasemad käitumisgeneetika uuringud rasvatihasel .....	8
3. <b>Materjal ja meetodika</b> .....	<b>9</b>
3.1 Uuritav liik.....	9
3.2 Uurimisala ja välitööde meetodika .....	9
3.3 Käitumiskatsed.....	10
3.3.1 Käitumine uudes keskkonnas (uudse objekti katse).....	10
3.3.2 Ähvardav käitumine pesarüüstaja suhtes.....	11
3.3.3 Isalinnu lauluvastus .....	11
3.4 Käitumisgeeni (DRD4) polümorfismide määramine .....	12
3.5 Statistiline andmeanalüüs.....	13
4. <b>Tulemused</b> .....	<b>14</b>
4.1 DRD4 genotüüpide esinemissagedused populatsioonis.....	14
4.2 DRD4 genotüüp ja käitumine .....	15
4.3 Geenid ja sigimine .....	16
4.4 Seosed erinevate käitumistunnuste vahel.....	17
4.5 Käitumistunnuste seosed sugude vahel.....	18
5. <b>Arutelu</b> .....	<b>19</b>
5.1 DRD4 genotüüpide sagedused populatsioonis.....	19
5.2 DRD4 genotüübi mõju käitumistunnuste avaldumisele.....	19
5.3 DRD4 genotüübi mõjud sigimisinäitajatele .....	22
5.4 Käitumistunnuste korreleerumine .....	22
5.5 Käitumistunnuste seosed sugude vahel.....	23
6. <b>Kokkuvõte</b> .....	<b>25</b>
7. <b>Summary</b> .....	<b>26</b>
8. <b>Tänuavaldused</b> .....	<b>27</b>
9. <b>Kasutatud allikad</b> .....	<b>28</b>
10. <b>Lisad</b> .....	<b>33</b>
Lisa 1. Uudse objekti katse ülesehitus.....	33
Lisa 2. DRD4 genotüüpide sageduste võrdlus. ....	34
Lisa 3. DRD4 geeni struktuur .....	34

## 1. Sissejuhatus

Viimastel aastatel on loomade käitumissündroomide uuringud aina rohkem tähelepanu saanud (Sih et al., 2004). Käitumine mõjutab isendite kohanemisvõimet muutlikus keskkonnas ja kujundab seeläbi kohasust (Dingemans ja de Goede, 2004; Dingemans ja Réale, 2005; Korsten et al., 2010). Selleks, et mõista loomade isiksuse varieeruvuse ökoloogilist ja evolutsioonilist tähtsust looduslikes populatsioonides, tuleb mõista neid mõjutavaid molekulaarseid ja geneetilisi mehhanisme.

Enamik informatsiooni käitumistunnuste päritavuse kohta põhineb inimesel (*Homo sapiens sapiens*) (Bouchard, 1994; Benjamin et al., 1997; Ebstein et al., 2000) ja laboris peetavatel närilistel tehtud uuringutel (Dulawa et al., 1999; Grady et al., 2013). Peamiselt on käsitletud hirmu ja ärevuskäitumisega seostuvaid geene ning emotsioone reguleerivaid geene. Näiteks on hiirtel (*Mus musculus f. domesticus*) leitud seos MAOA (monoamiini oksüdaas A) geeni ja agressiivsuse vahel (Cases et al., 1995). Inimese käitumist püütakse sageli mõista läbi loomamudelite kasutamise, kuna eetilistel kaalutlustel ei kasutata inimest sageli katseloomana. Inimuuringutes on olulisel kohal hormoonidega seotud geenid, sealhulgas skisofreeniat ja depressiooni mõjutavad geenid. Hiljutises uuringus leidsid Heiming et al (2013), et näiteks 5-HTT serotoniini transporteri geen on inimesel üks tähtsamaid emotsioonide regulaatoreid, mida seostatakse muuhulgas ärevushäiretega.

Lisaks on olulisel kohal koduloomade ja –lindude käitumisgeneetika uuringud. Koduloomadest on käitumise ja geenide vahelisi seoseid tuvastatud koertel (Hejjas et al., 2009) ja hobustel (Momozawa et al., 2005) ning on uuritud nende agressiivsust ja uudishimulikkust. Kodulindudest on peamiselt katseloomadeks kanad (*Gallus gallus domesticus*), kellel on näidatud MAOA geeni intronis paiknevate erinevate kordusjärjestuste mõju kartlikkusele (Hong et al., 2008) ja 5-HTT geeni tandemjärjestuste (DNA identsete järjestuste koopiad, mis paiknevad kromosoomis üksteise järel) mõju impulsiivsele käitumisele (Abe et al., 2013). Lisaks mõjutavad erinevused dopamiini ja serotoniini süsteemides kanadel sulgede nokkimist liigikaaslastelt, mida seostatakse agressiivsusega (Flisikowski et al., 2009)

Katsed koduloomadega on kasulikud geneetiliste mehhanismide ja käitumistunnuste vaheliste seoste mõistmisel. Kahjuks tuleb tõdeda, et vangistuses peetavate või põllumajandusloomade geneetilised isiksuse uuringud annavad vähe informatsiooni selle kohta, kuidas antud isend looduses käitub.

Looduslikes populatsioonides on käitumise ja geenide seoseid peamiselt uuritud imetajatel ja lindudel, vähesel määral ka kaladel (Wright et al., 2006). Imetajatest on uuritud näiteks reesusmakaakidel (*Macaca mulatta*) isaste käitumist sigimisajal seoses serotoniini transporteri geeniga (Krawczak et al., 2005), metsalindudest on enim uuritud rasvatihast (*Parus major*), kellel

on uuriv käitumine fenotüübiliselt korreleerunud paljude teiste käitumistunnustega ja tugevalt mõjutatud geenide poolt (Groothuis ja Carere, 2005).

Üheks enimuuritud käitumistunnuseid mõjutavaks geeniks on DRD4 geen (dopamiini retseptori D4 geen). Dopamiini retseptorid kuuluvad G-valguga seonduvate retseptorite hulka, mis on olulised selgroogsete kesknärvisüsteemi töös (Neve et al., 2004). Dopamiini ala- või üleregulatsiooni inimesel seostatakse Parkinsoni tõvega, Tourette'i sündroomiga, skisofreeniaga, hüperaktiivsuse ja tähelepanuhäiretega (Missale et al., 1998). On leitud vähemalt viis dopamiini retseptori alatüüpi: D1, D2, D3, D4 ja D5 (Neve et al., 2004). Dopamiini retseptorite geenid erinevad üksteisest kodeerivate järjestuste ja intronite hulga poolest (Missale et al., 1998). On leitud, et dopamiini D1 retseptori geen mõjutab katseloomadel lokomotoorset aktiivsust, D2 ja D3 geenid on osaliselt seotud prolaktiini ja östrogeeni radadega ning mõjutavad ka vanemhoolt ja liikumisaktiivsust (Sealfon ja Olanow, 2000). D4 ja D5 retseptori geene on vähem uuritud, kuid on näidatud, et DRD4 geen mõjutab tugevalt inimesel esinevaid käitumishäireid, mistõttu on antud geeni ka mitmetel teistel loomaliikidel uuritud. Lisaks seostatakse DRD4 geeni motivatsioonilise käitumisega (Netter, 2006) ja ka uuriva käitumise erinevuste põhjustega (Munafò et al., 2008).

Käesoleva töö eesmärgiks on välja selgitada DRD4 geeni mõju vabas looduses elava metsavärvulise – rasvatihase- käitumismustritele. Esmalt uurisin, kuidas varieeruvus DRD4 genotüübis mõjutab käitumistunnuste avaldumist sigimise ajal. Varasemates töödes (Fidler et al., 2007; Korsten et al., 2010) on leitud, et aktiivsema uuriva käitumisega on T/T genotüüp ja pigem aeglasema uuriva käitumisega on C/C genotüüp (SNP830). Käesolevas uurimuses eeldasin, et T/T ja C/T genotüübiga rasvatihased käituvad uudse objekti suhtes julgemalt kui C/C genotüübiga isendid. Samuti testiti DRD4 genotüüpide seoseid looduses esinevate käitumistunnustega (lauluvastus konkurendi laulu ettemängimisele, ähvardav käitumine pesarüüstaja suhtes), mis võiksid peegeldada isiksuse erinevaid aspekte. Teiseks oletasin, et DRD4 geen võib isiksuseomaduste kaudu mõjutada ka sigimisedukust. Ehk lisaks isendi kvaliteedile võivad nii sigimise ajastamine kui ka munemispingutus olla mõjustatud DRD4 genotüübist. Kolmandaks uurisin, kuidas erinevaid isiksuseomadusi peegeldavad käitumistunnused omavahel korreleeruvad. Eelnevates uuringutes on oletatud, et uuriv käitumine korreleerub negatiivselt kartlikkusega kisklusohu tingimustes või agressiivsusega sotsiaalses kontekstis (Dingemans ja de Goede, 2004; Sih et al., 2004). Vastavalt eeldasin, et uudse objekti suhtes ettevaatlikumad linnud on kartlikumad ka kisklusohu korral või sotsiaalses võistulaulmises dominantsemad isendid on julgemad uudse objekti suhtes.

## 2. DRD4 geeni polümorfism ja selle mõju käitumisele erinevates loomarühmades

### 2.1 Imetajad

Imetajatest on DRD4 geeni mõju käitumisele uuritud koertel, hobustel, hiirtel ja primaatidel. DRD4 geeni on seostatud uuriva käitumisega, kuid sageli pole leitud seosed väga tugevad (Kluger et al., 2002). Kuna antud tunnuse avaldumist mõjutavad tugevalt keskkonna ning genotüübi vahelised seosed (näiteks sotsiaalne taust inimesel), võivad need oluliselt segada antud tunnuse avaldumist ja uurimist. Selliseid probleeme püütakse vältida standardiseeritud keskkonda kasutades või genotüüpe selekteerides. Järgnevalt on antud ülevaade varasematest DRD4 geeni ja käitumise seoseid käsitlevatest töödest.

Koerte (*Canis familiaris*) käitumise uurimine aitab tõugude aretamisel säilitada ja valida soovitud isiksuseomadusi. Saksa lambakoertel on leitud seos DRD4 geeni kordusjärjestuste hulga ja aktiivse-impulsiivse käitumise vahel (Hejjas et al., 2009). Mida pikemate alleelidega oli genotüüp, seda agressiivsemat käitumist täheldati (Hejjas et al., 2009). Koerte puhul on oluliseks valikuteguriks kunstlik valik, mille käigus on inimene eelistanud kindlate isiksuseomadustega koeri (Hejjas et al., 2009).

Hobustel (*Equus*) on DRD4 geenis 18 aluspaariga järjestus, mis erineb isendite vahel kordusjärjestuste arvu poolest ning on näidatud, et selle järjestuse polümorfismid mõjutavad hobuste isiksust (Momozawa et al., 2005). Uudishimu ja valvsus on seotud A-G punktmutatsiooniga vastavas geenipiirkonnas. Guaniini asendumine adeniiniga vastavas geenipiirkonnas oli seotud isendite väiksema uudishimu ja suurenenud valvsusega (Momozawa et al., 2005). Hobustega tehakse uuringuid küllaltki väikeses mahus, põhjuseks on eelkõige loomade suurus ja pikk eluiga (Momozawa et al., 2005). Üldiselt kasutatakse käitumisuuringutes koerte ja hobuste asemel pigem närilisi.

Laborihiirte käitumise uurimiseks kasutatakse *knock-out* (homosügootse väljalülitusega geeniga) hiirte ja metsiktüüpi (*wildtype*) hiirte käitumist nn avatud välja, ohuolukorra ja uue objekti testides. *Knock-out* hiirtel on dopamiini retseptori geen D4 inaktiivne, mutatsioon esineb intronis (Dulawa et al., 1999). Kõigi kolme testi põhjal näidati, et töötava DRD4 geenita hiired olid vähem uudishimulikumad (Dulawa et al., 1999). Uuemad tööd on näidanud võimalikku seost hiirte eluea ja DRD4 geeni polümorfismide vahel. Teatud genotüübiga isendid on füüsiliselt aktiivsemad ning nende eluiga antud katses oli pikem, samas kui *knock-out* DRD4 geeniga hiirtel oli sageli lühim eluiga (Grady et al., 2013).

Primaatide sotsiaalne süsteem on väga erinev. Osad rühmad elavad karjas nagu šimpansid (*Pan troglodytes*) ja bonobod (*Pan paniscus*), osad üksikult nagu gorilla (*Gorilla*), mistõttu on erinevate liikide käitumismustreid ja käitumist mõjutavaid geene keeruline võrrelda (Inoue-Murayama, 2009). Kuid näiteks rohepärdikutel (*Chlorocebus aethiops*) leitud, et DRD4 geen mõjutab uurivat käitumist (Bailey et al., 2007). DRD4 geeni teatud alleelide kordusjärjestuste hulk on suurenenud primaatidelt inimesele ning on leitud, et mida rohkem on antud geenis kordusjärjestusi, seda tõenäolisemalt on loom uurivama käitumisega (Inoue-Murayama, 2009).

DRD4 geeni on inimesel püütud seostada uuriva käitumisega, füüsilise aktiivsusega ja eluea kestusega (Kluger et al., 2002; Grady et al., 2013). Samas, kultuurilised ja keskkonnamõjud mängivad inimesel niivõrd suurt rolli käitumise kujunemisel, et geneetilise tausta hinnangud ei pruugi olla tõesed. Näiteks mõjutab õpitud käitumine tugevalt inimese käitumisgeneetika uuringuid (Kluger et al., 2002).

Kuigi inimesel ei ole leitud DRD4 geeni otsest seost uuriva käitumisega, on hoopis välja toodud, et antud geeni polümorfismid võivad kujundada seksuaalkäitumist. Isendid, kellel paiknesid uuritud alleelid kindlas järjestuses (5 alleeli järjest) olid väiksema ihaga ning nende seksuaalkäitumises esines rohkem tõrkeid (Zion et al., 2006).

## 2.2 Linnud

Paljudel linnuliikidel (Tabel 1) on leitud DRD4 geeni polümorfisme (Sugiyama et al., 2004; Abe et al., 2011), kuid antud geenivariantide seoseid käitumisega uuritud üsna vähestel linnuliikidel (rasvatihastel, sinitihastel, kanadel ja flamingodel).

Kodulindudel (kanalised) peetakse DRD4 geeni üheks tõenäoliseks põhjuseks, miks vangistuses peetavatel isenditel areneb välja nn sulgede nokkimine – agressiivsus oma kaaslaste suhtes. Antud käitumine võib põhjustada tugevaid sulekahjustusi, mille tagajärjel esineb loomal märgatav soojakadu. Sarnaselt rasvatihasele esineb kanadel DRD4 geenis ühe nukleotiidi polümorfism (SNP), ka erinevad kanatõud polümorfismide esinemissageduse poolest (Flisikowski et al., 2009).

DRD4 geeni polümorfism kolmandas eksonis mõjutab flamingode (*Phoenicopterus roseus*) üldist konditsiooni noores eas ning sõltuvalt konditsioonist erineb isendite käitumine (Gillingham et al., 2012). Oletatavasti mängib DRD4 geen rolli toidu omastamisel: on näidatud, et flamingode noorlindudel on toidu hankimisega raskusi ning nad kulutavad ringiliikumisele rohkem aega, kui seda teevad vanalinnud (Bildstein et al., 1991).

Sinitihasel (*Cyanistes caeruleus*) on uuritud DRD4 geeni seoses neofobiaga, aktiivsusega ja põgenemiskiirusega (Kluen et al., 2012). Antud töös leiti, et neofobiaga seotud käitumine ja

põgenemisaeg kiskja suhtes olid kõrge korduvusega ja ei sõltunud aastaajast, soost ega vanusest (Kluen et al., 2012). Põgenemiskäitumine seostus kolmandas eksonis paikneva üksiknukleotiidi polümorfismiga SNP905: niinimetatud G/G genotüübiga lindudel võttis põgenemine tunduvalt rohkem aega kui A/A ja G/A genotüübiga isenditel (Kluen et al., 2012). Samas, genotüüp ja käitumine uudse objekti suhtes (plastmassist roosa pörsas) ei seostunud kummagi SNP-ga (Kluen et al., 2012).

**Tabel 1** DRD4 geeni polümorfismide esinemine lindudel (Abe et al., 2011) järgi.

<b>Selts</b>		<b>Seos käitumisega</b>
Hanelised	<i>Anseriformes</i>	
Kurvitsalised	<i>Charadriiformes</i>	
Toonekurelised	<i>Ciconiiformes</i>	
Tuvilised	<i>Columbiformes</i>	
Käolised (turakod)	<i>Cuculiformes</i>	
Pistrikulised	<i>Falconiformes</i>	
<b>Kanalised</b>	<b><i>Galliformes</i></b>	
	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Sulgede nokkimine (Flisikowski et al., 2009)
<b>Värvulised</b>	<b><i>Passeriformes</i></b>	
	<i>Cyanistes caeruleus</i>	Neofoobia ja põgenemiskiirus (Kluen et al., 2012)
	<i>Parus major</i>	Uuriv käitumine (Fidler et al., 2007; Korsten et al., 2010; Mueller et al., 2013)
Pelikanilised	<i>Pelecaniformes</i>	
<b>Flamingolised</b>	<b><i>Phoenicopteriformes</i></b>	
	<i>Phoenicopterus roseus</i>	Konditsioon ja toitumine (Gillingham et al., 2012)
Rähnilised	<i>Piciformes</i>	
Tormilinnulised	<i>Procellariiformes</i>	
Papagoilised	<i>Psittaciformes</i>	
Pingviinilised	<i>Sphenisciformes</i>	

### 2.2.1 Varasemad käitumisgeneetika uuringud rasvatihasel

Varasemates uuringutes rasvatihasel on näidatud DRD4 geeni ja uuriva käitumise vahelist seost nii looduslikes populatsioonides kui ka laboritingimustes (Fidler et al., 2007; Korsten et al., 2010). Selektiivset valikut kasutades on kindlaks tehtud uuriva käitumise geneetiline taust (Drent et al., 2003). DRD4 geeni T-alleeli sisaldava genotüübiga isendid on domineerivamad ja kiirema uuriva käitumisega, C/C genotüübiga isendid aga kõige aeglasema uuriva käitumisega (Fidler et al., 2007; Korsten et al., 2010). Rasvatihasel on kodeeritav DRD4 valk 56% ulatuses sarnane inimese DRD4 valguga ja nagu ka inimesel, on rasvatihase DRD4 geen kõrgelt polümorfne: leitud on 98 SNP-d, millest üks on seostatav uuriva käitumisega (SNP830) (Fidler et al., 2007; Mueller et al., 2013). Ebaselge on SNP830 mõju avaldumine, kuna polümorfism on sünonüümne (mutatsioon on DNAs) ja erinevus ei kajastu sünteesitud valgu struktuuris (Fidler et al., 2007). Oletatakse, et sünonüümsed polümorfismid võivad osaliselt mõjutada transkriptsiooni, splaissingut (intronite väljalõikamist RNAs), mRNA stabiilsust ja translatsiooni dopamiini retseptorites (Duan et al., 2003).

Uuritud on rasvatihase populatsioone Hollandis, Belgias ja Suurbritannias. Ühes neist, Westerheides (Holland), leidsid Fidler et al (2007) olulise seose uuriva käitumise ja genotüübi vahel. Korsten et al (2010) kinnitasid varasemalt Westerheide populatsioonis leitud seost genotüüpide ja käitumise vahel. Eelnimetatud uuringutes hinnati isendite uurivat käitumist standardiseeritult võõras keskkonnas (liikumisaktiivsust ning lähenemisjulgust tundmatutele objektidele). Eksperimentides kinnitati nii käitumise korduvust kui ka tunnuse päritavust (Fidler et al., 2007; Korsten et al., 2010). Selgus, et uuriva käitumise tulemused ei erinenud sugude vahel ega seostunud vanuse ja konditsiooniga (Fidler et al., 2007; Korsten et al., 2010). Lisaks tehti osa katseid väljaspool sigimisperioodi vähendamaks potentsiaalset varieeruvust, mis võib tuleneda sigimiskäitumisest (Korsten et al., 2010).

Uurivat käitumist hindavate testide kasutamist tihasel on aga kritiseeritud, kuna liikumisaktiivsus vangistuses võib peegeldada mingit muud käitumist, mis pole seotud uuriva käitumisega looduses (Hughes, 1997). Näiteks võib antud käitumine võib näidata, et linnud tundsid vähem hirmu. Lisaks ei pruugi laboratoorsed hinnangud olla head pärilike seoste näitajad, kuna loodusliku keskkonna varieeruvust kunstlikes tingimustes on keerukas jäljendada. Mitmete kõrvutatavate uuringute tulemused on näidanud, et laboris tehtavad katsed hindavad tulemust veidi üle, võrreldes samade katsetega looduslikes populatsioonides (Blanckenhorn, 2002).



### 3. Materjal ja metoodika

#### 3.1 Uuritav liik

Rasvatihane (*Parus major*) on tihaslaste (*Paridae*) hulka kuuluv putuk- ja seemnetoiduline lind. Rasvatihane on monogaamne territoriaalne värvuline, kes pesitseb puuõõnsustes ja pesakastides ning on laialdase levikuga kogu palearktilises regioonis (Perrins, 1965). Eestis on lind laialtlevinud, tema pesitsusaegset arvukust hinnatakse 300 000 – 400 000 paarile, talvist arvukust 0,6 - 1,2 miljonile isendile (Eltis et al., 2009). Rasvatihane on Eesti suurim tihane, kehapikkus on keskmiselt 15 cm, mass keskmiselt 15-20 grammi. Kõhtmine pool on isastel erkkollane, musta kesktriibuga, emased on pisut kahvatumad ning sageli kitsa või katkestatud kesktriibuga, mis võimaldab väliselt sugusid eristada.

Rasvatihane alustab pesitsemist aprilli keskpaigas. Suluspesitsejana rajab ta õõnsusesse pesa, mis koosneb samblast, vooderduses kasutab karvu ja sulgi. Kurnas on enamasti 6-12 valkjaroosakat roostepruunide täppidega muna. Mõnikord võib esineda ka teistkordset pesitsemist (teist kurna) juuni lõpus ja juulis. Mune haub ainult emalind keskmiselt 12 päeva, poegi toidavad mõlemad vanalinnud kuni lennuvõimestumiseni 17-21 päeva vanuses. Rasvatihase looduslikest vaenlastest ohustavad poegi peamiselt rähnid, täiskasvanud lindude vaenlaseks on raudkull (*Accipiter nisus*).

Rasvatihased on sobivad uurimisobjektid nii käitumis- kui ka muude katsete jaoks, kuna on suluspesitsejad (pesitsevad edukalt pesakastides), on arvukad ning neil esineb suguline dimorfism.

#### 3.2 Uurimisala ja välitööde metoodika

Uurimisala paikneb Pärnumaal Kilingi-Nõmme linna ja Saarde valla asunduste ümber (58°7' N, 25°5' E). Puistutes on okasmets suuremate massiividena, lehtmets laiguti. Pesakastid paiknevad nii leht-kui ka okasmetsas, üksteisest vähemalt 50m kaugusel, umbes 1,5m kõrgusel, enamasti liinidena mööda maanteeosvi ja metsasihte. Kokku on uurimisalal rohkem kui tuhat pesakasti. Kasutusel on puidust standardsete mõõtmetega pesakastid (11x11x30 cm), lennuava diameetriga 3,5-4,0 cm.

Lindude poolt asustatud pesakaste kontrolliti regulaarselt, et määrata munemise algus, kurna suurus, haude vältus ning poegade koorumisaeg ja poegade arv. Rüüstatud ja mahajäetud pesi analüüsi ei kaasatud. Vanalinnud püüti pesakastidest pesitsemisperioodi teisel poolel. Peale püüdmist kaaluti linnud *Pesola* vedrukaaluga (täpsus 0,1g) ja mõõdeti jooksme- ja tiivapikkus nihikkaliibriga (täpsus 0,1mm). Vereproov võeti 10-15 minuti jooksul peale kinnipüüdmist tiiva-või

jalaveenist hepariniseeritud kapillaari. Verekapillaarid tsentrifugeeriti samal päeval (10 minutit; 10 621 g) ning proovid säilitati algul  $-20^{\circ}\text{C}$  juures, hiljem  $-70-80^{\circ}\text{C}$  juures.

Sigimismäitajatesse kaasati vaid esimese kurna andmed. Emalinnud ( $N=115$ ) alustasid kõige varem munemisega 25. aprillil, hiliseim alustaja oli 5.mai. Keskmiselt alustasid emalinnud munemisega kõige sagedamini 29-30. aprillil. Kurnas oli 6 kuni 14 muna, keskmiselt oli pesades 11 muna.

### **3.3 Käitumiskatsed**

Sõltuvalt käitumiskatses erines valim olulisel määral. Uudse objekti katses hinnati käitumist 110-l linnul (57 isast, 53 emast); osa filmitavatest pesakastidest jäi kasutamata, kuna linnud katse ajal poegi ei toitnud. Ülelaulmise protsenti oli võimalik hinnata 39-l isalinnul, ähvardavat käitumist pesarüüstaja suhtes 103-l emalinnul. Käitumist hinnates eeldasin, et käitumine sõltub nii genotüübist, isendi kvaliteedist kui ka pesakonna väärtusest.

#### **3.3.1 Käitumine uudes keskkonnas (uudse objekti katse)**

Uudse objektiga seotud katse viidi läbi 76 pesitsuspaaril. Katse ajal olid pesas olid 8-10 päevased pojad – vanematel pidi olema motivatsioon pessa pöörduda, samas pidid pojad olema piisavalt tugevad, et vanalindude käitumise muutused katse ajal nende ellujäämist oluliselt ei ohustaks. Katse toimus mai lõpust juuni alguseni, hommikul kella 6-st kuni päeval 14-ni, ajal, mil vanalindude toitmisaktiivsus oli kõige suurem.

Eksperiment koosnes kahest faasist: kontrollist ja manipuleeritud faasist. Kontrolli jaoks filmiti pesakasti umbes 10 meetri kauguselt (sõltuvalt maastikust) 15 minutit. Kontrollfaasis mõõdeti videosalvestistelt vanalindude toitmispausi pikkust (sekundites) vastusena kaamera ülespanekule.

Katse alguses asetati pesakasti katusele rasvatihase jaoks tundmatu objekt (Eppendorfi tuubide säilitamise karp). Kuigi katses kasutatav uudne objekt (karp) oli erinevat värvi (kollane/oranž/roosa), leidsin, et objekti värv katse tulemust ei mõjutanud (emane:  $GLZ: p=0,83$ ;  $N=50$  ja isane:  $p=0,43$ ;  $N=55$ ). Karp asetati ühe külje peale püsti pesakasti katusele, ümberkukkumise vältimiseks kinnitati traadiga ümber puu. Uudse eseme valimisel lähtuti sellest, et objekt oleks võimalikult tundmatu, kuid mitte hirmutav. Sarnast meetodikat on kasutanud ka Krams et al (käsikiri) oma katses. Nende poolt kasutatavaks tundmatuks objektiks oli poolik tennispall (lilla või kollane) (Krams et al., käsikiri).

Peale uudse objekti ülespanekut filmiti pesakasti 30 minutit, kaamera paiknes 10 meetri kaugusel. Filmiti pesaava ja umbes 2 meetri raadiuses ka ümbrust (sõltuvalt maastikust). Antud

vahemaa võimaldas salvestiselt määrata sugusid ning kindlaks teha, millal isend tundmatut objekti märkas. Jääb võimalus, et objekti märgati ka varem, kuid seda vähestel juhtudel (pigem okasmetsas, kus maastik seda võimaldas). Uudse objekti katses käitumise korduvust ei mõõdetud, kuna kohanemine võib mõjutada katsetulemust.

Lindude uuriva käitumise hindamiseks mõõdeti järgmisi tunnuseid: üldine toitmispaus kasti minekuni (kontrollis ja katses) ja uudse objektiga seotud toitmispaus (lühiajaline viivitus pärast objekti märkamist). Tunnuseid mõõdeti videosalvestuselt (Sony DCR-HC96E ja Canon Legria HF R306), hinnati käitumise ajalist kestvust.

Üldine toitmispaus on defineeritud kui ajavahemik, mis kulus isendil kasti minekuks alates kaamera ülespanekust kontrollfaasis või alates võõra objekti ülespanekust manipuleeritud faasis. Kuna üldise toitmispausi keskväärtused manipulatsiooni ja kontrolli ajal ei erinenud, võeti need kokku üheks tunnuseks (arvutati kahe faasi keskmise).

Uudse objektiga seotud toitmispaus on ajavahemik võõra objekti märkamisest kuni kasti sisenemiseni. Jagatud viide kategooriasse: 0 – siseneti koheselt kasti,  $<10s=1$ ,  $<30s=2$ ,  $30s-1\text{ min}=3$ ,  $>10\text{min}=4$ . Paarisiseselt uudse objektiga seotud toitmispaus ei korreleerunud (Spearman;  $p=0,9$ ;  $R=-0,01$ ;  $N=48$ ), mistõttu eeldan, et vanalinnud ei mõjutanud üksteist olulisel määral.

Uudse objektiga seotud katse ebaõnnestus 12-s pesakastis. Tulemust ei saanud hinnata kastides, kus mingil põhjusel kumbki vanalind ei julgenud kastile 45 minuti jooksul ligineda. Osaliselt võis määravaks teguriks olla ilm (liiga külm hommik või vihmasadu).

### **3.3.2 Ähvardav käitumine pesarüüstaja suhtes**

Lisaks uurivale käitumisele mõõdeti emaslinnu reaktsiooni võimalikule ohule poegade suhtes. Katse toimus umbkaudu haudumisperioodi keskel (15.-22. mail), sest sel ajal viibib emane enamiku ajast pesal. Katses asetati pesakasti avasse suur-kirjurähni topis (*Dendrocopos major*) ning hinnati emalinnu reageeringute arvu (susin ja tiibadega vehkimine) 5 sekundi jooksul. Susinate arv varieerus vahemikus 0-5 korda. Kui lind 5 sekundi kestel ei reageerinud (ei susistanud ega reageerinud mingil muul moel), omistati reaktsiooniks nullväärtus. Ülejäänud juhtudel hinnati susisemiste arvu. Korduskatsed toimusid 2-päevaste vahedega. Eelnev (2011 läbiviidud) pilootuuring näitas, et susina-käitumine on kõrge korduvusega tunnus ( $r=0,7$ ;  $p<0,001$ ;  $N=52$ ).

### **3.3.3 Isalinnu lauluvastus**

Isalinnu lauluvastust hinnati ettemängitud helisalvestise (rasvatihase laul) suhtes. Katse viidi läbi hommikul kella 5-st kuni 12-ni päeval, ajal, kui emalinnud munesid (pesas 3-5 muna). Katse kestus oli umbes 20 minutit. Korduskatse teostati 3 päeva hiljem. Katse eel tõmmati loosi, millist

salvestust eelnevalt salvestatud variantidest ette mängida. Katses kasutati 10 erinevat salvestist juhuslike isalindude territoriaalsest laulust, millest 9 olid kokku pandud 2011. aastal ning üks 2010. aastal salvestatud lauluvastustest. Igal salvestisel vahetas isalind vähemalt ühel korral laulutüüpi. Lindistuste töötlemiseks kasutati programmi Avisoft-SASLab Pro. Lindistust mängiti järjest, kuni isalind vastas; edasi mängiti vahelduvalt, püüdes kohalikku isalindu mitte katkestada ehk teda ise mitte üle laulda.

Mõõdetavaks tunnuseks oli ülelaulmise osakaal reageeriva isalinnu laulufraaside üldarvust ehk hinnati protsentuaalselt, kui sageli laulis kohalik tihane lindi-rivaali laulufraase üle. Kokku loeti kõik korrad, mil kohalik vastas kohe pärast laulufraasi ettemängimist lindilt. Nendest eristati korrad, millal isalind hakkas laulma enne, kui lint lõpetas mängimise (ülelaulmine) ning korrad, millal kohalik hakkas laulma alles pärast lindi lõppu (vahelduv laulmine). Protsendi moodustasid ülelaulnud korrad kõikidest vastustest lindifraasidele.

### 3.4 Käitumisgeeni (DRD4) polümorfismide määramine

Rasvatihase genotüübi määramiseks eraldati verest DNA, kasutades selleks reaktiivide komplekti *Roche kit 18*. Metoodika ja praimerite järjestused saadi Fidler et al. 2007 artiklist, kohaldades PCR reaktsioonitingimusi vastavalt oludele. Kokku määrati DRD4 genotüüp 98-l linnul.

10 µl PCR reaktsioonisegu sisaldas 1 µl (ca 2 ng) genoomset DNA-d; 0,1 µl *Recombinant Taq* polümeraasi (*Fermentas*); 0,2 mM dNTP-sid, 1 µl reaktsioonipuhvrit (*Fermentas või Naxo*); 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 pM kumbagi praimerit ( F: 5'-AAGCTGAGAGGCTGCATCTAT GG-3' ja R: 5'ATC-CCACTGTTTCATCCCACACTC-3') ja teistest komponentidest ülejäänud koguse vett. Kasutati järgmisi PCR termilisi tsükleid: algul 4 min kuumutamiseks 94° C juures, järgnes 27-30 tsüklit 30 sekundit 94° juures, 30 sekundit 61° juures ja 30 sekundit 72° juures. Viimasele tsüklile järgnes 4 minutit 72°-ses keskkonnas.

SNP830 omab alleelispetsiifilist restriksioonikohta ensüümile Pdi I (*Fermentas*). Reaktsioonitingimused ja -aeg võeti vastavalt tootja juhendile. DNA fragmendid lahutati agarosgeelelektrofooresil, homo- ja heterosügootid määrati silma järgi, eristades agarosgeelil erinevalt liikunud fragmente. Lisaks telliti sekveneerimine täisteenusena Eesti Biokeskusest, kus kasutatakse *Applied Biosystems* sekveneerimisplatvormi. Saadud sekvensid järjestasin ja määrasin programmiga ClustalW (BioEdit). SNP830 T/T homosügootidel esineb 152 aluspaariga fragment, SNP830 C/C homosügootidel 117 aluspaariga lõik ja SNP830 C/T heterosügootidel vastavalt siis 117 aluspaariga ja 152 aluspaariga lõik. T alleel on rasvatihasel osaliselt domineeriv ja T alleeliga lindudel on näidatud kiiremat uurivat käitumist.

### 3.5 Statistiline andmeanalüüs

Kõik statistilised analüüsid peale Hardy-Weinbergi tasakaalu määramise teostati Windows`ile mõeldud programmiga STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2007). Populatsioon, kus kehtib Hardy-Weinbergi võrrand, on geneetilise tasakaalu seisundis ja püsib selles, kuni mingi geneetilise dünaamika tegur (evolutsioonitegur) ei põhjusta muutusi. Kui lihtsaima mudelina vaadelda üht autosoomset dialleelset lookust, mille alleelide A ja a sagedused geenifondis on vastavalt  $p$  ja  $q$ , siis väljendab seost alleelisageduste ja genotüübisageduste vahel võrrand:  $[p(A) + q(a)]^2 = p^2(AA) + 2pq(Aa) + q^2(aa) = 1$  (Mart Viikmaa, Klassikalise geneetika leksikon, <http://biomedicum.ut.ee/~martv/genolex.html>, 9.05.13).

Osa tunnuseid tuli normaaljaotuse saamiseks logaritmidada. Pärast logaritmi kasutamist olid normaaljaotusega tunnusteks lisaks isase ülelaulmise protsendile ja konditsiooniparameetritele ka isase ja emase üldine toitmispaus. Ülejäänud uuritavad tunnused (uudse objektiga seotud toitmispaus, ähvardav käitumine pesarüüstaja suhtes, kurna suurus ning munemise algusaeg) polnud normaaljaotusega. Lisaks polnud uudse objekti katses võimalik emast ja isast ühte mudelisse lisada, kuna analüüsis polnud võimalik arvesse võtta pesakasti kui faktorit, sest osade genotüüpide kombinatsioonid polnud esindatud üheski pesas (näiteks isane TT ja emane TT genotüübiga). Standardiseeritult on analüüsis kasutatud munemise alguse kuupäeva, mis on standardiseeritud 1. aprilli suhtes.

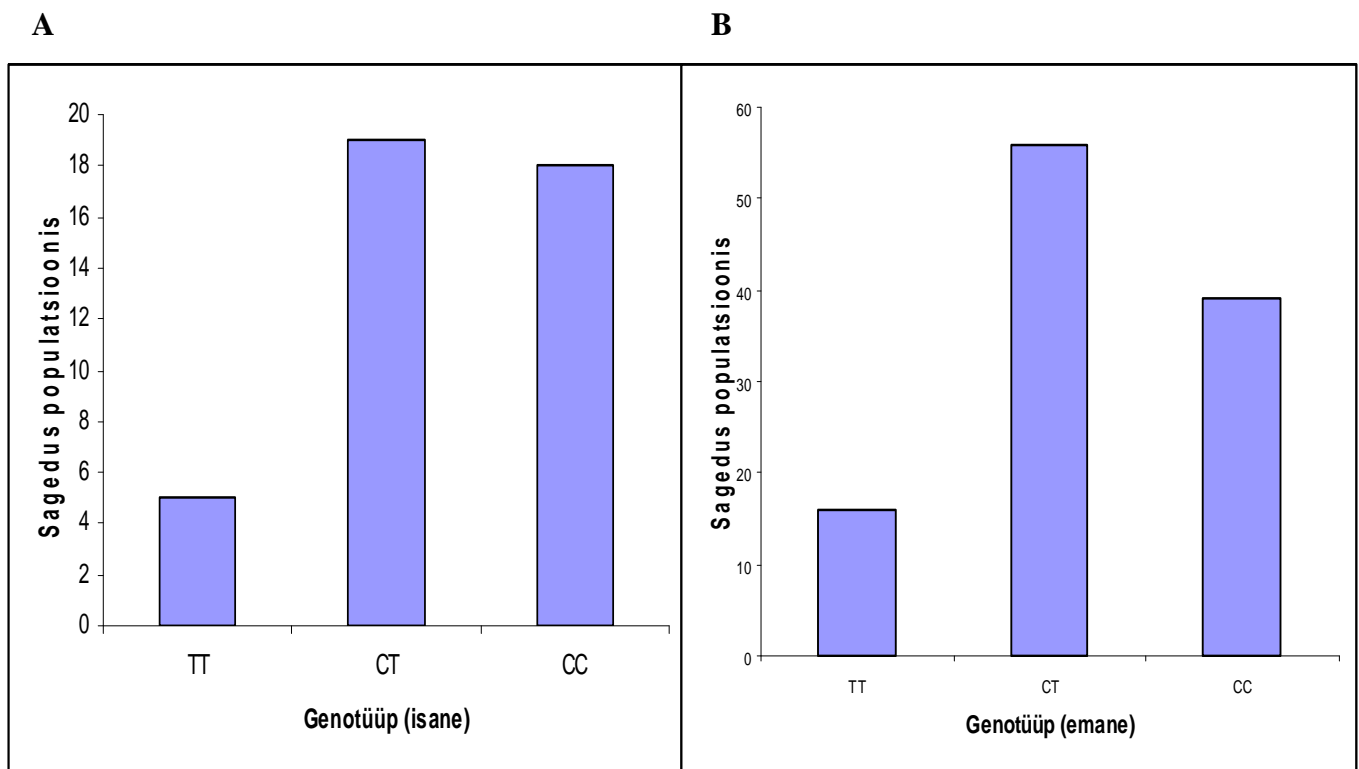
Normaaljaotustega tunnuste korral analüüsiti tulemusi üldise lineaarse mudeliga (GLM). Tunnuseid, mis ka pärast transformeerimist polnud normaaljaotusega, analüüsiti üldistatud lineaarsete mudelitega (GLZ) või mitteparameetriliste mudelitega (Spearmani korrelatsioonid, Kruskal-Wallis ANOVA).

GLZ mudelis kasutasin ordinaalset multinomiaalset (*Ordinal multinomial*) jaotust, mis võimaldas uudse objektiga seotud toitmispausi kui järjestatud kategoorilise tunnuse hindamist. Lisaks oli GLZ mudeliga võimalik hinnata kovariaatide mõju. Uudse objektiga seotud toitmispausi puhul võtsin algmudelis kovariaatidena arvesse massi ja jooksmise pikkuse ning 8-päevaste poegade arvu (pesakonna suurus mõjutab vanalindude motivatsiooni tagasi pöörduda) mõju. Hinnates munemisaja ning genotüübi seoseid, kaasasin kovariaatidena ka kurna suuruse ja konditsiooniparameetrid. Kovariaatide eemaldamine toimus tagurpidise samm-sammulise meetodiga (*Backward stepwise elimination*), kus eemaldasid ükshaaval GLZ mudelist suurima P väärtusega kovariaadi ning jättes mudelisse alles ainult olulise mõjuga kovariaadid.

## 4. Tulemused

### 4.1 DRD4 genotüüpide esinemissagedused populatsioonis

Populatsioon ei erinenud Hardy-Weinbergi geneetilisest tasakaalust, seos alleelisageduste ja genotüübisageduste vahel oli 0,98 (vt meetoodika); (Pearson  $X^2 = 8,3$ ;  $df=4$ ;  $p=0,08$ ,  $N=111$ ). Populatsioonis oli domineeriv DRD4 geeni heterosügootne C/T genotüüp, kokku esines antud genotüüpi 56-l isendil. Homosügootidest esines populatsioonis enim C/C alleelidega isendeid (39), T/T genotüüpi täheldati 16 juhul. Võrreldes emastega, esines isaste hulgas enam C/C genotüübiga linde, emastel oli sagedasem C/T genotüüp. Suhtelistelt vähe esines mõlema soo puhul T/T genotüüpi. Kokku määrati genotüüp 111-l linnul, kellest emaseid oli 69 ja isaseid 42 (joonis 1A, B).

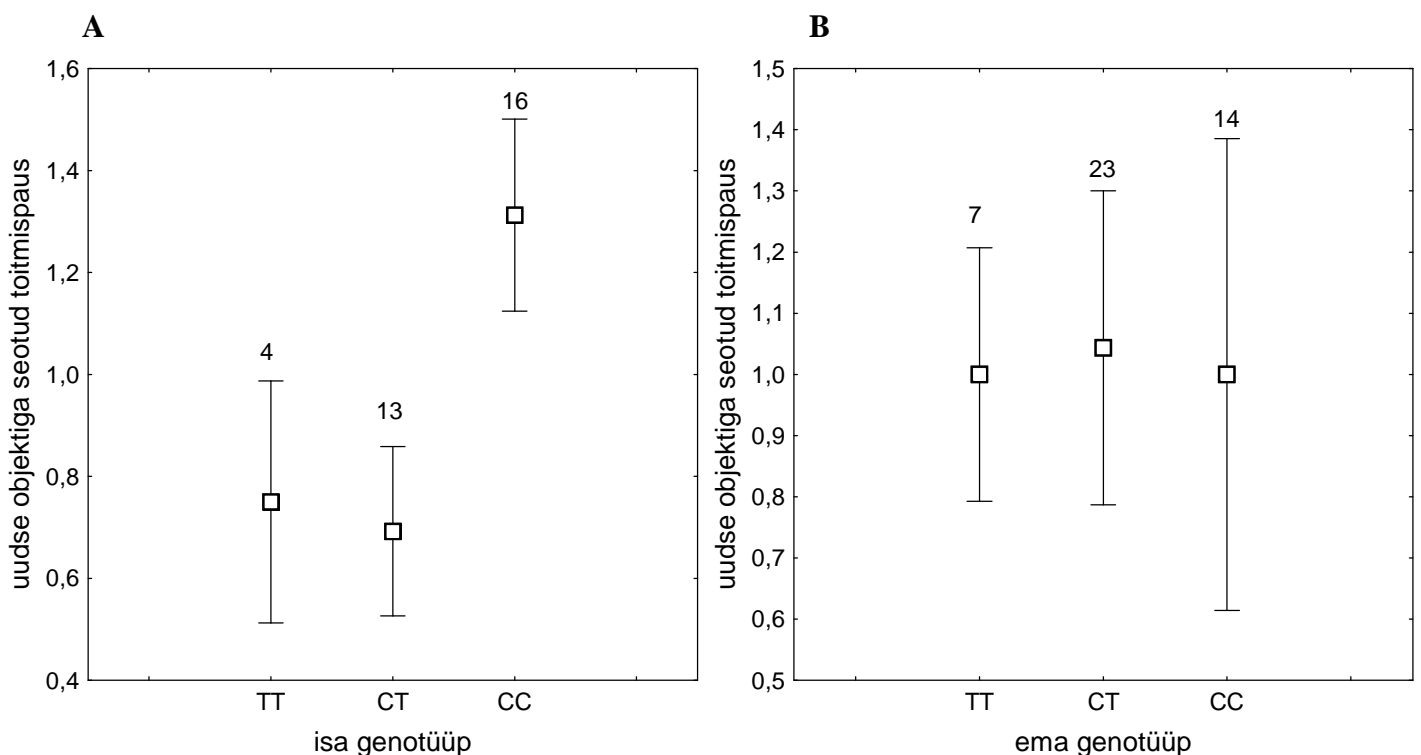


Joonis 1. DRD4 geeni genotüüpide sagedused isasel (A) ja emasel (B) Kilingi-Nõmme tihasepopulatsioonis (2012).

## 4.2 DRD4 genotüüp ja käitumine

Uudse objektiga seotud toitmispausi pikkuse ja genotüübi vahelist seost hinnati emastel ja isastel eraldi. DRD4 genotüüp mõjutas oluliselt uudse objektiga seotud toitmispausi isastel (GLZ;  $p=0,042$ ,  $N=33$ ). Kõige enam viivitasid poegade toitmisega C/C genotüübiga isalinnud, C/T ja T/T alleelidega isendite puhul oli toitmispaus lühem ja nende vahel olulist erinevust ei avaldunud (joonis 2A). Paariviisilised testid näitasid, et oluline erinevus ilmnes C/T ja C/C vahel ( $p=0,021$ ), kuid mitte T/T ja C/T vahel ( $p=0,1$ ). Isalinnul mõjutas tunnust ka jooksmise pikkus. Algsesse mudelisse lisati kovariaatidena mass ja jookse (konditsiooni näitavad parameetrid). Jookse omas olulist mõju:  $p=0,03$ ; seos on positiivne.

Emalindudel oli uudse objektiga seotud toitmispaus kõigi genotüüpide osas sarnane, selgeid erinevusi ei esinenud (GLZ;  $p=0,63$ ;  $N=44$ ; joonis 2B). Küll aga mõjutas emasel uudse objektiga seotud toitmispausi negatiivselt pesas olevate 8-päevaste poegade arv (GLZ;  $p=0,046$ ;  $N=43$ ).

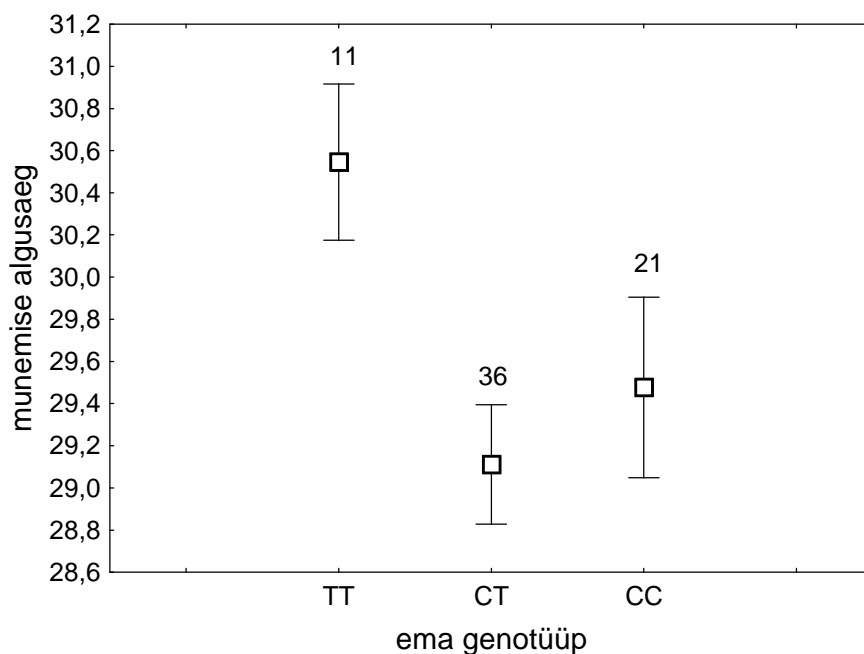


Joonis 2. Uudse objektiga seotud toitmispausi pikkus seoses DRD4 genotüübiga rasvatihase isalindudel (A) ja emalindudel (B). Joonis on illustratiivne, keskvaärtused on esitatud koos standardveaga (SE), numbrid näitavad isendite arvu.

Enne uudse objekti katse läbiviimist hinnati DRD4 genotüübi seost ka teiste käitumistunnustega. Emalindude puhul hinnati ähvardavat käitumist pesariüstaja suhtes, isalindudel hinnati ülelaulmiste arvu ettemängitud laulufraaside suhtes. Mõlemal juhul antud käitumistunnused genotüübiga ei seostunud: ähvardav käitumine pesariüstaja suhtes (emane): Kruskal-Wallis ANOVA;  $H=2$ ;  $p=0,49$ ;  $N=92$ ; lauluvastus (isane): Kruskal-Wallis ANOVA;  $H=2$ ;  $p=0,2$ ;  $N=14$ . Samuti hinnati sigimisinäitajate ja konditsiooni mõju emase ähvardavale käitumisele pesariüstaja suhtes, oletades, et antud parameetrid võiksid emalinnu reaktsiooni ohuallikale mõjutada. Ei kurna suurus ega munemisaja algus emase reaktsiooni olulisel määral ei mõjutanud ( $p>0.1$ ). Ka isase lauluvastuse puhul konditsioon selget mõju ei omanud ( $p=0,53$ ).

### 4.3 Geenid ja sigimine

Emalindudel vaadeldi lisaks käitumistunnustele ka genotüübi mõju sigimisparameetritele (munemisaja algus ja kurna suurus). Analüüsidest sigimisinäitajaid seoses genotüübiga selgus, et munemise algusaeg sõltub emase genotüübist (Kruskal-Wallis ANOVA;  $H=2$ ;  $p=0,05$ ;  $N=68$ ). Kõige hiljem alustab munemist T/T genotüüp, C/C ja C/T genotüübiga linnud alustavad enam-vähem samal ajal (joonis 3). Paarviisi testides (Mann-Whitney U-test) ilmnis tugev erinevus T/T ja C/T genotüübi vahel ( $p=0,01$ ). Kurna suuruse ja genotüübi vahel seos puudus (Kruskal-Wallis ANOVA;  $H=2$ ;  $p=0,7$ ;  $N=99$ ).

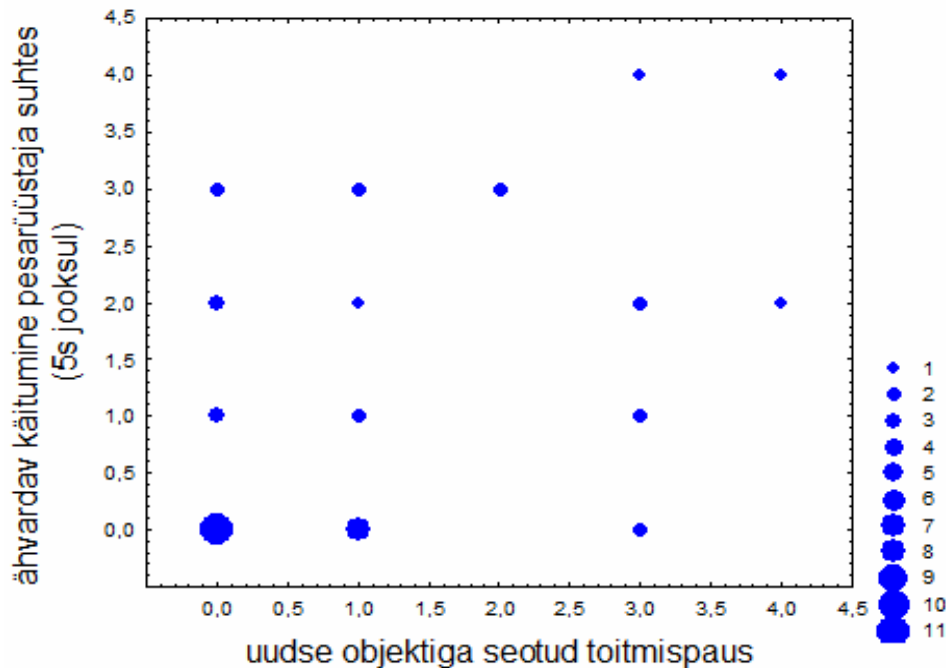


Joonis 3. Genotüübi ja munemise alguse (standardiseeritud 1. aprilli suhtes) vaheline seos emalindudel. Joonis on illustratiivne, keskväärtused on esitatud koos standardveaga, numbrid näitavad isendite arvu.



#### 4.4 Seosed erinevate käitumistunnuste vahel

Lisaks võrreldi seoseid ka erinevate käitumistunnuste vahel. Emalindudel korreleerus ähvardav käitumine pesarüüstaja suhtes (reageeringute arv 5 sekundi jooksul rähnitopisele) positiivselt uudse objektiga seotud toitmispausiga: Spearman;  $R=0,33$ ;  $p=0,03$ ;  $N=43$  (joonis 4), kuid üldise toitmispausiga mitte: Spearman;  $R=0,1$ ;  $p=0,48$ ;  $N=47$ .

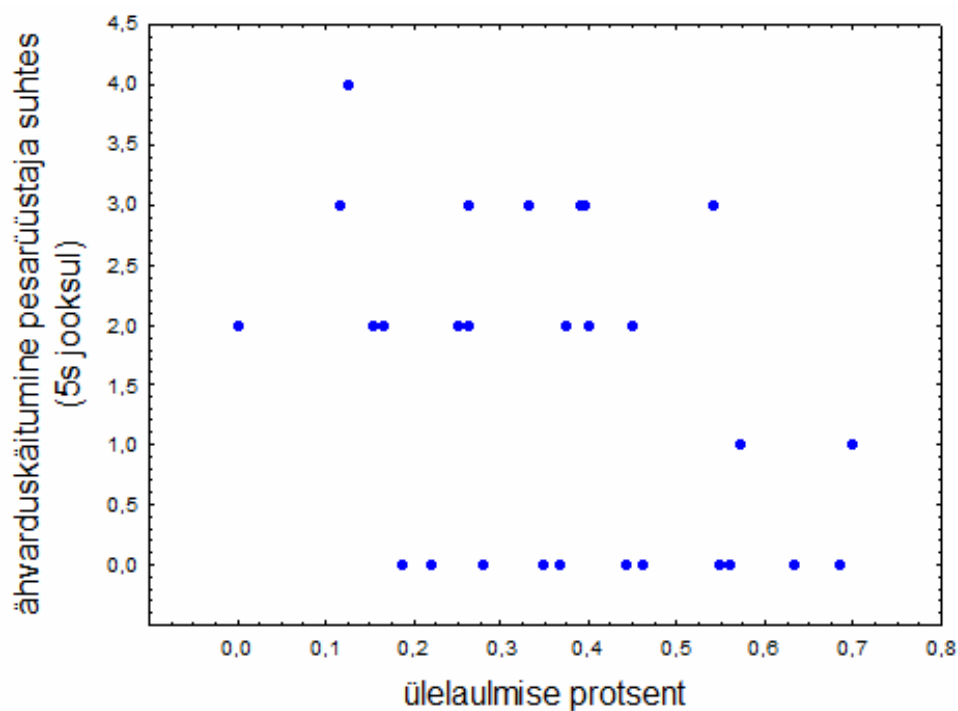


Joonis 4. Uudse objektiga seotud toitmispausi ja ähvarduskäitumise korrelatsioon rasvatihase emalindudel, punkti suurus näitab isendite arvu .

Isalindudel ei korreleerunud lauluvastus (ülelaulmise osakaal) uudse objektiga seotud toitmispausiga (Spearman;  $R=-0,5$ ;  $p=0,11$ ;  $N=15$ ) ega ka üldise toitmispausiga (Spearman;  $R=0,43$ ;  $p=0,14$ ;  $N=17$ ).

## 4.5 Käitumistunnuste seosed sugude vahel

Lisaks erinevate käitumistunnuste vaheliste seoste analüüsile vaadeldi ka partnerite vahelist käitumistunnuste korrelatsiooni ehk kuidas omavahel seostuvad isase lauluvastus ning emase ähvardav käitumine pesarüüstaja suhtes. Mõlemad tunnused on mitteparameetrilised ja seega hinnati neid Spearmani korrelatsiooni teel:  $R=-0,33$ ;  $p=0,044$ ;  $N=28$ , kus ilmnes negatiivne korrelatsioon (joonis 5).



Joonis 5. Partnerite vaheliste käitumistunnuste korreleerumine (ähvarduskäitumine pesarüüstaja suhtes emasel ja ülelaulmise protsent isasel).

## 5. Arutelu

### 5.1 DRD4 genotüüpide sagedused populatsioonis

Varasemalt on DRD4 genotüüpide esinemissagedusi looduslikes tihasepopulatsioonides uurinud Korsten et al. (2010). Nende poolt uuritavates neljas populatsioonis (üks Belgias, üks Suurbritannias, kaks Hollandis) olid SNP830 genotüüpide esinemissagedused väga sarnased (lisa 2A), kuigi oleks võinud eeldada suuremaid erinevusi populatsioonides, mis paiknevad ajas ja ruumis nii erinevalt.

Korsten et al. (2010) töös saadud tulemused on väga sarnased meie poolt leitud genotüübisagedustele Eesti rasvatihasepopulatsioonis (lisa 2B). Proportsionaalselt esines nende poolt uuritavates populatsioonides C/C ja C/T genotüüpe enam-vähem võrdselt (kumbagi 30-40% populatsioonist) ning T/T genotüüpi oli kõigis populatsioonides vähe (umbes 10%) (Korsten et al., 2010). Seega toimib tõenäoliselt valik erinevates rasvatihase geograafilistes populatsioonides T/T genotüübi vastu. See võib olla põhjustatud näiteks sarnastest loodusliku ja sugulise valiku mehhanismidest. Alternatiivseks seletuseks võib olla ka see, et DRD4 genotüüpide sagedused ei pruugi erineda populatsioonide vahelise geenisiirde tõttu ja kuna tegemist on avatud populatsioonidega, võib esineda migratsioone teistest populatsioonidest.

### 5.2 DRD4 genotüübi mõju käitumistunnuste avaldumisele

Hüpotees, mis eeldas erinevate DRD4 genotüüpide esinemist ja erinevat seost käitumisega Eesti tihasepopulatsioonis, leidis kinnitust: T/T ja C/C homosügootid reageerisid uudsele objektile erinevalt. T/T ja C/T genotüübiga rasvatihase isalinnud alustasid poegade toitmist kiiremini kui C/C genotüübiga liigikaaslased ja kuna T/T ja C/C genotüüpidega isalindude käitumises erinevusi ei ilmnenud, võib arvata, et T alleelil on käitumisele domineeriv mõju.

Meie poolt läbiviidud katse tulemusi ei saa otseselt võrrelda varasemate DRD4 ja käitumise vaheliste seoste uuringutega. Esiteks, Belgia, Hollandi ja Suurbritannia tihasepopulatsioonides mõõdeti lindude käitumise aktiivust laboritingimustes. Linde manipuleeriti neile tuttavas keskkonnas, mispuhul puudus näiteks kinnipüüdmisest ja laborisse viimisest tulenev stress, mis võis ilmneda Korsten et al (2010) poolt tehtud töös. Meie katse viidi läbi looduslikus populatsioonis ja sigimisajal (suur keskkonna mõju), mistõttu uudse objekti mõju toitmispausi tekkimisele vanalindude toitmiskäitumises saab pigem seostada neofobiaga kui uudse objekti uurimisega. Kui eeldada, et T/T ja C/T genotüübiga isendid on julgemad kui C/C genotüübiga

isendid, siis võib käitumist uudse objekti suhtes pigem tõlgendada isendi kohanemiskiirusena uudses situatsioonis. Seega tekib küsimus, kas käesolevas töös vaadeldav tunnus sobiks üldse uurivat käitumist kirjeldama.

Sarnastes varasemates katsetes (lähenemine uudsele objektile) on vastavat käitumistunnust nimetatud uurivaks käitumiseks (*exploratory behaviour*). Uurivat käitumist käsitletakse enamasti aktiivsuseks või tundmatus keskkonnas, aga seostatakse ka sageli kartmatusega (Groothuis ja Carere, 2005) ning näiteks individuaalsed erinevused katse ajal võivad näidata hirmust ülesaamise kiirust. On näidatud, et rasvatihasel korreleerub uuriv käitumine agressiivsusega (Verbeek et al., 1996), toitumiskäitumisega (Marchetti ja Drent, 2000), füsioloogilise stressireaktsiooniga (Carere et al., 2001) ja riskikäitumisega (van Oers et al., 2004), mistõttu käsitletakse uurivat käitumist enamasti käitumissündroomina\*, mida sageli vaadeldakse kas agressiivsuse-kartlikkuse teljel, või ka neofobia-neofiilia teljel. Linnud, kes kiiresti uut keskkonda uurivad, uurivad kiiresti ka uusi objekte puuris, kujundavad kiiresti rutiinse käitumise ja on lindudevahelistes kokkupõrgetes agressiivsemad (Verbeek et al., 1996). Linnud, kes uues keskkonnas vähem aktiivselt tegutsevad, on umbusklikumad võõra objekti osas ning vähemagressiivsed kokkupõrgetes, kuid samas on need linnud võimelised oma toitumiskäitumist muutlikus keskkonnas kiiremini kohandama (Verbeek et al., 1996).

Seega sobiks minu poolt vaadeldav käitumistunne pigem kirjeldama neofobiat kui uurivat käitumist. Kuigivõrd sobib tunnus uuriva käitumise käitumissündroomi konteksti, sest seda võib samuti hinnata aktiivsuseks uudses keskkonnas ehk kui kiiresti alustati toitmisega pärast uudse objekti märkamist. Otsest agressiivsust selles töös uudse objekti suhtes ei täheldatud.

Teiseks, erinevalt varasematest töödest (Dingemanse et al., 2002; Korsten et al., 2010) selgus meie katses, et uudse objekti mõju käitumisele sõltub sugupoolest – oluline seos genotüübi ja käitumise vahel avaldus ainult isalindudel. Geeni soospetsiifiline mõju võib olla põhjustatud ema- ja isalinnu hormonaalsete mehhanismide erinevustest, isalindude käitumist mõjutab sageli tugevalt testosterooni tase organismis (van Duyse et al., 2002). Vanalindude tegutsemine uudse objekti katses ei pruugi väljendada ühesugust käitumist, näiteks võib ühel juhul võib olla tegemist neofobiaga, teisel juhul aga uuriva käitumisega. Kuna emalinnu käitumist mõjutas pesas olevate poegade arv (kuid isasel mitte), siis võiks oletada, et emalinnul on suurem motivatsioon toitmisrutiini kiiremini taastada ja nad pigem ei pööra uudsele objektile nii palju tähelepanu kui seda teevad isased. Siiski ei saa kindlalt väita, et sugudevaheline erinevus on statistiliselt oluline, kuna tingituna TT genotüübi väikesest arvust polnud võimalik samasse mudelisse mõlemaid sugusid kaasata.

DRD4 geen võib käitumist mõjutada läbi interaktsiooni teiste geenidega. Arvatakse, et geenid, mis on seotud uuriva ja vaatleva käitumisega, on pikaajalise tasakaalustava valiku all, kuid mõnikord ka keskkonna muutuste tõttu juhusliku suunava valiku all (Korsten et al., 2010). Flisikowski et al (2009) näitasid, et DRD4 geeni polümorfism ning naabruses paiknev geen DEAF1 (mis on seotud serotoniini süsteemiga) on kanadel omavahel aheldatuse tasakaalutuses (*linkage disequilibrium*)\*\*. Antud mehhanism võib kujundada nii DRD4 geeni avaldumist kui teiste geenide avaldumist ka rasvatihasel, samuti ei saa ka siin välistada soospetsiifilisi mõjutusi. Samas, hilisemas töös (Mueller et al., 2013) DEAF1 geeni mõju rasvatihase DRD4 geeni avaldumisele ei täheldanud.

Varasemalt on leitud, et dominantne geneetiline mõju avaldub T/T ja C/T genotüübi samaväärsuses ehk T alleelil on nii tugev mõju käitumisele, et käitumist hinnates saab need kaks genotüüpi võrdseks lugeda (Korsten et al., 2010). Aditiivne geneetiline mõju avaldub juhul, kui T/T genotüüp on uurivam kui C/T (Korsten et al., 2010). Pole veel selge, kas DRD4 geeni naaberlookused kätkevad endas mõju uurivale käitumisele, kuid uuringud näitavad, et põhjuslikud variandid, mis uuriva käitumise varieeruvust mõjutavad, paiknevad DRD4 regioonis ümber 2., 3. ja 4. eksoni, kaasa arvatud külgnevad intronid ning lähiregioonid (Mueller et al., 2013) (lisa 3). Hinnates genotüüpide ja käitumise seoseid Eesti tihasepopulatsioonis võib oletada, et aditiivne geneetiline mõju pigem puudub ning isalindude puhul esineb T alleeli tugev mõju nii T/T kui C/T genotüüpide käitumisele.

Käitumistüüpide adaptiivset kujunemist ja avaldumist võivad mõjutada ka aastaajad ning erinev kliima, samuti sotsiaalse struktuuri muutused, mis kujundavad demograafilisi protsesse. Uuringud rasvatihastel on näidanud, et fenotüübiline korrelatsioon uuriva käitumise ja riskikäitumise vahel sõltub kaaslase käitumisest ja kohalolust (van Oers et al., 2005). Sellises katses aeglased uurijad (nii isa- kui emalind) muutusid julgemaks kaaslase läheduses, samal ajal kui kiired uurijad käitusid soost sõltuvalt (emased muutusid aremaks) (van Oers et al., 2004). Samuti on rasvatihase toitumiskäitumise osas näidatud, et sõltuvalt toiduressursi olemasolust erineb aastati lindude käitumine. Ema-ja isalinnud võib jagada käitumise alusel tegutsejateks ja jälgijateks (Dingemans ja de Goede, 2004) ning heal toiduaastal on edukamad nn tegutsejad isased ja jälgijad emased, halval toiduaastal on trend vastupidine (Dingemans ja de Goede, 2004). Nii võivad soost tulenevad erinevused uudse objektiga seotud käitumises olla põhjustatud lisaks geneetilistele teguritele ka välistest keskkonnateguritest ja paari sotsiaalsest käitumisest ning seeläbi kujundada vanalindude tegutsemist.

Lisaks uudse objekti mõjule võrreldi ka DRD4 geeni mõju emase ähvarduskäitumisele ja isase lauluvastusele. Emalinnul genotüübiga antud käitumine ei seostunud, võib oletada, et DRD4

geen ei seostu rasvatihasel kartlikkusega ning ähvarduskäitumist kujundavad muud geenid. Samas, sinitihasel on leitud DRD4 geeni mõju ärevuskäitumisele (Kluen et al., 2012) ja seega DRD4 geeni mõju täiesti välistada ei saa. Isalinnul samuti lauluvastus ja DRD4 genotüüp ei seostunud (ehkki eeldati), põhjus võib olla küllaltki väikeses valimis või selles, et DRD4 genotüüp ei pruugi rasvatihasel agressiivse käitumisega seostuda.

### 5.3 DRD4 genotüübi mõjud sigimisenäitajatele

Emalindudel ilmnenud oluline seos genotüübi ja munemise algusaja vahel näitab, et T/T genotüüp alustab munemisega kõige hiljem. Seega võiks oletada, et hilisem alustamine on arvatavasti kohasust vähendav tegur. Näiteks hiliste pesitsejate sigimisedukus väheneb, kuna pojad kooruvad hiljem ja satuvad kiskjatele sagedamini saagiks, samuti võib sesooni edenedes väheneda kvaliteetse toidu kättesaadavus ja seega võib see olla põhjus, miks T/T genotüüpi populatsioonis vähem esineb ja selle vastu valik toimub. Seos on uudne ja teadaolevalt pole munemisaja alguse sõltuvust genotüübist varasemalt näidatud. Samas on leitud seoseid vanemhoole ja dopamiini retseptorite D2 ja D3 vahel (Sealfon ja Olanow, 2000) ning on võimalik, et ka DRD4 geen mõjutab sarnaselt käitumist ning sigimisedukust.

Kui eeldada, et valikusurve T/T genotüübi vastu toimub peale poegade lennuvõimestumist, võiks oletada, et C/C ja T/T genotüüpide sagedused ei erine pesapoegade staadiumis. Selle oletuse kinnitamiseks tuleks tulevikus teha geenianalüüse poegadel (hinnata T/T genotüübi esinemissagedust).

Kurna suuruse ja genotüübi vahel seos puudus. Kurna suurus on otseselt seotud emalinnu fenotüübilise kvaliteediga (Slagsvold ja Lifjeld, 1990) ja ei pruugi seetõttu isiksuseomadustest nii palju sõltuda kui näiteks munemisaeg.

### 5.4 Käitumistunnuste korreleerumine

Erinevate käitumistunnuste seoste hindamisel ilmnes positiivne korrelatsioon emalinnul uudse objektiga seotud toitmispausi ning ähvardava käitumisega pesarüüstaja osas. Kui eeldada, et uudse objekti suhtes ettevaatlikumad isendid on kartlikumad ka kisklusohu korral (Ward et al., 2004), siis võiks arvata, et tugevam reaktsioon pesarüüstajale on seotud kartlikkusega. Krams et al. (käsikiri) näitasid rasvatihasel, et käitumine uudse objekti suhtes ja reaktsioon kiskjale on omavahel seotud: julgemad linnud on ka *mobbing*-käitumises (ühine rünnak röövlinnu vastu, kellest üksinda jõud üle ei käi) aktiivsemad ja jõulisemad kui arglikud linnud. Ei saa välistada, et ärevuskäitumine kiskja jälitamisel ning ähvarduskäitumine rahniga hirmutamisel näitavad erinevaid hirmu aspekte. Nt

ärevuskäitumises arglik lind võib olla julge grupikäitumises (paralleel inimesega ehk käitumine kambas ja üksi olles).

Isalindude puhul on oletatud, et lauluvastus korreleerub agressiivsusega sotsiaalses kontekstis (Lambrechts ja Dhondt, 1986). Seega võiks arvata, et uudse objektiga seotud toitmispaus isalindudel korreleerub lauluvastusega, kuna kiiremini toitmiserutiini taastavad isenditel on näidatud agressiivsemat käitumist (Verbeek et al., 1996). Otsest korrelatsiooni nende kahe tunnuse aga ei leitud, esines küll sellisuunaline trend, kuid see ei tulnud statistiliselt oluliseks. Üheks mõjuteguriks võib antud katses olla isalindude küllatki väike valim lauluvastuse osas ning oleks vaja edasisi täiendavaid uuringuid.

## 5.5 Käitumistunnuste seosed sugude vahel

Käesolevas töös seostati sugupoolte vahel kahte erinevat käitumistunnust - emalinnu ähvarduskäitumist pesarüüstaja suhtes ja isalinnu ülelaulmise protsenti. Mida rohkem isane oma arvatavat konkurenti üle laulis, seda väiksem oli emase reaktsioon pesarüüstajale – kahe tunnuse vahel on negatiivne korrelatsioon. Selle seose mõistmiseks on järgnevalt mõlemad käitumistunnused lahti seletatud.

Eestis on suur-kirjurähn üks peamisi ohte suluspesitsejate lindude munadele ja poegadele. Rasvatihasel on vastuseks pesarüüstaja rünnakule tekkinud omalaadne käitumine. Osa hauduvaid emalinde toovad pesarüüstaja rünnaku ajal kuuldavale susisevaid häälightsusi: enamasti terav sisisev häälightsus, millega kaasneb tiibadega vehkimine. Susisevate häälightsuste päritolu rasvatihastel ei ole veel selge, on arvatud (Perrins, 1979), et käitumine annab haudvale emasele hea võimaluse kiskja eest põgenemiseks, kuna susin võib kiskjat üllatada ning ta võib pesaavast eemale liikuda. Uuringud on näidanud, et pesa kaitstakse seda tugevamini, mida suurem on vanemlik investeering pesakonda (näiteks: Lima, 2009). Käesolevas töös seost ei leitud ( $p=0,33$ ;  $N=103$ ) ja seega võib käitumine pigem olla seotud rohkem emasele endale põgenemisvõimaluse loomisega kui poegade päästmiseks.

Isalinnu lauluvastust seostatakse agressiivse käitumise ja võitlus- või võistlusvalmidusega (Dabelsteen et al., 2002). Mida kõrgem on isaste testosterooni tase, seda agressiivsemalt ja rohkem ettemängitavale lindile vastatakse (van Duyse et al., 2002). Vastase ülelaulmine rasvatihasel võib olla üks põhilisi strateegiaid enda kvaliteedi näitamiseks ja peamiseks konkurentide peletamisviisiks (Langemann et al., 2004).

Emalindude madalat reaktsiooni paarüüstaja suhtes võib mõista mõlemat pidi: julgemad linnud võivad olla pigem vaikselt ning äraootaval seisukohal ning arglikumad reageerivad kiirelt ning agressiivselt. Võib pakkuda aga ka vastupidise võimaluse, kus arglikumad isendid ei reageeri

ning julged asuvad „ründama”. Esimese oletuse poolt räägib varasemalt saadud korrelatsioon ehk mida kauem emalind pärast uudse objekti märkamist viivitas, seda vähem ta reageeris potentsiaalsele pesarüüstajale. Seega linnud, kes kiiremini toitmisrutiini taastasid, reageerisid rähnile vähem ning võiksid olla (arvestades korrelatsiooni lauluvastusega) pigem julgemad ja dominantsemad. Kuna seost pesakonna suurusega ei leitud, võib oletada, et arglikumad linnud püüavad kiiremini põgeneda ja reageerivad sissetungijale aktiivsemalt. Nii võib oletada, et kvaliteetsemad isalinnud laulsid rohkem üle ning julgemad emalinnud olid pigem vaikselt ja ei reageerinud pesarüüstajale.

Kokkuvõtvalt, rasvatihasel on pesitsuspaaride moodustumine valikuline: paarid moodustuvad eelistatult kas kahe sarnase või kahe vastandliku iseloomuga partnerite vahel. Seose edasiseks kirjeldamiseks oleks vaja täiendavaid uuringuid korreleeruvate käitumistunnuste mõistmiseks.

\* käitumissündroom on defineeritud kui komplekt korreleerunud käitumistunnuseid, mis avalduvad sõltuvalt kontekstist ja situatsioonist (Sih et al., 2004).

\*\* ühe lookuse üks alleel esineb sagedamini koos mingi teise lookuse alleeliga kui seda juhusliku kombineerumise puhul eeldada saaks (Carlson et al., 2004).



## 6. Kokkuvõte

Magistritöö tulemused näitasid, et DRD4 geen mõjutab olulisel määral metsavärvulise – rasvatihase- käitumist ning on seega oluliseks teguriks looduslike populatsioonide käitumise hindamisel.

Tulemused kinnitavad varasemates töödes leitud DRD4 genotüüpide esinemissagedusi rasvatihasel ning genotüübid omasid ootuspärast mõju käitumisele (seostuvad reaktsiooniga uudsele objektile). Erinevus varasemate töödega seisneb katse ülesehituses ja –toimumisajajas. Katse toimus lindudele tuttavas keskkonnas, mispuhul vähenes oluliselt näiteks kinnipüüdmisest ja laborisse viimisest tulenev stress, mis võis ilmned Korsten et al (2010) poolt tehtud töös. Kuna katse toimus sigimisajal, saab tulemusi hinnata pigem kohanemiskiirusena uudes keskkonnas kui uuriva käitumisena. Lisaks leidsime, et DRD4 geeni mõju käitumisele on pigem soospetsiifiline ning antud töö põhjal ei saa väita, et geenil on ühesugune mõju vanalindude käitumisele.

Teiseks, avaldus mõju sigimisajale, mis on uudne tulemus ja pole teadaolevalt varasemalt näidatud. Kolmandaks näitasime, et pesitsuspaarid võivad moodustuda sarnaste või vastandlike iseloomudega sugupoolte vahel. Nimetatud seosed vajaksid kindlasti täiendavaid uuringuid, kuna ei ole üheselt selge, mida näitab emase reaktsioon pesarüüstajale ning isase ülelaulmise protsent.

Käitumisgeneetika uuringud rasvatihasel võimaldavad teha oletusi sarnaste geenide mõjude osas teistel linnuliikidel ja loomarühmadel, kaasa arvatud inimesel. Käesolevas töös leitud seosed on olulised looduskaitse efektiivsemaks muutmisel, kus sageli on vaja arvestada ökoloogiliste- ning valikut põhjustavate teguritega. Näiteks munemise algusaja seos DRD4 genotüübiga võimaldab mõista käitumise seoseid sigimisega ja erinevate genotüüpidega isendite püsimist populatsioonis.

## **7. Summary**

### **Polymorphism in dopamine D4 receptor gene associates with personality variation in Great Tits (*Parus major*)**

Results of Master's Thesis show that dopamine receptor D4 gene (DRD4) is associated with individual variation of personality in Great Tits at presence of a novel object. Thus are the results important in evaluating wild populations' behaviour.

Data on free-living Great Tits confirms earlier results from Fidler et al (2007) and Korsten et al (2010) studies. Genotype frequencies and gene-behaviour association in the novel object experiment are similar in both studies. On the other hand, there are slight differences in experiment structure and in period of experiment. Our birds were manipulated in a familiar environment (temperate forest), there was no stress caused by catching or taking birds to a laboratory. As this experiment was made during breeding season, results can be evaluated more as a speed of adaptation to novel object than exploratory behaviour.

Taken together, our findings show that impact of DRD4 gene on behaviour depended on the sex of individuals and according to the data it can not be said that this polymorphism influences males and females identically. Secondly, we discovered an effect of DRD4 gene on breeding success in females. This result is new and has not been shown yet. Finally, we showed that the forming of nesting pairs depends on behaviour and it can take place between birds showing similar behaviour or between birds showing opposite behaviour. This result needs further studies, as it is not completely clear what those correlating behavioural traits (female reaction to nest intruder and male overlapping percent during singing) show.

Studies in behavioural genetics on birds allow to predict similar effects on other animals, including humans. Results from present study help to be more successful in protecting the nature, where it is important to know selection- and ecological factors. For example, interaction between laying date and genotype allows to understand variation in behaviour and genetic structure of a population.

## **8. Tänuavaldused**

Kõige suurem tänu kuulub minu juhendajale, Vallo Tilgarile, kelle abi on kogu töö valmimise ajal olnud hindamatu.

Veel tahan tänada kogu TÜ lindude käitumisökoloogia töörühma, kes olid toeks välitööde ajal ning andsid kogu magistritöö valmimise ajal konstruktiivset kriitikat. Lisaks tänan südamest Kaarin Koosat, kes suures osas viis läbi isase lauluvastuse ja emalinnu ähvarduskäitumise katseid ja Pauli Saagi, kes aitas nõu ja jõuga rasvatihaste genotüüpide analüüsil.

Antud tööd rahastati Eesti Teadusfondi grandist ETF8376 ja Eesti Teadus- ja Haridusministeeriumi poolt sihtfinantseeritavast projektist nr 01800004s09.

## 9. Kasutatud allikad

- Abe H, Ito Si, Inoue-Murayama M. 2011. Polymorphisms in the extracellular region of dopamine receptor D4 within and among avian orders. *Journal of Molecular Evolution* 72:253-264.
- Abe H, Takeuchi HA, Yamada S, Nakamura A, Nagao K, Nirasawa K, Ito Si, Inoue-Murayama M. 2013. Characterization of the intronic VNTR polymorphisms found in a paralog of chicken serotonin transporter gene. *Animal Science Journal* 84:281-288.
- Bailey JN, Breidenthal SE, Jorgensen MJ, McCracken JT, Fairbanks LA. 2007. The association of DRD4 and novelty seeking is found in a nonhuman primate model. *Psychiatric genetics* 17:23-27.
- Benjamin J, Ebstein R, Belmaker R. 1997. Personality genetics. *Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences* 34:270-280.
- Bildstein KL, Frederick PC, Spalding MG. 1991. Feeding patterns and aggressive behavior in juvenile and adult American Flamingos. *Condor* 93:916-925.
- Blanckenhorn WU. 2002. The consistency of quantitative genetic estimates in field and laboratory in the yellow dung fly. *Genetica* 114:171-182.
- Carere C, Welink D, Drent PJ, Koolhaas JM, Groothuis TG. 2001. Effect of social defeat in a territorial bird (*Parus major*) selected for different coping styles. *Physiology & behavior* 73:427-433.
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. 2004. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *The American Journal of Human Genetics* 74:106-120.
- Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, Müller U, Aguet M, Babinet C, Shih JC. 1995. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268:1763.
- Dabelsteen T, McGregor PK, Holland J, Tobias JA, Pedersen SB. 1997. The signal function of overlapping singing in male robins. *Animal Behaviour* 53:249-256.
- Dingemanse NJ, Both C, Drent PJ, van Oers K, Van Noordwijk AJ. 2002. Repeatability and heritability of exploratory behaviour in Great Tits from the wild. *Animal Behaviour* 64:929-938.
- Dingemanse NJ, de Goede P. 2004. The relation between dominance and exploratory behavior is context-dependent in wild Great Tits. *Behavioral Ecology* 15:1023-1030.
- Dingemanse NJ, Réale D. 2005. Natural selection and animal personality. *Behaviour* 142:9-10.
- Drent PJ, van Oers K, Van Noordwijk AJ. 2003. Realized heritability of personalities in the Great Tit (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 270:45-51.

- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV. 2003. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human molecular genetics* 12:205-216.
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA. 1999. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *The Journal of Neuroscience* 19:9550-9556.
- van Duyse E, Pinxten R, Eens M. 2002. Effects of testosterone on song, aggression, and nestling feeding behavior in male Great Tits, *Parus major*. *Hormones and Behavior* 41:178-186.
- Ebstein RP, Benjamin J, Belmaker RH. 2000. Genetics of personality dimensions. *Current Opinion in Psychiatry* 13:617-622.
- Elts J, Kuresoo A, Leibak E, Leito A, Leivits A, Lilleleht V, Luigujõe L, Mägi E, Nellis R, Nellis R. 2009. Eesti lindude staatus, pesitsusaegne ja talvine arvukus 2003–2008. *Hirundo* 22:3-31.
- Fidler AE, van Oers K, Drent PJ, Kuhn S, Mueller JC, Kempenaers B. 2007. DRD4 gene polymorphisms are associated with personality variation in a passerine bird. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 274: 685-1691.
- Flisikowski K, Schwarzenbacher H, Wysocki M, Weigend S, Preisinger R, Kjaer JB, Fries R. 2009. Variation in neighbouring genes of the dopaminergic and serotonergic systems affects feather pecking behaviour of laying hens. *Animal genetics* 40:192-199.
- Gillingham MAF, Béchet A, Geraci J, Wattier R, Dubreuil C, Cézilly F. 2012. Genetic polymorphism in dopamine receptor D4 is associated with early body condition in a large population of Greater Flamingos, *Phoenicopterus roseus*. *Molecular ecology*.
- Grady DL, Thanos PK, Corrada MM, Barnett Jr JC, Ciobanu V, Shustarovich D, Napoli A, Moyzis AG, Grandy D, Rubinstein M, Wang GJ, Kawas CH, Chen C, Dong Q, Wang E, Volkow ND, Moyzis RK. 2013. DRD4 genotype predicts longevity in mouse and human. *Journal of Neuroscience* 33:286-291.
- Groothuis TG, Carere C. 2005. Avian personalities: characterization and epigenesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29:137-150.
- Heiming RS, Mönning A, Jansen F, Kloke V, Lesch K-P, Sachser N. 2013. To attack, or not to attack? The role of serotonin transporter genotype in the display of maternal aggression. *Behavioural Brain Research* 242:135-141
- Hejjas K, Kubinyi E, Ronai Z, Szekely A, Vas J, Miklósi Á, Sasvari-Szekely M, Kereszturi E. 2009. Molecular and behavioral analysis of the intron 2 repeat polymorphism in the canine dopamine D4 receptor gene. *Genes, Brain and Behavior* 8:330-336.
- Hong KW, Inoue-Murayama M, Nakamura A, Nagao K. 2008. Characterization of two microsatellites in chicken monoamine oxidase A. *Animal Science Journal* 79:641-643.

- Hughes RN. 1997. Intrinsic exploration in animals: motives and measurement. *Behavioural Processes* 41:213-226.
- Kluen E, Kuhn S, Kempnaers B, Brommer JE. 2012. A simple cage test captures intrinsic differences in aspects of personality across individuals in a passerine bird. *Animal Behaviour* 84:279-287.
- Kluger A, Siegfried Z, Ebstein R. 2002. A meta-analysis of the association between DRD4 polymorphism and novelty seeking. *Molecular psychiatry* 7:712-717
- Korsten P, Mueller JC, Hermannstadter C, Bouwman KM, Dingemanse NJ, Drent PJ, Liedvogel M, Matthysen E, van Oers K, van Overveld T, Patrick SC, Quinn JL, Sheldon BC, Tinbergen JM, Kempnaers B. 2010. Association between DRD4 gene polymorphism and personality variation in Great Tits: a test across four wild populations. *Molecular ecology* 19:832-843.
- Krawczak M, Trefilov A, Berard J, Bercovitch F, Kessler M, Sauermann U, Croucher P, Nürnberg P, Widdig A, Schmidtke J. 2005. Male reproductive timing in rhesus macaques is influenced by the 5HTTLPR promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *Biology of reproduction* 72:1109-1113.
- Lambrechts M, Dhondt AA. 1986. Male quality, reproduction, and survival in the Great Tit (*Parus major*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 19:57-63.
- Langemann U, Tavares J, Peake TM, McGregor PK. 2000. Response of Great Tits to escalating patterns of playback. *Behaviour* 137:451-471.
- Lima SL. 2009. Predators and the breeding bird: behavioral and reproductive flexibility under the risk of predation. *Biological Reviews* 84:485-513.
- Marchetti C, Drent PJ. 2000. Individual differences in the use of social information in foraging by captive Great Tits. *Animal Behaviour* 60:131-140.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 78:189-225.
- Momozawa Y, Takeuchi Y, Kusunose R, Kikusui T, Mori Y. 2005. Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mammalian genome* 16:538-544.
- Mueller JC, Korsten P, Hermannstaedter C, Feulner T, Dingemanse NJ, Matthysen E, Oers K, Overveld T, Patrick SC, Quinn JL. 2013. Haplotype structure, adaptive history and associations with exploratory behaviour of the DRD4 gene region in four Great Tit (*Parus major*) populations. *Molecular ecology* 19:832-843
- Munafò MR, Yalcin B, Willis-Owen SA, Flint J. 2008. Association of the dopamine D4 receptor (DRD4) gene and approach-related personality traits: meta-analysis and new data. *Biological Psychiatry* 63:197-206.

- Netter P. 2006. Dopamine challenge tests as an indicator of psychological traits. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 21:91-99.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. 2004. Dopamine receptor signaling. *Journal of receptors and signal transduction* 24:165-205.
- van Oers K, de Jong G, Drent PJ, van Noordwijk AJ. 2004. A genetic analysis of avian personality traits: correlated, response to artificial selection. *Behavior genetics* 34:611-619.
- van Oers K, de Jong G, van Noordwijk AJ, Kempenaers B, Drent PJ. 2005. Contribution of genetics to the study of animal personalities: a review of case studies. *Behaviour* 142:9-10.
- Perrins C. 1965. Population fluctuations and clutch-size in the Great Tit, *Parus major* L. *The Journal of Animal Ecology*:601-647.
- Perrins CM. 1979. *British tits*: Collins, London.
- Sealfon SC, Olanow CW. 2000. Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends in neurosciences* 23:S34-S40.
- Sih A, Bell A, Johnson JC. 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution* 19:372-378.
- Slagsvold T, Lifjeld JT. 1990. Influence of male and female quality on clutch size in tits (*Parus* spp.). *Ecology*:1258-1266.
- Sugiyama A, Inoue-Murayama M, Miwa M, Ohashi R, Kayang BB, Mizutani M, Nirasawa K, Odai M, Minezawa M, Watanabe S, Ito S. 2004. Polymorphism of dopamine receptor D4 exon I corresponding region in chicken. *Zoological Science* 21:941-946.
- Zion IB, Tessler R, Cohen L, Lerer E, Raz Y, Bachner-Melman R, Gritsenko I, Nemanov L, Zohar A, Belmaker R. 2006. Polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene (DRD4) contribute to individual differences in human sexual behavior: desire, arousal and sexual function. *Molecular psychiatry* 11:782-786.
- Tung J, Charpentier MJ, Mukherjee S, Altmann J, Alberts SC. 2012. Genetic effects on mating success and partner choice in a social mammal. *American Naturalist* 180:113.
- Verbeek ME, Boon A, Drent PJ. 1996. Exploration, aggressive behaviour and dominance in pair-wise confrontations of juvenile male Great Tits. *Behaviour* 133:11-12.
- Ward AJ, Thomas P, Hart PJ, Krause J. 2004. Correlates of boldness in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:561-568.
- Wright D, Nakamichi R, Krause J, Butlin RK. 2006. QTL analysis of behavioral and morphological differentiation between wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Behavior genetics* 36:271-284.

### **9.1 Internetiallikad:**

Viikmaa M, Klassikalise geneetika leksikon, <http://biomedicum.ut.ee/~martv/genolex.html>,  
9.05.13

### **9.2 Avaldamata allikad**

Krams IA, Freeberg TM, Mierauskas P, Rantala R, Krama T, Vrublevska J. (2010-2012 andmed),  
Communal nest-defence improves efficiency of anti-predator protection in Great Tits,  
especially for shy individuals.



## 10. Lisad

### Lisa 1. Uudse objekti katse ülesehitus.



Autori foto



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Killu Timm

(sünnikuupäev: 30.06.1989)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**DRD4 geeni polümorfism ja käitumistunnused rasvatihasel (*Parus major*),**

mille juhendaja on PhD Vallo Tilgar,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.13