

**INSTITUTE OF ECOLOGY OF NATURE RESEARCH CENTRE
VILNIUS UNIVERSITY**

Robertas Staponkus

**BIOLOGY AND PECULIARITIES OF THE POPULATION-GENETIC
STRUCTURE OF LITHUANIAN CEPHALASPIDOMORPHS
(CEPHALASPIDOMORPHI)**

Summary of the doctoral thesis

Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Science (03B)

Vilnius, 2015

This thesis was prepared during the period of 2010–2014 at the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

Scientific Supervisor – dr. **Vytautas Kesminas** (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

Scientific Consultant – dr. **Dalius Butkauskas** (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

The defence of the doctoral dissertation is held at joint Vilnius University and Nature Research Centre, Ecology and Environmental Research Council:

Chairman – doc. dr. Jurga Turčinavičienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, zoology – 03 B)

Members:

prof. Dr. Darius Daunys (Klaipėda University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B);

dr. Linas Ložys (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B);

dr. Gintaras Svecevičius (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03 B);

dr. Tomas Didrikas (AquaBiota Water Research (Sweden), subsidiary of Norwegian Institute for Water Research (NIVA), biomedical sciences, biology – 01 B).

Defence of the PhD thesis will be held in 2015 at 2 p.m. in the Conference Hall of the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

Address: Akademijos Str. 2, LT-08412, Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 2729257, fax. +370 5 2729352

Date of mailing the thesis: 23 September 2015

The thesis is available at the libraries of Institute of Ecology of Nature Research Centre, Vilnius University and on VU website: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

**GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS**

Robertas Staponkus

**LIETUVOS APSKRITAŽIOMENIŲ (CEPHALASPIDOMORPHI) BIOLOGIJA
IR POPULIACINĖS-GENETINĖS STRUKTŪROS YPATUMAI**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03B)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2010 - 2014 metais Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute.

Mokslinis vadovas – dr. **Vytautas Kesminas** (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra - 03B)

Mokslinis konsultantas – dr. **Dalius Butkauskas** (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra - 03B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro jungtinėje Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė – doc. dr. Jurga Turčinavičienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B).

Nariai:

prof. dr. Darius Daunys (Klaipėdos universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B);

dr. Linas Ložys (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B);

dr. Gintaras Svecevičius (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B);

dr. Tomas Didrikas (Norvegijos vandens tyrimų instituto AquaBiota mokslinių tyrimų padalinys, Švedija, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Disertacija bus ginama viešame Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties tarybos posėdyje 2015 m. spalio mėn. 23 d., 14 valandą Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto posėdžių salėje.

Adresas: Akademijos g. 2, LT-08412, Vilnius, Lietuva

Tel. +370 5 2729257, fax. +370 5 2729352

Disertacijos santrauka išsiuntinėta: 2015. 09. 23.

Disertaciją galima peržiūrėti Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto, Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

INTRODUCTION

Relevance of the study. Lampreys (Petromyzontiformes) belong to a group of jawless (Agnatha) animals. The oldest fossils of this group are known from the Devonian period of South Africa (360 MYA) (Janvier *et al.* 2004, Gess *et al.* 2006). Therefore, lampreys (Cephalaspidomorphi) together with cartilaginous fish are considered to be one of the oldest vertebrate groups. Such evolutionary success and longevity of the group are potentially ensured by its ecological plasticity.

Currently, 40 lamprey species are known worldwide. The greatest variety of lampreys is observed in Europe and North America. Despite the evolutionary success of this group, today many lamprey species are threatened or considered to be endangered. It is commonly accepted that over the past century anthropogenic activities was one of the major factors that affected the distribution, survival, reproduction and other fitness indicators of lampreys (Kirchhofer 1996). Prior to the present study, three species of lampreys representing the *Petromyzontidae* family were known in Lithuanian watersheds. The river lamprey (*Lampetra fluviatilis* L., 1758) and brook lamprey (*Lampetra planeri* Bloch, 1784) are considered common, while the sea lamprey (*Petromyzon marinus* L., 1758) is an occasional migrant. These three species of lampreys are of conservation concern in Europe. They are listed in Appendix III to the Berne Convention, Annexes II and V to the European Union (EU) Habitats Directive (European Council Decision 82/72/EEC 1998 EEC. Council Directive 92/43/EEC 1992). The directive obligates all the member states to designate Special Areas of Conservation (SACs) for the protection of Annex II species and ensure their favourable conservation status.

Typically, studies of ichthyocenoses in Lithuania are being carried out to investigate the distribution, abundance and conservation status of particular species or communities of bony fish (Osteichthyes). Cephalaspidomorphs as a group possess a distinctive life cycle. They spend the major part of life in the larval (ammocoete) stage buried in riverbeds. After metamorphosis, they remain in natal rivers for a few months or migrate to the sea where adults forage for a couple of years. Due to particular life cycle, studies of adults are rare, and ammocoete studies require a specific capture methodology (Kesminas *et al.* 2009, Lasne *et al.* 2010b). Because of the above-mentioned reasons, researches into lampreys in Lithuania are fragmentary and incomplete, species diversity has not been studied extensively, and knowledge of the status, distribution and abundance of lamprey populations in Lithuania is poor. Moreover, the existing historical data on commercial catches are often unsuitable for a thorough assessment of population changes.

All lamprey species found in Lithuania are on the Red List of Threatened Species of International Union for Conservation of Nature (IUCN) as the species of Least Concern in view of a large extent of occurrence and abundance throughout the range. However, in

recent years the status of *P. marinus* and *L. fluviatilis* in the Baltic Sea region was thoroughly evaluated against the IUCN evaluation criteria (HELCOM 2013). The sea lamprey population was found to be Vulnerable (VU) C2a (i), and the river lamprey was assessed to be Near Threatened (NT) A2bd in the Baltic Sea region.

The management of lampreys based on conservation of genetic diversity is complicated because of taxonomic confusion between parasitic *L. fluviatilis* and non-parasitic *L. planeri*. Both species are considered to be paired species (Zanandrea 1959) or stem-satellite species (Vladykov & Kott 1979), which can represent alternative life-history strategies. Parasitic *L. fluviatilis* migrate to the sea or other large water bodies where they feed mainly on bony fish (Osteichthyes) blood and body tissues, whereas non-parasitic *L. planeri* remain in natal rivers after metamorphosis and do not feed. Alternative life-history strategies are observed in seven, including *Lampetra* genus, out of ten lamprey genera found in Europe, North America and Australia, and stem-satellite species are known at least in five genera (Docker *et al.* 2009). Therefore, it can be expected that under certain environmental conditions some of the lamprey species can change their life-history strategy radically. In Lithuania and in the overall Baltic Sea region, only the river lamprey is considered to be a commercially important species (Thiel *et al.* 2009). In order to manage and exploit *L. fluviatilis* populations sustainably and without jeopardizing genetic diversity, it is necessary to obtain enough data on the population genetic structure. Currently, studies into population genetics of *Lampetra* spp. lampreys in the Baltic Sea region are incomplete (Espanhol *et al.* 2007, Blank *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2010). Moreover, population genetics of lampreys in Lithuania has not been studied so far.

Scientific innovation of the study:

1. During molecular identification of lampreys the Ukrainian lamprey *Eudontomyzon mariae* (Berg, 1931) was recorded in the territory of Lithuania for the first time.
2. Evaluate genetic diversity of lampreys in south-eastern Baltic region.
3. The factors that affect the distribution and abundance of the river lamprey and the brook lamprey in Lithuania were identified.
4. The growth rate and longitudinal migration distances of ammocoetes from hatching to metamorphosis were estimated.

Scientific and practical significance. The present thesis reviews the distribution and abundance of *L. fluviatilis* and *L. planeri* in Lithuanian rivers, as well as the factors that affect dispersion and abundance of the larval stage of lampreys. By applying a molecular approach to identification of lamprey species, representatives of the Ukrainian lamprey *Eudontomyzon mariae* (Berg, 1931) were discovered inhabiting several rivers in Lithuania for the first time (Staponkus *et al.* 2014). A phylogenetic analysis based on mtDNA markers revealed that *L. fluviatilis* and *L. planeri* belong to the same evolutionary lineage. Additionally, the findings suggest that the Baltic Sea *Lampetra* spp. populations might experience the gene flow between two life strategies, which is supported by a successful *in situ* experimental hybridisation between *L. fluviatilis* and *L. planeri* spawning in communal redds. These findings are essential to the understanding of the population genetic structure of *L. fluviatilis* and *L. planeri* and contribute to the current knowledge of the speciation mechanism. From a practical point of view, the findings can be used in lamprey conservation. The current lamprey conservation status is assessed, and recommendations for further lamprey research and monitoring in Lithuania are given.

The objective and tasks of the study. The primary objective of this work is to clarify the taxonomic status of lampreys occurring in Lithuania by using mtDNA markers, evaluate hybridization possibilities between different lamprey species, and examine their distribution, abundance and population status in Lithuanian inland waters. The following tasks were formulated to achieve the main objective:

1. To evaluate the lamprey ammocoete abundance and distribution in different watersheds in Lithuania.
2. To examine the factors affecting lamprey distribution and abundance.
3. To determine the species of lampreys from the samples collected in the south-eastern Baltic region using mtDNA NCR-I and *cyt b* markers.
4. To experimentally evaluate the possibilities of hybridization between *L. fluviatilis* and *L. planeri*.
5. To evaluate intraspecific genetic diversity parameters and genetic distances between *L. fluviatilis* and *L. planeri* in the south-eastern Baltic region, using mtDNA NCR-I sequencing data.
6. To compare genetic diversity of *Lampetra* spp. populations of the Baltic Sea basin derived from mtDNA NCR-I data with genetic parameters of lamprey populations from other geographic regions of Europe.
7. To review the origin and formation peculiarities of *Lampetra* spp. populations based on historical and natural processes during the formation of the Baltic Sea.

Statements to be defended:

1. Lithuanian riverine systems are inhabited by four lamprey species: river lamprey (*Lampetra fluviatilis*), brook lamprey (*Lampetra planeri*), sea lamprey (*Petromyzon marinus*) and Ukrainian lamprey (*Eudontomyzon mariae*).
2. Different riverine systems of Lithuania hold different abundances and densities of lampreys, which are observed due to difference in favourable conditions for lampreys.
3. Hybridization between the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) and brook lamprey (*Lampetra planeri*) in Lithuania watersheds is possible.
4. Genetic differentiation between the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) and the brook lamprey (*Lampetra planeri*) in the eastern Baltic region is low.

Scientific approval and publications. The results of the present study were summarized in three scientific publications. The results of the thesis were also presented at two conferences in Lithuania and UK.

Structure of the thesis. The thesis consists of the following chapters: Abbreviations, Introduction, Literature Review, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Recommendations, Reference List, Articles and Abstracts in conference reports on the subject of the Thesis, Acknowledgements, Appendix. Excluding the Appendix, the number of pages of the thesis is 132, it contains 20 tables and 37 figures. The thesis is written in the Lithuanian language.

Acknowledgements. I am grateful to all the people and all institutions that contributed to the realization of this thesis. My special thank you goes to scientific supervisor dr Vytautas Kesminas and consultant dr. habil. Dalius Butkauskas for supervision, assistance and advice. I express my sincere gratitude to the staff of the Laboratory of Ecology and Physiology and Molecular Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre for assistance, advice and encouragement. Warm thanks also go to Dr. Janis Birzaks and Kaspars Abersons, as well as to Dr. Piotr Debowski for their help in collecting samples.

LITERATURE REVIEW

In this chapter, the author reviews research subjects, i.e. river and brook lampreys, their life cycle, population genetics and problems of *Lampetra* spp. speciation, as well as scientific data on the Ukrainian lamprey newly discovered in Lithuania.

MATERIAL AND METHODS

Ammocoete sampling procedure. Investigations of changes in *L. fluviatilis* and *L. planeri* abundance, distribution and conservation status were carried out from September of 2007 till October of 2013. Ammocoetes were collected by shovelling a 1 m² netted area (Kesminas *et al.* 2009) or by a modified Surber benthic sampler proposed by Lasne *et al.* (2010b). All ammocoetes were anaesthetised by a 10–15 ml·l⁻¹ diethyl ether or 0.5 ml·l⁻¹ 2-diphenylethanol, and after measuring the total length (mm) they were released when recovered. Due to insufficient morphological differences, the identification of *L. fluviatilis* and *L. planeri* according to Gardiner (2003) was limited; therefore, all the examined ammocoetes were classified as either belonging to *Lampetra* spp. or *P. marinus*.

Longitudinal distribution of ammocoetes. The study sites were selected according to the following factors: confirmed reports of lamprey spawning in the rivers, the absence of migration barriers such as weirs or other man-made obstacles, and well-defined lamprey spawning grounds located straight downstream from the dams with no other spawning grounds in a 1.5–2 km section downstream. Field surveys of ammocoete spatial distribution were carried out in the Šventoji, Vieštovė, and Eketė Rivers located in north-western Lithuania (Fig. 1). All three rivers are situated in the catchments or sub-catchments of different rivers: the Šventoji River flows into the Baltic Sea and forms a separate basin, the Vieštovė River is located in the Minija River sub-catchment basin (Nemunas River catchment), and the Eketė River belongs to the Danė-Akmena River catchment basin. Ammocoetes were collected in the Vieštovė River in early May of 2007, in the Eketė River in late March of 2008, and in the Šventoji River in late March of 2010. To collect more data on ammocoete length frequency, we simultaneously sampled ammocoetes in 31 stations in nine adjacent rivers located in the same region: Alantas, Salantas, Žvelsa, and Minija rivers in the Minija River sub-catchment, and Babrūnė, Bonė, Danė, and Šaltupis rivers in the Danė-Akmena River catchment. Handheld GPS device Garmin GPSMAP 60CSx was used to record coordinates of all study sites, which later on were transported to georeferenced database (GDR10LT). Geographic presentations of the records of the ammocoete study sites were made using

ArcView® (ESRI, Redlands, California) software.

The age limits of ammocoetes were calculated from the length frequency analysis. A large number of samples are necessary for this analysis. Therefore, to increase the precision of the analysis, along with length records of 114 ammocoetes collected for the modelling of distribution in three major study rivers, the length records of 413 *Lampetra* spp. from nine previously listed rivers were incorporated into the frequency analysis. The K-means cluster analysis was used to partition ammocoete length observations into k clusters. Each length record was assigned to the cluster with the nearest mean representing the age group. Subsequently, normal distributions were retrieved for k clusters of each age group. Finally, length intervals for each age group were represented as ± 1.645 standard deviations (or 90%) of normal distributions.

When estimating the dispersion of ammocoete age groups downstream from the spawning grounds, linear and non-linear regression models were tested and the model with best goodness-of-fit was selected. The distance to the spawning site was chosen as an independent variable, while ammocoete total length as a dependent variable. According to the national classification system, the Eketė and Vieštovė rivers are classified as small-size rivers (type 1: catchment $<100 \text{ km}^3$), and the Šventoji – as a medium-size river (type 2: catchment $<100 \text{ km}^3$, slope $<0.7 \text{ m/km}$) (Minister of Environment of the Republic of Lithuania 2005), therefore, two models were created for different type rivers.

Before analysis, the data were tested for normality with the Shapiro-Wilk test and Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction. If needed, $\log_{10}(x)$, $\log_{10}(1/x)$, $\arcsin(x)$, and Box-Cox ($0 \leq \lambda \leq 0.2$) data transformations were applied. Standard statistical parametric and non-parametric methods were used, namely one-way ANOVA, multiple regression analysis, Pearson correlation analysis, Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney U test, and Wilcoxon signed-rank test. The multiple regression analysis and partial Spearman correlation were used to determine important environmental hydrological factors influencing ammocoete distribution and abundance in the rivers. To estimate the significance of variation differences between river catchments, the Kruskal-Wallis analysis and multiple comparisons (post hoc) tests (Tukey HSD) were used. To assess differences of ammocoete abundance in rivers of different channel slope, analysis of variance and post hoc test were used. The variance of ammocoete abundance in catchments was analyzed by the Mann-Whitney U test, and abundance of different study periods was compared by the Wilcoxon signed-rank test. The mean values, standard deviations ($\pm \text{SD}$), standard errors ($\pm \text{SE}$), and confidence intervals were used to represent the estimated parameters and their variability. The significance level for all tests was $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using Microsoft Excel, Statistica and R software.

Sample collection for molecular investigations. A total of 76 river lamprey specimens and 42 brook lamprey specimens, of which three individuals were later identified as *E. mariae* representatives, were used in genetic investigation. In the territory of Lithuania, samples were collected by electric fishing, dip nets or (in case of ammocoetes) by benthic samplers. The samples from the Gauja River (Republic of Latvia) were obtained from the Institute of Food Safety, Animal Health and Environment “BIOR”. The Vistula samples were received from Stanisław Sakowicz from the Inland Fisheries Institute in Olsztyn. Detailed information about the collected fish samples is presented in Table 1.

Table 1. Location and time of sampling and sample size of lampreys used for studies.

1 lentelė. Tyrimams panaudotų nęgių sugavimo vieta, laikas, individų skaičius.

Species	River	Catchment	Date / Coordinates / Source of data	Number of individuals
<i>L. fluviatilis</i>	Luoba	Bartuva	2011 04 28/56° 14' 33.25", 21° 43' 25.25"	7
	Danė-Akmena	Coastal rivers	2011 05 07/55° 53' 13.45", 21° 14' 7.27"	4
	Eketė	Coastal rivers	2011 05 07/55° 47' 31.51", 21° 10' 37.41"	10
	Šventoji	Šventoji	2011 05 08/56° 4' 47.31", 21° 8' 43.84" and 56° 3' 24.82", 21° 8' 12.96"	10
	Blendžiava	Nemunas	2011 05 08 and 2012 05 05/ 55° 58' 59.93", 21° 31' 40.43"	8
	Gauja	Gauja	2013 10 20/57° 09' 06.1" 24° 16' 40.4"	15
	Musė	Nemunas	2013 05 13/54° 56' 22.6", 24° 49' 24.27"	4
	Vysla	Vistula	2013 11 17/54°07'49.4"N 18°49'40.8"E	17
	Neva	Neva	GenBank: EU596026 - EU596049	24
	Reinas	Rhine	GenBank: EU596118 - EU596144	27
Garrone	Garrone	GenBank: Y18683	1	
<i>L. planeri</i>	Mišupė	Nemunas	2011 05 01/55° 57' 52.14", 21° 34' 44.44"	2
	Šventoji	Šventoji	2011 05 08/56° 4' 47.31", 21° 8' 43.84" and 56° 3' 24.82", 21° 8' 12.96"	10
	Lūšis	Venta	2011 05 17/56° 25' 28.34", 22° 2' 1.94"	1
	Luoba	Bartuva	2011 04 28/56° 14' 33.25", 21° 43' 25.25"	1
	Blendžiava	Nemunas	2012 05 05/55° 58' 59.93", 21° 31' 40.43"	1

	Musė	Nemunas	2013 05 13/54° 56' 22.6", 24° 49' 24.27"	9
	Viešetė	Venta	2011 05 17/56° 15' 0.88", 22° 16' 48.29"	8
	Merkys	Nemunas	2013 08 07/54° 7' 8.92", 24° 18' 13.29"	8*
	Mondego	Mondego	GenBank: EU596016 - EU596025	11
	Sado	Sado	GenBank: 595960 – 596008; GQ340531; GQ340538; GQ340539	32
	Garrone	Garrone	GenBank: EU596110 - EU596117	8
	Sao Pedro	Sao Pedro	GenBank: EU595972 - EU595979; GQ34047 - GQ3405; - EU596187	22
<i>E. mariae</i>	Šventoji	Šventoji	2011 05 05/ 56° 3' 24.82", 21° 8' 12.96"	1
	Blendžiava	Nemunas	2012 05 05/ 55° 58' 59.93", 21° 31' 40.43"	2

* Ammocoetes used for molecular studies

* Tyrimams naudoti vingiliai

Procedures in the laboratory. DNA was extracted from muscle tissues and fin clips using the Salting Out protocol (Aljanabi & Martinez 1997) with slight variations. DNA fragments of the control region (non-coding region I) were amplified using primers Lamp-1R and Lamp-1F (Blank *et al.* 2008). For partial cytochrome b (*cyt b*) gene amplification, LA and PRO primers were used (Espanhol *et al.* 2007) (Table 2). DNA sequencing was carried out at the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre by using the research and development infrastructure of the Open Access Centre for Nature Research within the Lithuanian open access network.

Table 2. Characteristics of primer pairs used for amplification of different mtDNA regions.

2 lentelė. MtDNR regionų amplifikacijai skirtų pradmenų charakteristikos.

Region	Primer pair	Primer sequence (5'-3')	T _m , C°	Position
NCR-I	Lamp-1F/ Lamp-1R	F: ACACCCAGAAACAGCAACAAA R: GCTGGTTTACAAGACCAGTGC	63 64	11877-11897/ 11244-11264*
<i>cyt b</i>	LA/PRO	F: GCGACTTGAAAAACCACCGTT R: TAGATACAGAGGTTTGAATCCC	64 59	11957-11977/ 13355-13376*

* According to *Lampetra fluviatilis* sequence (GenBank: Y18683)

* Pagal *Lampetra fluviatilis* seką (GenBank: Y18683)

MtDNA sequence analysis. A total of 243 lamprey specimens whose length was 562–611 bp were investigated for mtDNA non-coding region I (NCR-I) polymorphism. Out of these, 118 sequences were determined in the course of this work (the sequences of different haplotypes are deposited in the GenBank KR558636–KR558655), while 125 sequences were deposited in GenBank and previously obtained by other researchers (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013).

The sequences were aligned using the ClustalW algorithm (Thompson *et al.* 1994), and the construction of ML trees based on the Kimura 2-parameter model (K2P) (Kimura 1980) was carried out using MEGA 6.05 (Tamura *et al.* 2013). The distance between the groups of sequences was calculated in line with the Kimura 2-parameter (K2P) plus the gamma (K80+G) method, as well as MEGA 6.05 (Tamura *et al.* 2013).

The number of polymorphic sites (S), haplotype diversity (H), the average number of nucleotide differences (K) were measured by the uncorrected average number of nucleotide substitutions per site between the populations (K_{XY}) (Nei, 1987), and the fixation index (F_{ST}) with the significance level (p) were estimated using the DNASP 5.10.01 program (Librado and Rozas, 2009). During these calculations, all positions with gaps were included into the analysis and considered to be the fifth position.

Haplotype networks were constructed using the median joining (MJ) algorithm (Bandelt *et al.* 1999) that was installed in the NETWORK 4.6.1.1 program (www.fluxusengineering.com). In order to simplify the haplotype network which consisted of *L. fluviatilis* and *L. planeri* mtDNA NCR-I region sequences, it was decided to use the additional maximum parsimony (MP) algorithm (Polzin & Daneshmand 2003) that was also installed in the NETWORK 4.6.1.1 program.

While constructing haplotype networks, all positions with gaps were included in the analysis; however, 39 bp and 2 bp heretoplasmic deletions as well as the duplicated regions of 10 bp in two sequences were eliminated from the analysis. The haplogroups were distinguished, and haplotypes were attributed to one or another haplogroup on the basis of the following criteria: the number of mutational steps between the sequences representing different haplotypes, haplotype frequency, and the number of mutational steps separating several rare haplotypes from the haplotype that connects them and distinguishes itself by a greater frequency.

Determination of lamprey species. In order to determine the species of lampreys, for the sequences which during mtDNA NCR-I phylogenetic analysis separated from *L. planeri* and *L. fluviatilis* into a separate clade, additional phylogenetic analysis of cytochrome *b* sequences was performed. These mtDNA *cyt b* sequences of uncertain origin were aligned with 484 bp length sequences of, *Eudontomyzon lanceolata*, *E. mariae*, *E. stankokaramani*, *E. vladykovi*, and *P. marinus* deposited in the GenBank under accession numbers GQ206176, EU404062, EU404063, AM051061, GQ206162,

GQ206189, GQ206161, NC_001626 (Lee & Kocher 1995, Espanhol *et al.* 2007, Blank *et al.* 2008, Lang *et al.* 2009 unpublished). The construction of the ML dendrogram was carried out using MEGA 6.05 (Tamura *et al.* 2013).

***In situ* hybridization experiment of *L. fluviatilis* and *L. planeri*.** *L. fluviatilis* and *L. planeri* hybridization experiments were carried out under natural conditions in the Šventoji (direct Baltic Sea tributary), Blendžiava, and Salantas rivers between 5 May and 26 May of 2012, and in the Musė, Salantas, and Šventoji (direct Baltic Sea tributary) between 20 April 2013 and 13 May 2013. All lampreys were collected while spawning in redds. Females and males of both species possessed distinctive sexual features typical of mature individuals: a post-cloacal fin fold in females and a genital papilla extending from the cloaca in males (Renaud 2011). All crosses were performed between unique pairs of lampreys. As spent females were also present in the redds, females were selected according to the body fill and visible eggs through translucent skin near the cloaca. Males for crossbreeding were selected randomly. *L. planeri* and *L. fluviatilis* spawners were anaesthetised by 0.5 ml l⁻¹ 2-phenoxy ethanol. Gametes of both sexes were hand stripped into modified salmonid incubation boxes (Rubin 1995, Nika 2011). Prior to releasing gametes, the incubation boxes were placed in a 0.75 l beaker filled with stream water taken from the river upstream of the redds. Hybridization was tested among the reciprocal crosses of *L. planeri* × *L. fluviatilis* and the control group crosses of *L. fluviatilis* × *L. fluviatilis*. Each cross group was placed into an individual incubation box. The incubation boxes were made of a PVC cylinder (diameter: 8 cm; height: 10 cm; volume: 500 cm³). Each box was sealed with a double layer of mesh: the outer flexible protective PVC mesh (mesh size 6 x 6 mm) and the inner mesh (mesh size 200 μm) to secure egg compartments from fine sediment and to prevent hatched larvae from escaping (Figure 1a). PVC hoops were tightened with clamps on the top and bottom parts of the box to support its structure.

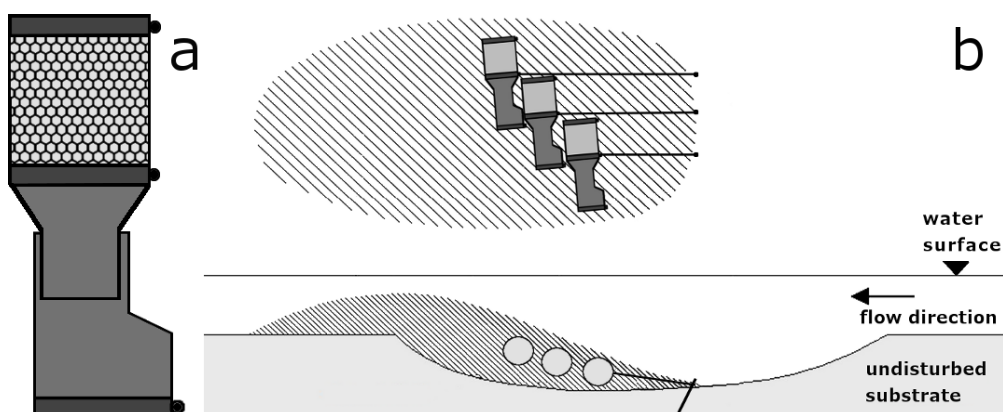


Fig. 1. Experimental egg incubation box (a) and the scheme of incubation box placement in redd tailspills (b).

1 pav. Modifikuota inkubacinė dėžutė (a) ir dėžučių išdėstymo schema nęgių nerštiniuose lizduose (b).

The number of retrieved eggs varied considerably from a few dozens of *L. planeri* to several thousands of *L. fluviatilis* although the precise number was not estimated. To ensure successful fertilization, boxes were kept in a water reservoir and hand stirred for a minute. Afterwards, the boxes containing the fertilized eggs were positioned at the front of the redd tailspill or crest and anchored to the bottom to minimize losses (Fig. 1b).

RESULTS AND DISCUSSION

During this study, ammocoetes were investigated in 52 rivers in the territory of Lithuania. Lamprey ammocoetes were detected in 81.1% of all the investigated rivers and in 69.4% of the study sites during the 2007–2013 investigation period. The frequency of occurrence both in rivers and sites varied within the maximum range, i.e. from 0% to 100%. Ammocoetes were not caught in 10 rivers. In the catchments of the Šventoji River as a Neris River tributary and of the Šventoji as a direct Baltic Sea tributary, ammocoetes were caught in all sites, and the recorded frequency of occurrence both in rivers and sites was 100%. The smallest frequency of occurrence was detected in the catchment of the coastal rivers (50% and 27.8% in rivers and sites, respectively).

Table 3. Multiple linear regression and multifactorial variance analysis results for the most important environmental factors affecting ammocoete abundance in rivers.

3 lentelė. Svarbiausi aplinkos veiksniai darantys įtaką vingilių gausumui upėse. Daugialypės tiesinės regresijos ir daugiafaktorinės dispersinės analizės rezultatai.

	Factor	Multiple regression			ANOVA			
		Beta	r_d	p	F	p	r	r^2
Ammocoete abundance					20.84	<0.001	0.54	0.29
	(Box-Cox) Channel slope	0.44	0.43	<0.001				
	(arcsin) Unregulated section of the river	0.21	0.21	<0.001				
	Catchment	0.29	0.31	<0.001				

To find out the factors that could determine lamprey distribution in Lithuania, multiple regression with backward elimination procedure was applied. The following factors were used for the analysis: ammocoete density data obtained in this study and various descriptors either directly available or derived from the reference source information (location in one of the major catchments, discharge, channel slope, order of the tributary, catchment area (A) and length (L), direct ratio of catchment area to length, catchment width, catchment elongation ratio, unregulated section of the river, parabolic link α parameter between the area and length of the catchment) (Gailiušis *et al.* 2001). After 7 steps of elimination of the least significant variables, ammocoete distribution was found

to be significantly affected by channel slope, size of unregulated section of the river, and the catchment to which the river belongs ($p < 0.001$ for all, Table 3).

A very weak correlation was identified between the ammocoete density in the river and unregulated section of the river ($r = 0.22$). The ammocoete density was found to be weakly correlated with the location of the river in a specific river catchment and channel slope in the sampling site ($r = 0.43$ and $r = 0.31$, respectively). Therefore, only the two latter factors were thoroughly investigated against abundance of lampreys in the Lithuanian river systems.

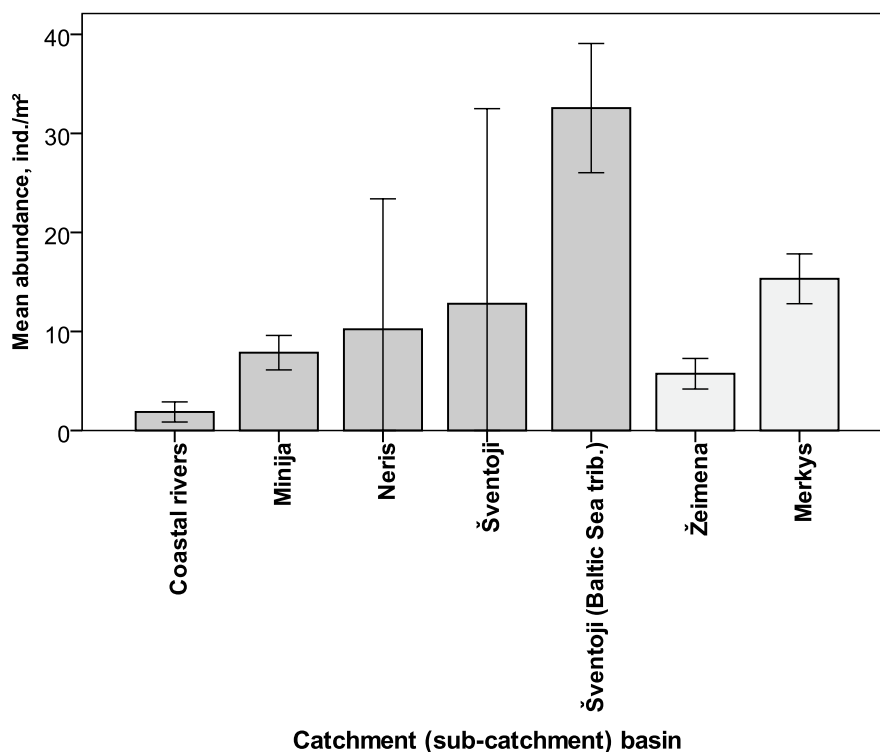


Fig. 2. *Lampetra* spp. ammocoete average density and 95% confidence intervals in Lithuanian catchments during 2007–2013 period. *L. fluviatilis* – dark columns, *L. planeri* – light columns.

2 pav. Vidutinis *Lampetra* spp. tankumas ir 95% pasikliautinieji intervalai Lietuvos upių baseinuose (pabaseiniuose) 2007-2013 m. Tamsūs stulpeliai – migruojančios *L. fluviatilis*, šviesūs stulpeliai – sėsli *L. planeri*.

The density of *Lampetra* spp. ammocoetes varied greatly among river basins (sub-basins) (Fig. 2.). During the 2007–2013 study period, the estimated ammocoete density in catchments (sub-catchments) varied significantly (Kruskal-Wallis ANOVA, H_6 , $192 = 83.6$, $p < 0.001$) from 1.9 ± 3.2 ind./m² (\pm SD) to 32.6 ± 8.5 ind./m² (\pm SD). According to the Tukey HSD test, the catchments of coastal rivers and the catchment of the Šventoji River (Baltic Sea tributary) mostly distinguished by multiannual density of ammocoetes. The average ammocoete density in the catchments of coastal rivers was significantly lower than in catchments or sub-catchments of the Minija ($p < 0.001$),

Žeimena ($p < 0.001$), Merkys ($p < 0.001$), Šventoji (Neris tributary) ($p = 0.03$), and Šventoji (Baltic Sea tributary) ($p < 0.001$). The catchment of the Šventoji (Baltic Sea tributary), on the contrary, distinguished by a higher abundance of ammocoetes compared with catchments or sub-catchments of coastal rivers ($p < 0.001$), Minija ($p < 0.001$), Neris ($p < 0.001$), Žeimena ($p < 0.001$), and Merkys ($p = 0.04$) rivers. A greater ammocoete abundance was also detected in Žeimena ($p < 0.001$) and Merys ($p < 0.001$) sub-catchments compared with the sub-catchments of coastal rivers and Minija River, respectively.

The results obtained suggest that in river catchments dominated by *L. fluviatilis* (excluding the Švenjoji (Baltic Seas tributary) where *L. fluviatilis* was highly concentrated due to limited accessible range) a tendency for higher ammocoete density in further inland catchments was observed. While comparing the catchments dominated by *L. planeri*, ammocoete density was considerably higher in the Merkys sub-basin than in the Žeimena sub-basin. Therefore, it can be discussed that there exists an increasing West-East gradient in *L. fluviatilis* population, whereas for *L. planeri* population such gradient is observed from North to South.

A detailed comparison of the effect of channel slope classes on ammocoete abundance showed that ammocoete abundances significantly differed subject to the slope class (*one-way ANOVA*; $F = 6.3$, $p < 0.001$). Ammocoete abundance in the river sections of slope class one (0–1 m/km) was lower than in the rest classes of river sections of slope (*post hoc Tukey HSD*, $p < 0.01$ for all). In estimating the significance of correlation between ammocoete abundance and slope, the Pearson partial correlation was used, while controlling the effect of the catchments. As in the case of multiple regression, a weak, yet higher correlation between ammocoete abundance and channel slope ($r = 0.4$) was detected.

From the perspective of the catchment basin, ammocoetes could be absent in a greater part of the basin or their abundance could be low due to a limited number of spawning grounds and limited distance that larvae manage to migrate down the waterway. The ammocoete age groups were calculated from the length frequency analysis of 537 records of *Lampetra* spp. ammocoetes, which ranged from 22 mm to 163 mm. We used the *K*-means cluster analysis to divide ammocoete length observations into 6 *k* clusters after 26 iterations ($F_{1;536} = 2084$, $p < 0.001$). The estimated ammocoete age group intervals broadly corresponded to other authors' research data from the Lithuanian rivers (Virbickas *et al.* 1996) (Table 4).

Table 4. Ammocoete age groups and length limits estimated in this work and in previous studies in Lithuania (Virbickas *et al.* 1996).

4 lentelė. Šio darbo metu ir ankstesnių tyrimų metu Lietuvoje (Virbickas *et al.* 1996) nustatytos vingilių ilgio klasės ir amžinės grupės.

Age group	Ammocoete length limits (mean value) mm	Ammocoete length limits in Virbickas <i>et al.</i> 1996 mm
I	24-45 (34,8)	29-37
II	44-63 (53,8)	45-53
III	64-83 (73,2)	63-79
IV	84-104 (93,8)	85-95
V	107-128 (117,3)	112-123
VI	125-156 (140,1)	-

We used the data from the Vieštovė, Eketė, and Šventoji rivers for power function models (Ratkowsky 1983) for ammocoete distribution downstream from the spawning grounds for small ($F_{1,26}=92$; $p<0.001$; Fig. 3) ($r^2=0.81$) and medium-size ($F_{1,96}=253$; $p<0.001$; Fig. 4) ($r^2=0.67$) rivers. The ammocoete distribution models suggest that until metamorphosis river lamprey ammocoetes can migrate (for calculation we used the upper limit of the estimated fifth age group $L=127$ mm) from 6.3 ± 0.272 km (\pm SE) in medium-sized rivers to 6.9 ± 0.372 km (\pm SE) in small-sized rivers on average.

Available spawning sections in rivers could be one of the main factors influencing the abundance and distribution of lampreys in the Lithuanian rivers. Water velocity and habitat substratum have been highlighted as the main factors in a number of studies (Young & Kelso 1990, Ojutkangas *et al.* 1995, Beamish & Jebbink 1994, Beamish & Lowartz 1996, Almeida & Quintella 2002, GoTo & Sugiyama 2002), although secondary factors that determine the distribution and abundance on a catchment scale should also be considered. The identified longitudinal gradient should be taken into account when implementing monitoring programs. If the sampling procedure is performed randomly, it is likely that ammocoetes are undersampled and estimates of population abundance, size and status can be biased.

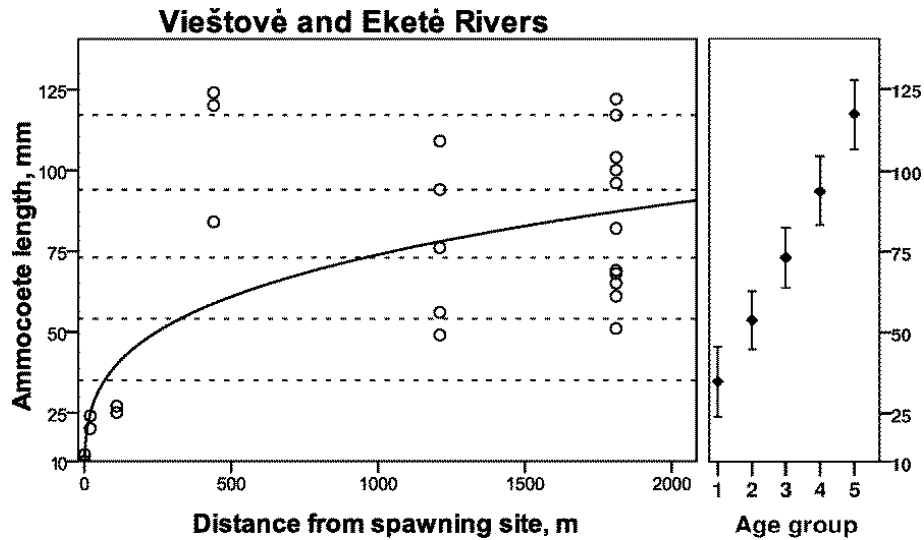


Fig. 3. Values of ammocoete length in relation to ammocoete age group distribution model in the Viešтовė and Eketė rivers. Circles indicate ammocoete lengths.

3 pav. Vingilių amžinių grupių pasiskirstymas žemiau nerštaviečių Viešтовės ir Eketės upėse. Apskritimais pažymėti sugautų vingilių ilgiai.

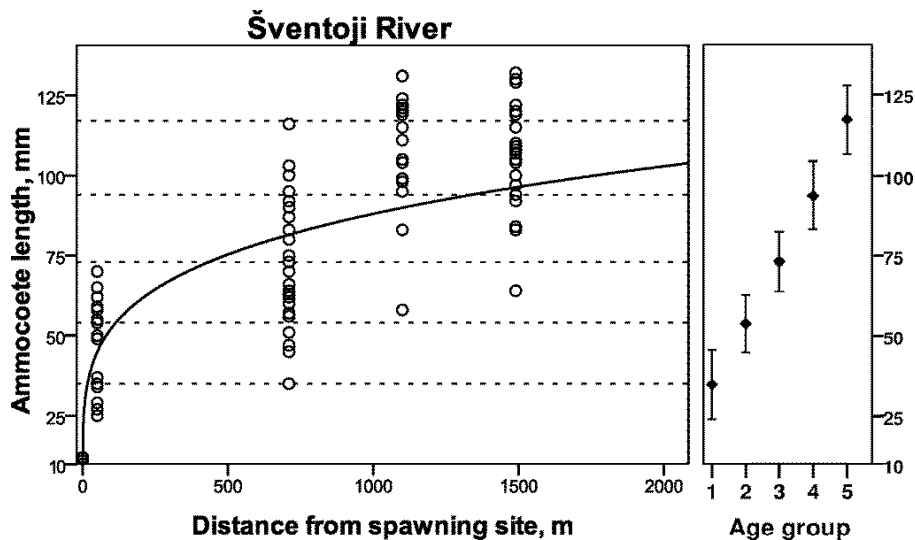


Fig. 4. Values of ammocoete length in relation to ammocoete age group distribution model in the Šventoji River (Baltic Sea tributary).

4 pav. Vingilių amžinių grupių pasiskirstymas žemiau nerštaviečių Šventosios (Baltijos jūra) upėje. Apskritimais pažymėti sugautų vingilių ilgiai.

Molecular determination of lamprey species. The collected samples of *L. fluviatilis* and *L. planeri* individuals were investigated by pooling newly obtained mtDNA NCR-I of 611 bp length fragments and homologous reference sequences of *L. fluviatilis* and *L.*

planeri derived from GenBank into a phylogenetic analysis by generating the maximum likelihood (ML) dendrogram. The results of phylogenetic analysis indicate that the majority of investigated sequences of *Lampetra* spp. individuals that have been caught in the rivers of the south-eastern Baltic region and identified on the basis of their morphological features as belonging to *L. fluviatilis* or *L. planeri* species were grouped together forming a separate monophyletic cluster (Fig. 5). Most of the haplotypes were found in single specimens, although 11 haplotypes were found more than once. The most common haplotypes H1, H5, H7, H11 (58% of all specimens) and H3, H19 were shared between both *L. fluviatilis* and *L. planeri* individuals. The estimated genetic distance between *L. fluviatilis* and *L. planeri* was 0.4 ± 0.2 % (\pm SE), which does not exceed the level of intraspecific variation indicating a lack of separation between nominal species. Genetic distances among non-parasitic *L. planeri* and parasitic *L. fluviatilis* from Iberian Peninsula, North Sea and Baltic Sea also exhibited the same low level of genetic variation indicating a lack of separation.

Among the investigated lampreys collected in Lithuania, mtDNA sequences of a few specimens clustered together with homologous NCR-I sequences of *E. mariae* from the Danube basin. The average genetic distances attained from the control region between *L. fluviatilis* and *E. mariae* (6.1 ± 2.4 % (\pm SE)) and between *L. planeri* and *E. mariae* (6.2 ± 2.5 % (\pm SE)) indicate interspecific differences. Genetic distances of such magnitude detected among individuals collected in the Nemunas catchment (territory of Lithuania) and Šventoji (direct tributary of the Baltic Sea) rivers and the rest of studied specimens indicate the occurrence of an isolated sub-species *E. mariae* inhabiting some Lithuanian rivers. However, due to low occurrence and identification based on a single genetic marker, these results should be interpreted with caution.

5 pav. Pietryčių Baltijoje ir kituose Europos geografiniuose regionuose aptinkamų nęgių rūšių mtDNR NCR-I 556 bp ilgio homologinių sekų pagrindu sukonstruota ML molekulinės filogenijos dendrograma.

Dendrograma sukonstruota iš 38-ių haplotipų ML metodu, paremtu Kimuros dviejų parametrų modeliu (1980) +G modeliu (5 kategorijos (+G parametras; $\alpha=0,05$); išsišakojimų vertės apskaičiuotos iš 1000 savirankos imčių (angl. bootstrap replicates). Santrumpos: L pla = *Lampetra planeri*, L flu = *Lampetra fluviatilis*, uni = nenustatyta rūšis; sugavimo vietos: NEM – Nemuno upės baseinas; SVE – Šventosios upė; DAN – Danės-Akmenos upės baseinas; GAU – Gaujos upė, BAR – Bartuvos upės baseinas; VEN – Ventos upės baseinas; VYS – Vyslos upė; NEV – Nevos upė; REI – Reino upės baseinas; MON – Mondego upė; SAD – Sado upė; SPED – Sao Pedro upė, GAR – Garone upė.

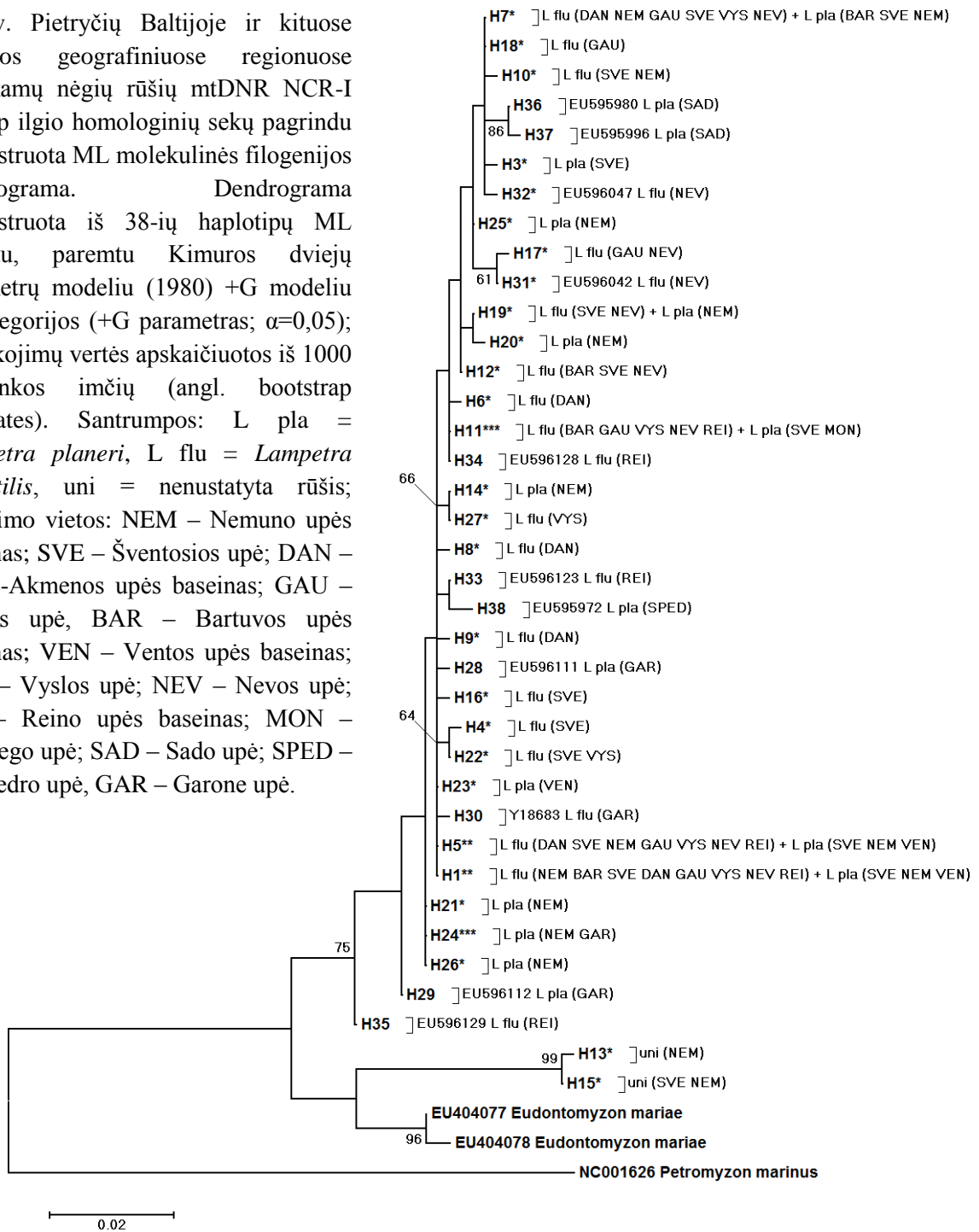


Fig. 5. ML dendrogram constructed on the basis of homologous sequences (556 bp length) of mtDNA NCR-I from lampreys of south-eastern Baltic and other European regions. The dendrogram constructed of 38 lamprey haplotypes by using the ML method based on Kimura's (1980) two-parameter distance +G model (5 categories (+G, parameter =0.05); numbers at nodes are bootstrap values for 1,000 replications. The abbreviations are as follows: L pla = *Lampetra planeri*, L flu = *Lampetra fluviatilis*, unident = unidentified species; NEM – Nemunas catchment; SVE – Šventoji; DAN – Danės-Akmena catchment; GAU – Gauja, BAR – Bartuva catchment; VEN – Venta catchment; VYS – Vistula; NEV – Neva; REI – Rhine; MON – Mondego; SAD – Sado; SPED – Sao Pedro, GAR – Garonne.

Additional molecular data based on the sequencing of *cyt b* gene as a second genetic marker supported our assumption of the existence of *E. mariae* representatives in Lithuania. A phylogenetic analysis carried out on mtDNA *cyt b* sequences using ML methods revealed the separation of specimens into two principal clades: (a) a separate clade similar to that in the control region encompassing individuals attributed to *Lampetra planeri* and *Lampetra fluviatilis* species and the remaining group of sequences, which includes the Turkish brook lamprey *Lampetra (Eudontomyzon) lanceolata*, and (b) the clade representing *Edontomyzon* genus, which is grouped together with *E. mariae* haplotypes detected in Lithuania (Fig. 6). The first clade is generally represented by one cytochrome *b* haplotype (H26, Fig. 6.). This clade consists of identical cytochrome *b* sequences or the sequences with minimum possible mutations (H6 and H23). The estimated genetic distance between *L. fluviatilis* and *L. planeri* by mtDNA *cyt b* is minuscule ($0.1 \pm <0.01 \%$ (\pm SE)). *E. mariae* haplotype found in Lithuania was identical to those found in the specimens collected from the Ivanko River in Ukraine (GQ206162, Lang *et al.* 2009) and Danube River (AM051061; Espanhol *et al.* 2007). The average genetic distances estimated between *E. mariae* and *L. fluviatilis/L. planeri* using mtDNA *cyt b* gene were almost identical; they accounted for $3.6 \pm 0.1 \%$ (\pm SE) and $3.7 \pm 0.1 \%$ (\pm SE), respectively.

Both analysed genetic markers, mtDNA NCR-I region and *cyt b* gene, revealed that genetic distances between *L. fluviatilis* and *L. planeri* individuals inhabiting the Baltic Sea basin were small ($0.4 \pm 0.2 \%$ (\pm SE) and $0.1 \pm <0.01 \%$ (\pm SE), respectively). Johns and Avise (1998) concluded that 90% of putative sister species showed sequence divergences greater than 2% in *cyt b* gene. However, the results of a molecular study indicate that the divergence of DNA sequences of both markers does not exceed the intraspecific level in *L. fluviatilis* and *L. planeri* individuals collected in Lithuania, and these findings are at variance with Mateus *et al.* (2013b) results of restriction site-associated DNA sequencing (RADseq) of lampreys caught in the Tagus River basin. This discrepancy may be due to the role of the Iberian Peninsula as a refugium during the last glaciations, when sympatric *L. planeri* and *L. fluviatilis* populations had a sufficient evolutionary period for divergence. This partly confirms the discovery of three new cryptic species in the Iberian Peninsula (Mateus *et al.* 2013b), of which *L. auremensis* was found within another tributary of the Tagus River – the Nabao River. Therefore, without additional mtDNA results, we cannot rule out a possibility that *L. auremensis* or another allopatric population or species found in the Tagus River basin might be examined in Mateus *et al.* (2013b) study.

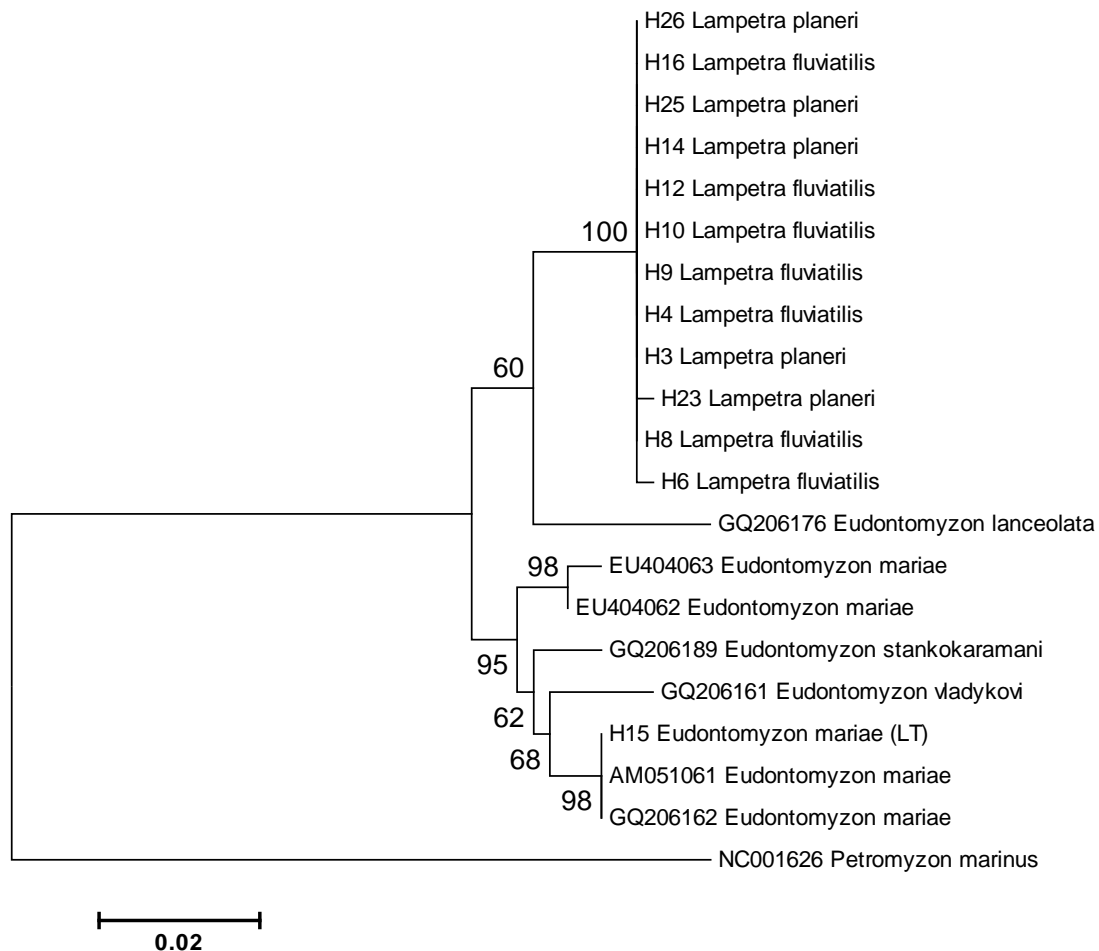


Fig. 6. ML dendrogram constructed on the basis of homologous sequences (484 bp length) of mtDNA *cyt b* region of lampreys, which had a unique mtDNA NCR-I haplotype determined only in this study. H followed by the number indicates mtDNA NCR-I haplotype.

6 pav. Žinomos rūšinės priklausomybės individų, priklausančių *E. lanceolata*, *E. mariae*, *E. stankokaramani*, *E. vladykovi* ir *P. marinus* ir 14 *Lampetra* spp. nėgių, pasižymintį skirtingais mtDNR NCR-I haplotipais, homologinių mtDNR *cyt b* sekų pagrindu sukonstruota ML dendrograma. H ir dviejų skaitmenų kombinacija prieš rūšies pavadinimą nurodo nustatyto individo mtDNR NCR-I haplotipą.

Genetic variability of mtDNA NCR-I sequences on a continental scale. In order to determine genetic differentiation between lampreys on a continental scale, *Lampetra* spp. differentiation between distinct geographical regions was compared. All the investigated lamprey populations in the eastern Baltic rivers were merged into a single sample of the Baltic Sea, lampreys from the Rhine River and Garonne River were regarded as the North Sea and Bay of Biscay sample (Pereira *et al.* 2010), and the Iberian Peninsula sample was composed of available sequences of specimens from the Sao Pedro, Sado, and Mondego rivers (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013). Genetic differentiation between hypothetical populations of the Baltic Sea and of the North Sea and Bay of Biscay was medium ($F_{ST} < 0.08$), and between populations of the Baltic Sea and of the Iberian Peninsula it was high ($F_{ST} < 0.18$, Table 5). It is natural that

differentiation between populations increases with increase in geographical distance. However, high differentiation ($F_{ST} < 0.3$) was found between lampreys of the Iberian Peninsula and of the North Sea and Bay of Biscay, which could have occurred due to a disproportionate number of compared individuals in the sampled populations. These results indicate a reduced gene flow and some degree of separation among geographically distant populations in Europe.

Table 5. Values of the fixation index (F_{ST} ; below diagonal) and significance levels of genetic differentiation (p ; above diagonal) between different *Lampetra* spp. populations of Europe (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013); the values were calculated using *Lampetra* spp. mtDNA control region data.

5 lentelė. Nėgių populiacijų poriniai palyginimai tarp skirtingų Europos geografinių regionų (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013) *Lampetra* spp. populiacijų, remiantis mtDNR NCR-I duomenimis, F_{ST} vertės (žemiau įstrižainės) ir skirtumų patikimumo vertės p (virš įstrižainės).

	Baltic Sea	North Sea and Bay of Biscay	Iberian Peninsula
Baltic Sea	139	0.007	<0.001
North Sea and Bay of Biscay	0.082	36	<0.001
Iberian Peninsula	0.181	0.298	89

Examination of *Lampetra* spp. genetic differentiation on the regional Baltic Sea scale revealed that genetic differentiation between *Lampetra* spp. populations of different eastern Baltic basin rivers was weak ($F_{ST} < 0.05$) (Table 6). The Venta River *Lampetra* spp. population was the only population (compared to the rest of the Baltic Sea populations) whose genetic differentiation varied from medium ($0.05 < F_{ST} < 0.15$) to great ($F_{ST} > 0.25$) depending on the compared pairs. The most probable explanation of such a differentiation is the presence of a natural barrier – the Venta rapid (Latv. *Ventas rumba*), which isolates the Venta River basin. Disregarding this exception it can be inferred that *Lampetra* genus subpopulations in the Baltic Sea rivers form a panmictic population, and in order to reveal subtle genetic differences between them it is necessary to use more sensitive molecular markers and methods.

Genetic differentiation results suggest that east Baltic *Lampetra* spp. populations may be experiencing the gene flow between two life strategies linked by migratory *L. fluviatilis*. Therefore, it could be assumed that *L. fluviatilis* lacks natal homing and that pre-spawn migration is a random phenomenon when the choice of rivers depends on the location of individuals prior to the start of migration.

Table 6. Values of the fixation index (F_{ST} ; below diagonal) and significance levels of genetic differentiation (p ; above diagonal) between different comparisons of *Lampetra* spp. samples from the Baltic Sea region; the values were calculated using *Lampetra* spp. mtDNA control region data.

6 lentelė. Nėgių populiacijų porinių palyginimų tarp tirtų Baltijos jūros upių, naudojant *Lampetra* spp. mtDNR NCR-I duomenis, F_{ST} vertės (žemiau įstrižainės) ir skirtumų patikimumo vertės p (virš įstrižainės).

	Nemunas	Venta	Danė- Akmena	Bartuva	Šventoji	Gauja	Vistula	Neva
Nemunas		0.617	0.109	0.306	0.245	0.344	0.270	0.180
Venta	0.149		0.213	0.251	0.436	0.285	0.317	0.421
Danė-Akmena	0	0.094		0.471	0.377	0.324	0.256	0.256
Bartuva	-0.048	0.163	-0.015		0.943	0.593	0.550	0.945
Šventoji	0.006	0.261	0.016	-0.050		0.657	0.660	0.760
Gauja	-0.022	0.185	-0.017	-0.074	-0.033		0.578	0.843
Vistula	-0.014	0.117	-0.039	-0.060	0.005	-0.034		0.484
Neva	0.021	0.295	0.004	-0.035	0.004	0.034	0.003	

***L. fluviatilis* and *L. planeri* haplotype network.** To find out possible reasons for the absence of genetic differentiation among the pairwise comparisons of the Baltic Sea *Lampetra* spp. populations, it was decided to look more thoroughly at the *Lampetra* genus genetic diversity and evolution traits. A MJ haplotype network was constructed from 243 lamprey mtDNA NCR-I sequences, which were identified in this work or previously obtained by other researchers (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013) (Fig. 7).

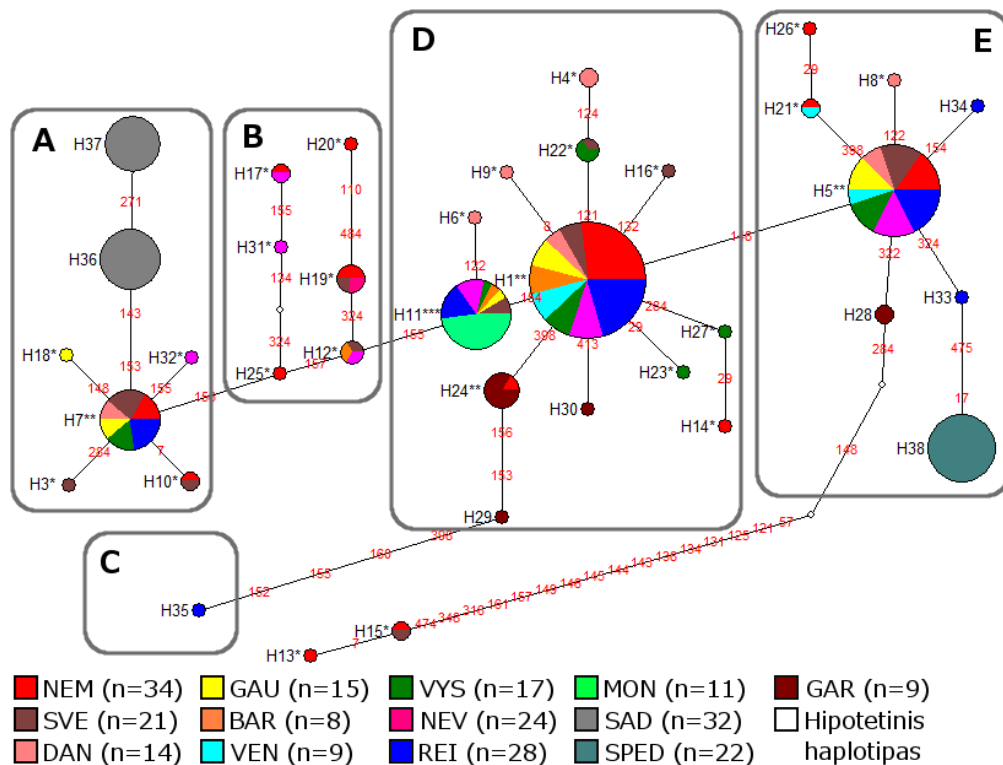


Fig. 7. MJ haplotype network of 243 *Lampetra* spp. mtDNA NCR-I sequences: white circles indicate hypothetical sequences that were not found during the study but are important for the construction of the haplotype network; the numbers between the nodes indicate mutational steps between the most related sequences; the radius of the circles is proportional to the frequency of haplotypes from 1 to 61. Abbreviations: NEM – Nemunas catchment; SVE – Šventoji; DAN – Danė-Akmena catchment; GAU – Gauja, BAR – Bartuva catchment; VEN – Venta catchment; VYS – Vistula; NEV – Neva; REI – Rhine ; MON – Mondego; SAD – Sado; SPED – Sao Pedro, GAR – Garonne.

7 pav. *Lampetra* spp. mtDNR NCR-I MJ haplotipų tinklas, sudarytas iš 243 sekų: baltais apskritimais pažymėtos hipotetinių haplotipų sekos, kurios nebuvo nustatytos šio tyrimo metu, bet buvo sugeneruotos, konstruojant haplotipų tinklą; skaičiai tarp taškų parodo mutacijų skaičių, o skaičių vertės konkrečias mutacijų pozicijas DNR sekoje; skritulių dydis rodo haplotipų aptikimo dažnumą nuo 1 iki 61. Santrumpos: NEM – Nemuno upės baseinas; SVE – Šventosios upė; DAN – Danės-Akmenos upės baseinas; GAU – Gaujos upė, BAR – Bartuvos upės baseinas; VEN – Ventos upės baseinas; VYS – Vyslos upė; NEV – Nevos upė; REI – Reino upės baseinas; MON – Mondego upė; SAD – Sado upė; SPED – Sao Pedro upė, GAR – Garrone upė.

In order to simplify the haplotype network, it was decided to connect the related sequences that share a common ancestor into haplogroups using the principle described in Material and Methods hereof. All *Lampetra* spp. mtDNA NCR-I haplotypes were grouped into five haplogroups in the MJ network. The configuration of the *Lampetra* spp. haplogroup network indicates three haplogroups, A, D, and E, predominantly distributed across Europe as the main genetic lineages (Fig. 8). Although, the individuals

attributed to haplogroup B were exclusively found in the Baltic Sea region and were distinguished by low frequency, they represent a unique evolutionary branch in the network indicating a sufficiently long period of independent evolution. No central haplotype was found in this haplogroup, which most likely is an indicator of a partially degraded genetic lineage that has lost most of its variability during the period of dramatic climate changes in northern Europe. The most extreme example of the phenomenon of the lost genetic variability is represented by a single haplotype (H35) attributed to haplogroup C that is separated from the closest haplogroup D by 4 mutational steps and can also account for a degraded lineage.

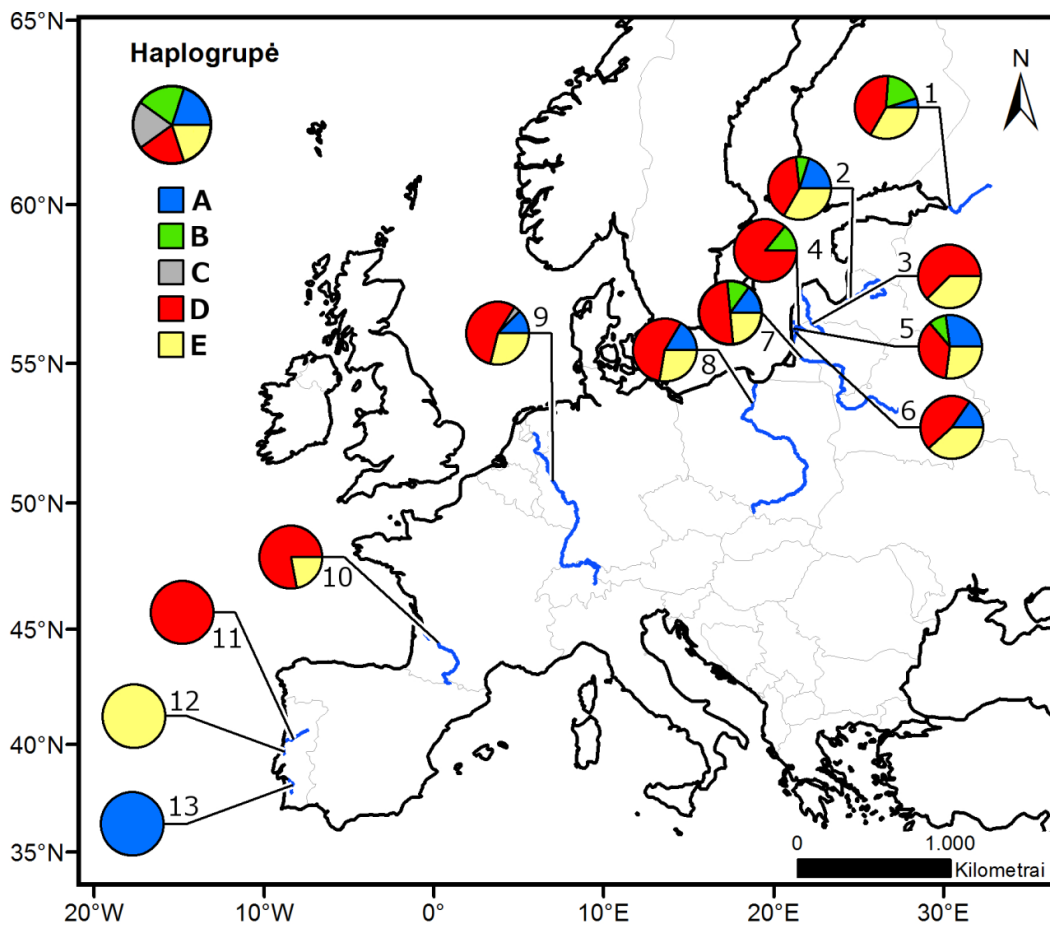


Fig. 8. Distribution of *Lampetra* spp. mtDNA NCR-I haplogroups in Europe. Lampreys collected in the course of investigation in: 2 – Gauja, 3 – Bartuva catchment, 4 – Venta catchment, 5 – Šventoji (Baltic Sea tributary), 6 – Danė-Akmenament catchment, 7 – Nemunas catchment, 8 – Vistula. Lampreys collected during earlier studies (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2012) in: 1 – Neva, 9 – Rhine, 10 – Garrone, 11 – Mondego, 12 – Sao Pedro, and 13 – Sado.

8 pav. *Lampetra* spp. mtDNR NCR-I haplogrupių paplitimas Europoje. Šio disertacinio darbo duomenys reprezentuoja nęgių populiacijas: 2 - Gaujos baseine, 3 – Bartuvos baseine, 4 – Ventos baseine, 5 – Šventosios baseine (Baltijos jūra), 6 – Danės-Akmenos baseine, 7 – Nemuno baseine, 8 – Vyslos baseine. Ankstinių tyrimų duomenys (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2012) reprezentuoja šias populiacijas: 1 – Nevos upėje, 9 – Reino upėje, 10 – Garrone upėje, 11 – Mondego upėje, 12 – Sao Pedro upėje ir 13 – Sado upėje.

All the Iberian Peninsula lamprey sequences are represented by isolated *L. planeri* populations. Due to the observed isolation of *L. planeri* in the Sado, Sao Pedro, and Mondego rivers, gene flow between *L. fluviatilis* and *L. planeri* is unlikely. This isolation results in the presence of representatives of a single A, D or E haplogroup in each river. The results imply the importance of the Iberian Peninsula as a refugium for the survival of *Lampetra* spp. in the course of several ice ages and subsequent recolonization of northern European waters. Based on haplogroup occurrence in Europe, it can be assumed that northern Europe was independently colonized by three lineages, which can be traced back to the existing lamprey populations or regions of the Iberian Peninsula.

***L. planeri*, *L. fluviatilis* and *E. mariae* in situ hybridization experiments.** In order to test possible *L. fluviatilis* and *L. planeri* crossbreeding, *in situ* hybridization experiments were carried out between 5 May 2012 and 26 May 2012 in the Šventoji (Baltic sea tributary), Blendžiava, and Salantas rivers and between 20 April 2013 and 13 May 2013 in the Musè, Salantas, and Šventoji (Baltic Sea tributary). Only *L. planeri* and *L. fluviatilis* were known from the selected study sites, although molecular studies revealed that hybridization was also performed between ♂ *E. mariae* × ♀ *L. fluviatilis*. A total of 36 lampreys (23 *L. fluviatilis*, 12 *L. planeri*, and 1 *E. mariae*) were captured in communal redds for experiments. During the first study period, both males and females of *L. fluviatilis* and *L. planeri* were present in redds. During the second period, *L. planeri* females were absent in the redds in the Musè and Salantas rivers. The redds were dominated by the river lamprey, and the ratio of brook to river lamprey in the redds varied within 0.35–0.45. Both males and females of *L. planeri* and *L. fluviatilis* were present in the redds. The male to female ratio of both species in the study sites was almost equal, in *L. fluviatilis* it varied within 0.45–0.55, and in *L. planeri* within 0.25–0.71.

It was found that as many as 246 larvae hatched during the experiments, of which 16 were hybrids either ♂ *L. planeri* × ♀ *L. fluviatilis* or ♂ *L. fluviatilis* × ♀ *L. planeri*, 18 ♂ *E. mariae* × ♀ *L. fluviatilis* and 212 *L. fluviatilis* larvae which were used as a control group (Table 7). The number of the hatched larvae in each box varied due to a different number of eggs in each box. The experiment was designed to meet the conditions closest to the natural ones without using any egg de-adhesion compounds. Due to highly adhesive properties, the eggs were stripped directly into the incubation boxes. Therefore, it was impossible to quantify the number of eggs and later to estimate the hybrid success between the cross groups. The emergence of larvae in all incubation boxes was observed at the end of May following 21 days of incubation. Larvae were kept in boxes for 41 days after hatching, and during this time no mortality of hybrids was observed, which indicates no increased mortality of hybrids at the initial life stage.

Fig. 7. Reciprocal crosses used in the experiment and the number of lamprey larvae retrieved from incubation boxes

7 lentelė. Kryžminimo eksperimento metu naudotos individų poros ir išsiritusių lervučių skaičius.

River	Year	Reciprocal cross	No. of incubation boxes	No. of hatched larvae
Blendžiava	2012	♂ <i>E. mariae</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i>	1	18
		♂ <i>L. fluviatilis</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i>	1	21
Šventoji	2012	♂ <i>L. planeri</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i> *	1	-
		♂ <i>L. fluviatilis</i> × ♀ <i>L. planeri</i>	1	1
		♂ <i>L. fluviatilis</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i>	1	148
Musė	2013	♂ <i>L. planeri</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i>	2	5
		♂ <i>L. fluviatilis</i> × ♀ <i>L. planeri</i>	2	1
Salantas	2013	♂ <i>L. planeri</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i>	1	5
		♂ <i>L. fluviatilis</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i>	1	0
Šventoji	2013	♂ <i>L. fluviatilis</i> × ♀ <i>L. planeri</i>	3	4
		♂ <i>L. fluviatilis</i> × ♀ <i>L. fluviatilis</i>	1	43

* incubation boxes lost during the experiment

* inkubacijos dėžutės prarastos eksperimento metu

Results of molecular investigations and hybridization experiments suggest that *L. fluviatilis* and *L. planeri* from the Baltic Sea region, as well as the anadromous sea trout (*Salmo trutta*) and the sedentary brown trout (*Salmo trutta*) might still be characterised as species exhibiting a complex life cycle, which includes the presence of sedentary and migratory forms of single species. On the one hand, a possible selection of the alternative life-history strategy can be one of the ways of ensuring gene flow between age cohorts in the migratory form, and, on the other hand, it could be one of the ways of ensuring genetic diversity within small populations of sedentary forms as anadromous lampreys perform the function of a vector for genetic.

Assessment of territories important for protection of NATURA2000 network. In the course of this study, were also assessed changes in *L. fluviatilis* and *L. planeri* conservation status in 14 Proposed Sites of Community Interest (pSCIs) for lamprey conservation in Lithuania. Changes in conservation sites were compared between 2008 and 2012–2013 monitoring periods (Table 8). In seven pSCIs, the status improved or was assessed as favourable for the first time. However, in six pSCIs the conservation status deteriorated: the status in one pCSI remained unfavourable, one pCSI was assessed as unfavourable for the first time, and three pSCIs were reassessed as unfavourable. Some of the changes can be explained by the use of different monitoring methods employed in 2008 and 2012–2013. In 2008, the Šventoji, Širvinta, and Siesartis rivers were assessed by quantitative evaluation of redds, and in the 2012–2013 period all

assessments were based on the ammocoete-based protocol. Therefore, a direct comparison of the indicators between pCSI periods is complicated, and the conservation status assessed in three previously mentioned rivers using the ammocoete protocol was downgraded from favourable to unfavourable.

Table 8. Change matrix for lamprey conservation assessments in Lithuania between 2008 and 2012–2013.

8. lentelė. Nėgių apsaugos statuso Lietuvoje pokyčio matrica tarp 2008 m. ir 2012 - 2013 m.

Habitats	Status in 2012–2013								
	Favourable	Inadequate improving	Inadequate stable	Inadequate declining	Bad improving	Bad stable	Bad declining	Unknown	Iš viso:
Status in 2008									
Favourable	3	0	0	0	0	0	0	0	3
Inadequate	2	4	1	0	0	0	0	1	8
Bad	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Not assessed in 2008	1	0	1	0	0	1	0	0	3
Totals:	3	4	5	0	0	1	0	1	14

The trend observed among lamprey populations is worrisome, particularly having in mind the fact that the changes were assessed in pCSIs. However, this trend should be interpreted with caution, since the *L. fluviatilis* status assessment methodology has changed over the period. It is also necessary to take into account the fact that the set density criterion is very high in Lithuania in comparison to that in Western Europe. Therefore, such high densities are currently observed only in the sites of natural accumulation, i.e. downstream from the spawning grounds.

CONCLUSIONS

1. According to current systematics, four lamprey species: an occasional migrant *P. marinus*, common *L. fluviatilis* and the *L. planeri*, as well as the newly discovered *Eudontomyzon mariae* dwell in Lithuania
2. The frequency of occurrence and population abundance of *Lampetra* spp. vary between major catchments basins in Lithuanian. The highest frequency of occurrence found out in Neris, Šventoji and Šventoji (Baltic Sea tributary) basins, while the highest abundance was determined in Šventoji (Baltic Sea tributary) basins. Both the lowest frequency of occurrence and the lowest abundance were found in the catchment basin of Coastal rivers.
3. Lamprey abundance is affected by differences in climatic, hydrological and hydromorphological conditions between river catchments or sub-catchments ($r=0.43$) and the channel slope in the investigated river sections ($r=0.4$), which determines the number of habitats suitable for reproduction and hydrological conditions in the habitats.
4. Because of a comparatively low dispersion of ammocoetes in the rivers (6.3–6.9 km before metamorphosis), the distance to the spawning grounds is also among major factors affecting ammocoete distribution and abundance ($0.88 < r < 0.9$ in different-size rivers).
5. Genetic distances detected between *L. fluviatilis* and *L. planeri* from the south-eastern Baltic region by applying NCR-I and cyt *b* mtDNA molecular markers ($0.4 \pm 0.2\%$ (\pm SE) and $0.1 \pm < 0.01\%$ (\pm SE), respectively) were identical to the estimated intraspecific distances.
6. By using the mtDNA NCR-I molecular marker it was established that *Lampetra* spp. in the south-eastern Baltic region exhibit genetic diversity similar to that exhibited by lampreys detected in other European geographical regions, and the population genetic structure of such lampreys is characterised by several distinctly expressed lineages, which are represented by A, D and E haplogroups.
7. The genetic differentiation between the *Lampetra* spp. population of the Baltic region and lamprey populations in other European territorial waters was found to be from moderate to intensive ($0.08 < F_{ST} < 0.3$), whereas genetic diversity differences between *Lampetra* spp. populations within the south-eastern Baltic region were insignificant ($0 < F_{ST} < 0.02$), which is due to poor reproductive isolation between different lamprey populations. The most specific population within the south-eastern Baltic region was an isolated *L. planeri* population in the

Venta River catchment, which distinguished by genetic diversity from other lamprey population of the region ($0.09 < F_{ST} < 0.3$).

IVADAS

Nėgės (*Petromyzontiformes*) priklauso bežandžių (*Agnatha*) gyvūnų grupei, jų seniausios žinomos fosilijos aptiktos Pietų Afrikoje uolienose, kurių amžius siekia Devono periodą, datuojamos 365 milijonų metų (Janvier *et al.* 2004, Gess *et al.* 2006). Nėgės, kaip ir kremzlinės žuvis, laikomos viena iš seniausių stuburinių taksonominių grupių. Tokių nėginių apskritažiomenių (*Cephalaspidomophi*) ilgaamžiškumą ir evoliucinę sėkmę lėmė šios gyvūnų grupės ekologinis plastiškumas.

Šiuo metu pasaulyje žinoma 40 nėgių rūšių (Renaud 2011). Didžiausia jų įvairovė pasižymi Europos ir Šiaurės Amerikos žemynai. Nepaisant šios grupės evoliucinės sėkmės, daugelis nėgių rūšių šiuo metu yra nykstančios arba atsidūrusios prie išnykimo ribos. Visuotinai sutariama, jog būtent antropogeninė veikla per pastarąjį šimtmetį tapo pagrindiniu veiksniu, neigiamai įtakojusiu nėgių paplitimą, išgyvenamumą, reprodukciją ir kitus ekologinius rodiklius (Kirchhofer 1996). Iki šio disertacinio darbo Lietuvoje buvo žinomos trys Petromyzontidae šeimos nėgių rūšys: nereguliariai užklystanti jūrinė nėgė (*Petromyzon marinus* L., 1758) bei dažnos upinė (*Lampetra fluviatilis* L., 1758) ir mažoji nėgė (*Lampetra planeri* Bloch, 1784). Visos trys Lietuvoje aptinkamos rūšys saugomos pagal Berno konvenciją (Appendix III) ir Europos Buveinių direktyvą (Annex II, V) (European Council Decision 82/72/EEC 1998, EEC. Council Directive 92/43/EEC 1992). Nėgių apsaugai turi būti išskirtos svarbios teritorijos NATURA2000 saugomų teritorijų tinkle ir užtikrinta gera jų populiacijų būklė.

Lietuvos ichtiocenozių tyrimai, tipišku atveju, yra vykdomi siekiant nustatyti kaulinių žuvų (Osteichthyes) populiacijų būklę, paplitimą, gausumą ir apsaugos statusą. Nėgėms, kaip sistematinei grupei, būdingas savitas gyvenimo ciklas: didžiąją gyvenimo dalį jos praleidžia lervos (vingilio) stadijoje įsirausios į dugno gruntą. Po metamorfozės suaugėliai keletą mėnesių praleidžia gimtosiose upėse arba kelerius metus aktyviai maitinasi jūroje. Dėl tokio gyvenimo ciklo suaugėlių ekologiniai tyrimai yra reti, o vingilių tyrimams būtina specifinė gaudymo metodika (Kesminas *et al.* 2009, Lasne *et al.* 2010b), kuri Europoje iki šiol vis dar tobulinama (Staponkus *et al.* nepublikuoti duomenys). Dėl anksčiau minėtų priežasčių Lietuvoje nėgių tyrimai yra fragmentiški ir neišsamūs: menkai ištirta rūšinė įvairovė, taip pat maža duomenų apie nėgių populiacijos būklę, paplitimą, gausumą ir apsaugos būklę. Pažymėtina, kad istoriniai verslinių laimikių duomenys dažniausiai nėra pakankami, norint išsamiai įvertinti nėgių populiacijų pokyčius.

Visos Lietuvoje aptinkamos nėgių rūšys yra įrašytos į Pasaulio gamtos apsaugos organizacijos (IUCN, angl. *International Union for Conservation of Nature*) raudonuosius sąrašus, kuriuose jos priskirtos kategorijai rūšių, kurių būklė visame areale kelia mažiausią rūpestį (angl. *Least Concern*). Vis dėlto, pastaraisiais metais Baltijos

jūros regione yra išsamiai įvertinta *P. marinus* ir *L. fluviatilis* populiacijų būklė. Remiantis IUCN vertinimo kriterijais, jūrinei nėgei Baltijos jūroje yra suteiktas pažeidžiamos rūšies (VU) C2a(i) statusas, o upinė nėgė laikoma artimoje ateityje galinčia tapti pavojingai nykstančia (NT) A2bd (HELCOM 2013).

Genetinių išteklių apsauga pagrįstą nėgių valdymą komplikuoja taksonominė painiava, esanti tarp parazitinių *L. fluviatilis* ir neparazitinių *L. planeri*. Abi rūšys yra laikomos dvyninėmis (angl. *paired species*) (Zanandrea 1959) arba palydovinėmis (angl. *stem-satellite species*) (Vladykov ir Kott 1979), kurios geba pasirinkti alternatyvias gyvenimo strategijas. Parazitinės *L. fluviatilis* migruoja į jūras ar į didesnius atviro vandens telkinius, kuriuose minta kaulinių žuvų (Osteichthyes) krauju ir kūno audiniais, o neparazitinės *L. planeri* po metamorfozės nebesimaitina ir lieka natalinėse upėse. Tokios skirtingos gyvenimo strategijos būdingos septynioms, įskaitant *Lampetra* gentį, iš dešimties nėgių genčių, aptinkamų Europoje, Šiaurės Amerikoje ir Australijoje, o palydovinės rūšys yra žinomos bent penkiose gentyse (Docker *et al.* 2009). Todėl tikėtina, kad kai kurių rūšių nėgės, veikiant aplinkos veiksniams, geba kardinaliai keisti savo gyvenimo strategiją. Lietuvoje ir Baltijos jūros regione vienintelė upinė nėgė yra reikšminga versliniu požiūriu (Thiel *et al.* 2009). Siekiant tvariai eksploatuoti *L. fluviatilis*, kaip verslinės žvejybos objektą, ir nesukelti pavojaus jų genetiniams ištekliams, būtina sukaupti pakankamai duomenų apie šios rūšies populiacinę-genetinę struktūrą. Šiuo metu Baltijos jūros regione daugelio nėgių populiacinės genetikos tyrimai yra neišsamūs (Espanhol *et al.* 2007, Blank *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2010), o Lietuvoje tokių tyrimų iki šiol nebuvo.

Darbo naujumas:

1. Naudojant molekulinis tyrimo metodus, atrasta nauja Lietuvos faunai rūšis – ukraininė nėgė *Eudontomyzon mariae*;
2. Ištirta Pietryčių Baltijos regiono nėgių genetinė įvairovė;
3. Nustatyti mažosios ir upinės nėgės paplitimą Lietuvoje įtakojoantys veiksniai;
4. Nustatytas vingilių augimo tempas ir nukeliamas atstumas nuo išsiritimo vietų iki vietų, kuriose vyksta metamorfozė.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė. Šiame disertaciniame darbe ištirtas *L. fluviatilis* ir *L. planeri* paplitimas ir gausumas Lietuvos upėse bei apžvelgti šiuos rodiklius įtakojoantys veiksniai, o taip pat įvertinta nėgių lervinių stadijų sklaida upėse. Pasitelkus molekulinės sistematikos metodus, buvo aptikta nauja nėgių rūšis Lietuvai – ukraininė nėgė *Eudontomyzon mariae* (Berg, 1931) (Staponkus *et al.* 2014). Tyrimų rezultatai yra reikšmingi ir svarbūs *L. fluviatilis* ir *L. planeri* populiacinės-genetinės struktūros ir rūšių formavimosi procesų suvokimui. Remiantis atliktų tyrimų rezultatais, galima teigti, kad

L. fluviatilis ir *L. planeri* priklauso tai pačiai evoliucinei linijai, o genų srautas tarp skirtingomis gyvenimo strategijomis pasižyminčių rūšių individų yra įmanomas. Tai patvirtina sėkmingas bendruose lizduose neršiančių *L. fluviatilis* ir *L. planeri in situ* kryžminimas. Praktiniu požiūriu darbas taip pat svarbus tuo, kad gauti nauji genetinių tyrimų duomenys gali būti panaudoti nėgių apsaugai. Galiausiai, yra įvertinamas ES svarbos nėgių rūšių apsaugos būklė ir jos pokytis bei pateikiamos rekomendacijos tolimesniems nėgių tyrimams ir būklės monitoringui Lietuvoje.

Darbo tikslas ir uždaviniai. Šio darbo tikslas – išaiškinti Lietuvoje aptinkamų nėgių rūšinę priklausomybę, panaudojant mtDNR žymenis, ir ištirti skirtingų nėgių rūšių kryžminimosi galimybes bei nustatyti nėgių paplitimą, populiacijų gausumą ir būklę Lietuvos vidaus vandenyse. Tikslui pasiekti buvo suformuluoti uždaviniai:

1. Įvertinti nėgių gausumą ir paplitimą skirtingose Lietuvos upių sistemose.
2. Įvertinti nėgių pasiskirstymą ir gausumą įtakojančius faktorius.
3. Nustatyti Lietuvos nėgių rūšinę priklausomybę, naudojant mtDNR NCR-I ir cyt *b* regionų sekas.
4. Eksperimentiškai įvertinti *L. fluviatilis* ir *L. planeri* kryžminimosi galimybes.
5. Naudojant mtDNR NCR-I žymenį, nustatyti *L. fluviatilis* ir *L. planeri* vidurūšinės genetinės įvairovės parametrus ir genetinius atstumus tarp šių rūšių pietryčių Baltijos regione.
6. Palyginti gautus Baltijos jūros baseine mtDNR duomenis su kitų Europos geografinių regionų *Lampetra* spp. populiacijų parametrais.
7. Apžvelgti *Lampetra* spp. populiacijų kilmę bei formavimosi dėsningumus, atsižvelgiant į istorinius gamtinius procesus Baltijos jūros formavimosi metu.

Ginamieji teiginiai.

1. Šiuo metu Lietuvoje aptinkamos keturios nėgių rūšys: upinė nėgė (*Lampetra fluviatilis*), mažoji nėgė (*Lampetra planeri*), jūrinė nėgė (*Petromyzon marinus*) ir ukraininė nėgė (*Eudontomyzon mariae*).
2. Skirtingose Lietuvos upių sistemose nėgės paplitusios nevienodai ir dėl skirtingų sąlygų nėgių populiacijų tankiai skiriasi.
3. Lietuvos upių sistemose upinė nėgė (*Lampetra fluviatilis*) ir mažoji nėgė (*Lampetra planeri*) geba kryžmintis.
4. Tarp upinių nėgių (*Lampetra fluviatilis*) ir mažųjų nėgių (*Lampetra planeri*) populiacijų Pietryčių Baltijoje genetinė diferenciacija silpnai išreikšta.

Rezultatų pristatymas ir aprobavimas. Disertacinio darbo rezultatai paskelbti 3 moksliniuose straipsniuose. Disertacijos tema perskaityti 2 moksliniai pranešimai mokslinėse konferencijose Lietuvoje ir Didžiojoje Britanijoje.

Disertacijos struktūra. Disertaciją sudaro šie skyriai: Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas, Išvados, Rekomendacijos, Literatūros sąrašas, Disertacijos tema publikuoti straipsniai ir konferencijų tezės, Padėkos, Priedai. Neįskaitant priedų, disertacijos apimtis – 132 puslapiai, 20 lentelės ir 37 paveikslai. Disertacija parašyta lietuvių kalba.

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje apžvelgiami tyrimų objektai – upinė ir mažoji nėgės, jų gyvenimo ciklai, populiacinė genetika ir *Lampetra* spp. rūšių atskyrimo problematika. Taip pat apžvelgiama mokslinė informacija apie pirmą kartą Lietuvoje rastą Ukraininę nėgę.

MEDŽIAGA IR METODAI

Medžiagos surinkimas. Upinių ir mažųjų nėgių populiacijų gausumo ir paplitimo būklės tyrimai nuo 2007 m. rugsėjo mėn. iki 2013 m. spalio mėn. Vingilių gausumas ir aptinkamumas vertintas Lasne *et al.* (2010b) pasiūlytu modifikuotu Surber tipo bentosiniu semtuvu ar bentosiniu semtuvu, iškasant gruntą 1 m² biotopo plote (Kesminas *et al.* 2008). Kad būtų įmanoma vingilius identifikuoti ir išmatuoti ilgį vietoje, jie buvo anestezuojami 10-15 ml/l dietilo eterio arba 2-fenoksi etanolio 0,5 ml/l tirpalu. Vėliau jie buvo laikomi inde su vandeniu, kol atsigaus, ir paleidžiami atgal į tą patį biotopą. Nesama požymių, kurie leistų identifikuoti *L. fluviatilis* ir *L. planeri*, todėl vingilių atpažinimui pasitelkiant Gardiner (2003) raktą, skirti tik *Lampetra* genties ir *P. marinus* individai.

Vingilių sklaidos modeliavimas upėse. Vingilių pasyvios migracijos tyrimams pasirinktos upių atkarpos, kuriose žinoma, kad upinės nėgės neršia kasmet, migracijos kelias iki nerštaviečių laisvas, t. y. nėra užtvankų ar kitų dirbtinių kliūčių, gerai išreikštos ir koncentruotos nerštavietės lokalizuotos iškart žemiau užtvankų, o 1,5–2 km ruože žemiau jų nėra kitų potencialių nerštui ruožų. Todėl tyrimui pasirinktos Šiaurės vakarų Lietuvos upės – Šventoji (Baltijos jūra), Vieštovė ir Eketė, kurios atitiko visus minėtus kriterijus. Visos trys upės priklausos skirtingiems baseinams: Šventosios upė teka tiesiogiai į Baltijos jūrą ir formuoja atskirą baseiną, Vieštovės upė yra kairysis Minijos intakas, kuri yra viena didesnių Nemuno baseino upių, Eketės upė priklauso Danės-Akmenos upės baseinui. Vingiliai visose trijose upėse rinkti skirtingais metais: Vieštovėje – 2007 m. gegužės pradžioje; Eketėje – 2008 m. kovo pabaigoje; Šventosios upėje – 2010 m. kovo pabaigoje. Kadangi vingilių ilgių dažnio analizei reikalingas

pakankamai didelis duomenų kiekis, į analizę buvo įtraukti vingilių ilgiai tuo pačiu metu surinkti 31-oje stotyje, devyniose tame pačiame regione tekančiose upėse Minijos upės pabaseinyje: Alanto, Salanto, Žvelso ir Minijos upėse; Danės-Akmenos upės baseine: Babrūnės, Bonės, Danės ir Šaltupio upėse Tyrimų vietų koordinatės nustatytos, naudojant GARMIN GPSMAP 60CSx rankinį GPS imtuvą. Tyrimo vietų koordinatės vėliau perkeltos į georeferentinę Lietuvos teritorijos (GDR10LT) duomenų bazę. Šių vietų atvaizdavimui buvo pasinaudota ArcView® (ESRI Redlands, Kalifornija, JAV) programine įranga.

Vingilių amžinių grupių dydžių ribos apskaičiuotos pasitelkiant ilgio dažnių analizę. Vingilių ilgiams sugrupuoti buvo panaudota nehierarchinė K-vidurkių klasterinė analizė, kuri kaip atstumo matą naudoja Euklido atstumą. Kadangi K-vidurkių metodui reikalinga pakankamai didelė imtis, be 114 vingilių, sugautų Vieštovėje, Eketėje ir Šventojoje, į analizę buvo įtraukti 413 *Lampetra* genties vingilių duomenys iš devynių anksčiau išvardintų upių, esančių Minijos pabaseinyje ir Danės-Akmenos baseine. Kiekvieno vingilių ilgio įrašas buvo priskirtas k klasteriui su artimiausiu vidurkiu, kurie atitiko amžines grupes. Vėliau šie klasteriai buvo normalizuoti ir apskaičiuotos kiekvienos amžinės grupės dydžių ribos naudojant $\pm 1,645$ standartinius nuokrypius, kurie atitinka 90% normaliojo skirstinio.

Vertinant vingilių amžinių grupių sklaidą žemiau nerštaviečių, patikrintos tiesinės ir netiesinės regresijos modeliai ir atrinktas geriausiai aprašantys šių duomenų pasiskirstymą modelis. Modeliui atstumas iki nerštavietės buvo pasirinktas kaip nepriklausomas kintamasis, o vingilių ilgis – kaip priklausomas kintamasis. Remiantis nacionaline klasifikavimo sistema, Eketė ir Vieštovė yra priskiriamos mažoms upėms (1 tipas: baseino plotas $<100 \text{ km}^3$), o Šventosios upė – vidutinio dydžio upėms (2 tipas: baseino plotas $>100 \text{ km}^3$, upės nuolydis $<0,7 \text{ m/km}$) (Aplinkos ministerija 2005b, Aplinkos apsaugos agentūra 2011).

Prieš analizę Šapiro-Vilk (angl. *Shapiro-Wilk test*) ir Kolmogorovo ir Smirnov testu Lilliefors modifikacija (angl. *Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction*) buvo patikrinta, kaip duomenys atitinka normalumo sąlygas. Kai normalaus pasiskirstymo sąlygos nebuvo tenkinamos, duomenys buvo naudotos $\log_{10}(x)$, $\log_{10}(1/x)$, $\arcsin(x)$ bei Box-Cox ($0 \leq \lambda \leq 0,2$) transformacijos. Duomenų analizei buvo naudoti standartiniai statistiniai parametriniai ir neparametriniai metodai: parametrinė vienfaktorinė dispersinė analizė (angl. *One-way ANOVA*), daugialypės tiesinės regresijos analizė (angl. *multiple regression*) ir Pirsono koreliacija (angl. *Pearson correlation*), neparametriniai Kruskalo-Voliso dispersinė analizė (angl. *Kruskal-Wallis ANOVA*), Mano-Vitnio rangų sumų kriterijus (angl. *Mann-Whitney U test*) ir Vilkoksono ženklų kriterijus priklausomoms imtims (angl. *Wilcoxon signed-rank test*). Duomenys darbe pateikiami standartiniu būdu: pateikiant vidurkius, standartinius nuokrypius (vidurkis \pm SD), standartines paklaidas

(vidurkis \pm SE) ir pasikliautinius intervalus. Rezultatai buvo laikomi patikimais kai reikšmingumo lygumo buvo $p \leq 0,05$.

Upių baseinų parametrų ir upių hidrologinių charakteristikų, kurios daro įtaką vingilių paplitimui ir gausumui nustatymui naudota daugialypė tiesinė regresija. Taikytas atbulinis (angl. *Backward*) kintamųjų eliminavimo žingsninis metodas, siekiant atrinkti tik turinčius reikšmingą įtaką parametrus. Analizėje buvo panaudoti šio darbo metu nustatyti vingilių gausumo upėse duomenys bei literatūrinuose šaltiniuose (Gailiušis *et al.* 2001) pateikiami upių parametrai (upių ilgis, debitas, baseino plotas, nereguliuotos upės dalis) ir kiti, pasinaudojus šiais duomenimis, išvesti parametrai (upės ploto (A) ir ilgio (L) tiesioginis santykis, baseino plotis, baseino iššėstumas, baseino ploto ir ilgio parabolinio ryšio α parametras). Upių intakų eilės numerių nustatymui naudotas Lietuvos Respublikos upių ir tvenkinių klasifikatorius (Aplinkos ministerija 2001), vidutinis upės nuolydis ir upės nuolydis tyrimų stotyje (200-600 m atkarpoje) apskaičiuoti naudojant Lietuvos reljefo žemėlapius (Lietuvos nacionalinis atlasas, www.maps.lt). Regresijos riktai atrinkti naudojant Mahalanobis atstumus. Vingilių paplitimo ir gausumo variacijos skirtumų tarp upių sistemų reikšmingumui nustatyti naudota neparametrinė Kruskalo-Voliso (Kruskal-Wallis ANOVA) dispersinė analizė ir Tjukio daugkartinio lyginimo (angl. *post hoc Tukey HSD*) kriterijus, kuomet lyginti upių. Analizuojant upės nuolydžio įtaką vingilių pasiskirstymo Lietuvos upėse dėsningumui buvo naudota dalinė Pirsono koreliacinė analizė, o nustatant skirtumus tarp nuolydžio klasių vienfaktorinė dispersinė analizė kartu su Tjukio daugkartinio lyginimo kriterijumi. Vingilių gausumas tarp upių sistemų tyrimų lyginti Mano-Vitnio rangų sumų kriterijumi, o jų gausumo upėse palyginimui skirtingais tyrimų laikotarpiais naudotas Vilkoksono ženklų kriterijus priklausomoms imtims. Duomenys statistiškai apdoroti naudojant Excel, Statistica ir R programinės įrangos paketais.

Medžiagos surinkimas genetiniam tyrimams. Iš viso genetiniam tyrimams panaudotos 76 upinės nėgės ir 42 mažosios nėgės, iš kurių trys individai vėliau molekuliniais metodais identifikuoti kaip *E. mariae*. Nėgės sugautos elektrožūklės metodu, rankiniu graibštu ar bentosiniais semtuvais (vingilių atveju). Gaujos upės (Latvijos Respublika) *L. fluviatilis* imtys tyrimams gautos iš Latvijos žemės ūkio universiteto, Maisto saugos, gyvūnų sveikatos ir aplinkos instituto „BIOR“. Vyslos upės imtis gauta iš Lenkijos Stanislovo Sakovičiaus vardo vidaus vandenų žuvininkystės instituto. Detalesnė informacija apie surinktas nėgių imtis pateikta 1 lentelėje

Laboratorinės procedūros. DNR buvo išskirta naudojant Aljanabi ir Martinez (1997) metodą su nežymiais pakeitimais; dažniausiai buvo naudojamas iš uodeginės arba nugarinės srities paimtas raumeninis audinys ar pelekinės klostės dalis. MtDNR NCR-I regiono (angl. *non-coding region I*) amplifikacijai panaudota Lamp-1F ir Lamp-1R pradmenų pora (Blank *et al.* 2008), mtDNR cyt *b* dalinės sekos padauginimui naudota

LA ir PRO pradmenų pora (Espanhol *et al.* 2007) (2 lentelė). Visų mtDNR sekų sekoskaita atlikta Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute, Molekulinės ekologijos laboratorijoje, pasinaudojant Gamtos tyrimų centro atviros prieigos mokslinės tiriamosios ir eksperimentinės plėtos infrastruktūra.

MtDNR sekų analizė. Iš viso upinių ir mažųjų nėgių mtDNR NCR-I regiono sekų analizei panaudotos 243 individų 562-611 bp ilgio sekos, iš kurių 118 sekos (skirtingų haplotipų sekos deponuotos GenBank duomenų bazėje KR558636–KR558655) nustatytos vykdant šį disertacinį darbą, o 125 buvo deponuotos genų banke anksčiau tyrimus vykdžiusių mokslininkų (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013).

Tiriamų nėgių rūšių DNR sekų sulyginimas bei dendrogramų, paremtų didžiausio tikėtimumo metodu (ML, angl. *maximum likelihood*) (Saitou & Nei 1987), naudojant Kimuros dviejų parametrų (K2P, angl. *Kimura 2-parameter*) bei gamma (K80+G) modelį, konstravimas buvo atliktas naudojant MEGA 6.05 (Tamura *et al.* 2013) programa. MEGA 6.05 programos atveju, DNR sekų sulyginimui naudotas ClustalW (Thompson *et al.* 1994) algoritmas.

Polimorfinių saitų DNR grandinėje skaičius (S), bendras mutacijų skaičius (η), haplotipų įvairovės parametras (h) (Nei 1987), nukleotidų įvairovės parametras (π) (Lynch & Crease 1990), nukleotidų pakaitų vidurkio koeficientas (K) (Tajima 1983), genetinis atstumas tarp lyginamų populiacijų, kuris yra išreiškiamas nekoreguotu nukleotidų pakaitų vidurkiu fragmentui, t. y. lyginamų sekų grupių skirtumų koeficientas (K_{XY}) (Nei 1987) ir fiksacijos indeksas (F_{ST}) (Hudson *et al.* 1992b) su patikimumo vertėmis (p) (Hudson *et al.* 1992a) buvo apskaičiuoti naudojant DNASP 5.10.01 programą (Librado & Rozas 2009). Atliekant skaičiavimus DNASP 5.10.01 programa delecijos buvo vertinamos kaip penkta pozicija.

Haplotipų tinklai buvo konstruojami naudojant medianų-jungimo metodą (MJ, angl. *median joining*) (Bandelt *et al.* 1999), įdiegtą NETWORK 4.6.1.1 programoje (www.fluxus-engineering.com). Šios analizės metu pašalintas dviejose sekose duplikavęsis 10 bp fragmentas. Siekiant supaprastinti *L. fluviatilis* ir *L. planeri* mtDNR NCR-I regiono haplotipų tinklą, pasitelktas papildomas mažiausio galimo pokyčių skaičiavimo (MP, angl. *maximum parsimony*) (Polzin & Daneshmand 2003) metodas, kuris taip pat įdiegtas NETWORK 4.6.1.1 programoje.

Dėl pasikartojančių heteroplazminių delecijų (angl. *heteroplasmic mtDNA deletions*) į analizę neįtraukti 39 bp ir 2 bp fragmentai, taip pat neįtrauktas dviejose sekose duplikavęsis 10 bp fragmentas. Konstruojant haplotipų tinklus delecijos visada būdavo vertinamos kaip penkta pozicija, tačiau minėtieji 39 bp, 10bp ir 2 bp fragmentai į analizę neįtraukti. Remiantis sukonstruotais haplotipų tinklais, filogenetiškai artimiausios, t.y. mažai tarpusavyje besiskiriančios, mtDNR sekos sujungtos tarpusavyje į haplogrupes.

Pagrindiniai kriterijai šių haplogrupių išskyrimui: mutacijų skaičius tarp sekų, reprezentuojančių skirtingus haplotipus, haplotipų dažnis, mutacinių žingsnių, skiriančių retus haplotipus nuo juos jungiančio haplotipo, pasižyminčio didesniu dažniu, skaičius.

Nėgių rūšinės priklausomybės nustatymas. Siekiant patikimai identifikuoti rūšinę priklausomybę individų, kurių mtDNR NCR-I sekos filogenetinės analizės metu atsiskyrė nuo *L. planeri* ir *L. fluviatilis* nėgių klados, buvo papildomai atlikta mtDNR cyt *b* sekų filogenetinė analizė. Gautos sekos palygintos su genų banke deponuotomis 484 bp ilgio *Eudontomyzon lanceolata*, *E. mariae*, *E. stankokaramani*, *E. vladykovi* ir *P. marinus* homologinėmis sekomis (GenBank under accession numbers GQ206176, EU404062, EU404063, AM051061, GQ206162, GQ206189, GQ206161, NC_001626 (Lee & Kocher 1995, Espanhol *et al.* 2007, Blank *et al.* 2008, Lang *et al.* 2009)). Palyginimas atliktas naudojant programą MEGA 6.05 bei remiantis Kimuros dviejų parametrų modeliu. Dendrograma sukonstruota remiantis ML metodu.

***L. fluviatilis* ir *L. planeri* hibridizacijos *in situ* eksperimentas.** *L. fluviatilis* ir *L. planeri* kryžminimas buvo atliekamas Šventosios (Baltijos jūra), Blendžiavos ir Salanto upėse 2012 05 05 – 2012 05 26 bei Musės, Salanto ir Šventosios (Baltijos jūra) upėse 2013 04 20 – 2013 05 13. Šiems eksperimentams visos nėgės buvo sugautos neršiančios lizduose. Abiejų rūšių nėgių patelės ir patinėliai atskirti pagal antrinius lytinius požymius, būdingus subrendusiems individams: patelės – pagal išburkusią pelekinę klostę tuoj už kloakos, patinėliai – pagal kloakoje susiformavusį lytinį spenelį (Renaud 2011). Visi kryžminimai atlikti tarp unikalių porų. Kadangi lizduose taip pat buvo išneršusių patelių, eksperimentui buvo pasirinktos patelės, atsižvelgiant į jų kūno ertmės užpildymą ikrais ir per permatomą odą kloakos srityje gerai matomus ikrus. Patinėliai kryžminimo eksperimentui buvo atrinkti atsitiktinai. Neršiantys *L. planeri* ir *L. fluviatilis* anestezuoti 2-fenoksi etanolio 0,5 ml/l tirpalu. Abiejų lyčių lytiniai produktai rankiniu būdu buvo išspausiti į modifikuotas lašišinių žuvų inkubacijos dėžutes (Rubin 1995, Nika 2011), kurios iš anksto buvo patalpintos 0,75 l talpos inde su švairiu vandeniu, paimtu iš upės aukščiau nerštinių lizdų. *L. planeri* ir *L. fluviatilis* kryžminimai buvo vykdomi tarp skirtingų lyčių ir kontrolinės grupės *L. fluviatilis* × *L. fluviatilis*. Kiekvienos kryžminamos poros lytiniai produktai buvo patalpinti individualios inkubacijos dėžutėse. Inkubacinės dėžės buvo pagamintos iš polivinilchlorido (PVC) cilindro (skersmuo: 8 cm; aukštis: 10 cm; tūris: 500 cm³). Dėžučių sienelės pagamintos iš dviejų skirtingo akytumo tinklų: išorinio - apsauginio PVC tinklo, kurio akių dydis 6 mm, ir vidinio – malūninio šilko su 200 μm akies sluoksniu, kuris skirtas apsaugoti inkubacinės dėžutės vidų nuo nešmenų ir sulaikyti išsirusias lervutes (1a pav.). PVC lankai ir tinklo sluoksniai sutvirtinti metalinėmis sąvaržomis.

Paimtų kiaušinėlių skaičius svyravo nuo kelių dešimčių *L. planeri* atveju iki keleto tūkstančių *L. fluviatilis*, tačiau tikslus jų skaičius neįvertintas. Siekiant užtikrinti

maksimalų galimą kiaušinėlių apvaisinimo koeficientą, dėžutės buvo laikomos vandens inde ne mažiau minutės. Vėliau inkubacinės dėžutės su apvaisintais kiaušinėliais buvo patalpintos tuose pačiuose lizduose, kuriuose buvo sugauti tėviniai individai, o siekiant sumažinti nuostolius papildomai įtvirtintos dugno substrate (1b pav.).

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šio darbo metu buvo ištirtos 52 Lietuvos teritorijoje tekančios upės. Bendras vingilių aptinkamumas visose 2007–2013 m. tirtose upėse buvo 81,1%, o tyrimų stotyse – 69,4%. Tiek upėse, tiek tyrimų stotyse aptinkamumo dažnis kito maksimaliose ribose, t.y. nuo 0% iki 100%. Viso šio tyrimo laikotarpiu vingilių nebuvo sugauta dešimtyje upių. Dažniausiai vingiliai buvo aptinkami Neries, Šventosios ir Šventosios (Baltijos jūros intakas) upių sistemose, kuriose vingiliai rasti visose tirtose upėse. Rečiausiai vingiliai buvo aptinkami Pajūrio upėse, kuriose vidutinis vingilių aptinkamumas upėse ir stotyse atitinkamai buvo tik 50% ir 27,8%.

Siekiant nustatyti veiksnius, galinčius lemti nęgių paplitimą Lietuvoje, buvo pritaikyta daugialypė regresija. Šiam tyrimui buvo panaudoti šio darbo metu nustatyti vingilių tankumo upėse duomenys bei literatūrinuose šaltiniuose esantys upių parametrai (baseinai, upių debitai, nuolydis, intako eilės numeris (Gailiušis et al. 2001) ir išvestiniai kriterijai: upės ploto (A) ir ilgio (L) tiesioginis santykis, baseino plotis, baseino išstūmumo santykis, nereguliuotos upės dalis, upės baseino ploto ir ilgio parabolinio ryšio α parametras. Po 7 mažiausiai reikšmingų kintamųjų eliminavimo žingsninių, nustatyta, kad reikšmingą įtaką vingilių paplitimui daro upės nuolydis, natūralios upės dalies dydis ir priklausomybė konkrečiam upės baseinui (visų $p < 0,001$).

Nustatytas ryšys tarp vingilių tankumo ir natūralios upės dalies ($r=0,22$) labai silpnas. Taip pat ryšys nustatytas tarp vingilių tankumo ir tirta baseino (pabaseinio) bei nuolydžio tyrimų atkarpoje (atitinkamai $r=0,43$ ir $r=0,31$). Todėl detaliau nagrinėtas tik pastarųjų dviejų veiksnių poveikis nęgių paplitimui Lietuvos upių sistemose.

Vidutiniai daugiamečiai vingilių tankumai nustatyti upių baseinuose (pabaseiniuose) 2007–2013m. reikšmingai skyrėsi (Kruskal-Wallis ANOVA, H_6 , $192=83,6$, $p < 0,001$) ir varijavo nuo $1,9 \pm 3,2$ ind./m² (\pm SD) Pajūrio upių baseine iki $32,6 \pm 8,5$ ind./m² (\pm SD) pajūrio Šventosios baseine. Tjukio daugkartinių lyginimų metu nustatyta, jog pagal daugiametį vingilių tankumą labiausiai išsiskyrė Pajūrio upių ir pajūrio Šventosios baseinai. Vidutinis vingilių tankumas Pajūrio upių baseine buvo reikšmingai mažesnis nei Minijos ($p < 0,001$), Žeimenos ($p < 0,001$), Merkio ($p < 0,001$), Šventosios ($p=0,03$) ir pajūrio Šventosios ($p < 0,001$) baseinuose ar pabaseiniuose. Tuo tarpu pajūrio Šventosios baseinas pasižymėjo didesniu vingilių gausumu, lyginant su Pajūrio upių ($p < 0,001$), Minijos ($p < 0,001$), Neries ($p < 0,001$), Žeimenos ($p < 0,001$) ir Merkio ($p=0,04$) baseiniais ar pabaseiniais. Taip pat didesnis gausumas nustatytas Žeimenos

($p < 0,001$) ir Merkio ($p < 0,001$) pabaseiniuose atitinkamai, lyginant su Pajūrio upių ir Minijos pabaseiniais.

Vertinant upių sistemas (išskyrus pajūrio Šventąją), stebima tendencija, kad giliau žemyninėje dalyje esantys upių baseinai (pabaseiniai) pasižymi didesniu vingilių tankumu. Atskirai vertinant upių sistemas, kuriose daugiausiai aptinkamos *L. planeri*, nustatytas gerokai didesnis vidutinis vingilių tankumas Merkio pabaseinyje, palyginus su Žeimenos pabaseiniu. Todėl, jei *L. fluviatilis* atveju stebimas Vakarų-Rytų gradientas, tai *L. planeri* atveju, stebimas Šiaurės-Pietų gradientas.

Detaliau lyginant išskirtų nuolydžio klasių poveikį vingilių gausumui, nustatyta, kad vingilių gausumas reikšmingai skiriasi nuo nuolydžio klasės (*one-way ANOVA*; $F=6,3$, $p < 0,001$). Vingilių gausumas pirmos nuolydžio klasės upių atkarpose buvo mažesnis nei antros, trečios ir ketvirtos klasės upių atkarpose (*post hoc Tukey HSD*, visų $p < 0,01$). Vertinant vingilių gausumo ryšio stiprumą su nuolydžiu naudota dalinė Pirsono koreliacija atsižvelgiant į duomenų pasiskirstymą baseinuose. Kaip ir daugialypės regresijos atveju, nustatyta silpnas, tačiau didesnis ryšys tarp vingilių gausumo ir nuolydžio ($r=0,4$).

Vienas iš veiksnių, galinčių riboti vingilių paplitimą upėse, yra tinkamų nerštaviečių gausa. Vykdamas šį tyrimą iš viso buvo sugauti 537 *Lampetra* genties vingiliai, kurių ilgis buvo 22-163 mm (20 pav). K-vidurkių klasterinės analizės metu po 26 iteracijų ($F_{1;536} = 2084$, $p < 0,001$) buvo nustatyti šeši ilgių klasteriai. Nustatyti K klasteriai buvo panaudoti apskaičiuojant vingilių dydžių ribas kiekvienoje amžinėje grupėje. Nustatytos amžinės dydžių ribos iš esmės atitinka kitų autorių tyrimų rezultatus Lietuvos upėse (Virbickas *et al.* 1996) (3 lentelė).

Duomenys, surinkti Vieštovėje, Eketėje ir Šventosios upėse, buvo panaudoti, atrenkant vingilių sklaidos upėse aprašomuosius modelius atitinkamai mažoms ($R^2=0,81$, $F_{1;26}=92$; $p < 0,001$) ir vidutinio dydžio (Šventosios upės pavyzdžiu) upėms ($R^2=0,67$, $F_{1;96}=253$; $p < 0,001$) (5 ir 6 lentelės). Remiantis pritaikytais laipsniniais vingilių sklaidos modeliais (Ratkowsky 1983), *Lampetra* spp. nėgių vingiliai iki metamorfozės geba nukeliauti vidutiniškai (apskaičiuojant atstumą naudota viršutinė penktosios amžinės grupės riba $L = 127$ mm) $6,3 \pm 0,272$ km ($\pm SE$) vidutinio dydžio upėse iki $6,9 \pm 0,372$ km ($\pm SE$) mažose upėse.

Ribota sklaida gali būti viena pagrindinių priežasčių, kodėl vingilių tankumai skiriasi upėse. Nerštinių ruožų gausa ir išsidėstymas yra pagrindiniai veiksniai apsprendžiantys nėgių paplitimą Lietuvos upėse, o daugelio autorių rastas ryšys su vandens tėkmės greičiu ir grunto sudėtimi (Young & Kelso 1990, Ojutkangas *et al.* 1995, Beamish & Jebbink 1994, Beamish & Lowartz 1996, Almeida & Quintella 2002, Sugiyama & GoTo 2002) yra antraeilės svarbos veiksniai, kurie apsprendžia vingilių pasiskirstymą

mikrobuveinėse. Į disertacinio darbo metu gautus rezultatus būtina atsižvelgti, vykdant nęgių būklės monitoringą, nes, pasirenkant monitoringo vietas upėje atsitiktinai, egzistuoja didelė tikimybė, kad populiacijos būklė ir dydis nebus tinkamai įvertintos.

Nęgių rūšinės priklausomybės nustatymas. Atlikus tiriamų nęgių mtDNR NCR-I sekų ir iš GenBank duomenų bazės paimtų 611 bp ilgio sekų palyginamąją analizę, nustatyta, kad visų Pietryčių Baltijos regione sugautų *L. fluviatilis* ir *L. planeri* sekos grupuojasi kartu su kitų autorių į GenBank duomenų bazę deponuotomis sekomis, sudarydamos atskirą monofiletinę *Lampetra* genties grupę (7 pav.). Didžioji dalis rastų haplotipų aptinkami pavieniui atskirose upėse, tačiau 11 haplotipų rasta daugiau nei vienoje upėje. H3, H19 ir dažniausi H1, H5, H7, H11 (58% visos imties) haplotipai būdingi abiejų rūšių *L. fluviatilis* ir *L. planeri* individams. Remiantis šiuo žymeniu nustatytas genetinis atstumas tarp *L. fluviatilis* ir *L. planeri* buvo $0,4 \pm 0,2\%$ (\pm SE). Esant tokiems nedideliams skirtumams tikėtina, kad skirtingose upių sistemose Pirėnų pusiasalyje, Šiaurės jūros baseine ir Baltijos jūros baseine aptinkamos sėslios *L. planeri* nęgės kartu su migruojančiom *L. fluviatilis* rūšies nęgėm sudaro rūšių kompleksą. Nesant fizinių barjerų, šis kompleksas koegzistuoja tinkamose buveinėse.

Pažymėtina, kad tarp tirtų Lietuvos upėse sugautų nęgių taip pat aptikti keli individai, kurių sekos grupavosi kartu su Dunojaus baseino upėse aptiktomis *E. mariae* rūšies nęgėms būdingomis homologinėmis NCR-I regiono sekomis. Genetiniai atstumai tarp *L. fluviatilis* ir *E. mariae* bei *L. planeri* ir *E. mariae* buvo panašūs: tarp *E. mariae* ir *L. fluviatilis* buvo $6,1\% \pm 2,4$ (\pm SE), o tarp *E. mariae* ir *L. planeri* buvo $6,2 \pm 2,5\%$ (\pm SE). Esant tokiems tarprūšinio masto genetiniams atstumams tarp mtDNR NCR-I sekų, galima daryti prielaidą, kad Nemuno (Lietuvos teritorija) ir Šventosios upėse (Baltijos jūra) yra aptinkamas *E. mariae* porūšis, atskirtas kriptinių barjerų, ir dėl ilgalaikės geografinės izoliacijos genetiškai diferencijuotas nuo kitų *E. mariae* rūšies porūšių. Tačiau esant mažam šių nęgių aptinkamumo dažnumui, o rūšies nustatymui naudojant vienintelį molekulinį žymenį, daryti konkrečias išvadas dėl šių nęgių sisteminės padėties problematiška. Papildomi mtDNR cyt *b* geno tyrimai vis dėlto patvirtino prielaidą, jog Lietuvoje taip pat aptikti *E. mariae* individai.

MtDNR cyt *b* homologinių sekų filogenetinėje ML analizės metu konstruojant dendrogramą nęgių sekos sugrupuotos (8 pav.) į dvi pagrindines kladas, iš kurių pirmąją reprezentuoja Pietryčių Baltijoje sugauti *L. fluviatilis* ir *L. planeri* bei iešmutinės nęgės *Lampetra (Eudontomyzon) lanceolata* individai, o antrąją – *Eudontomyzon* genties nęgės, kurioms priskirti ir Lietuvoje aptikti *E. mariae* haplotipai.

Pirmojoje kladoje greta dažniausiai aptinkamo cyt *b* haplotipo (atstovaujamo H26 haplotipo, 8 pav.) grupuojasi unikalių, tik Pietryčių Baltijoje aptinkamų mtDNR NCR-I haplotipų *L. fluviatilis* ir *L. planeri* atstovai, jų cyt *b* sekos identiškos arba pasižymi

minimaliu mutacijų skaičiumi (H6 ir H23), o nustatytas genetinis atstumas tarp *L. fluviatilis* ir *L. planeri* pagal mtDNR cyt *b* yra minimalus ($0,1 \pm < 0,01\%$ (\pm SE)).

Tyrimų metu aptiktas *E. mariae* haplotipas identiškas Ukrainoje Ivankos upėje (GQ206162; Lang *et al.* 2009) ir Dunojaus upėje (AM051061; Espanhol *et al.* 2007) sugautų *E. mariae* individų haplotipams. Vidutiniai genetiniai atstumai, nustatyti lyginant *E. mariae* su *L. fluviatilis* bei su *L. planeri* pagal mtDNR cyt *b* geno sekas beveik nesiskyrė ir atitinkamai buvo $3,6 \pm 0,1\%$ (\pm SE) ir $3,7 \pm 0,1\%$ (\pm SE).

Nustatyti genetiniai atstumai tarp Baltijos jūros *L. fluviatilis* ir *L. planeri* yra labai nedideli: $0,4 \pm 0,2\%$ (\pm SE) ir $0,1 \pm < 0,01\%$ (\pm SE), atitinkamai, naudojant mtDNR NCR-I ir cyt *b* genetinius žymenis. Johns ir Avise (1998) lygindami genetinius atstumus tarp dvyninių rūšių nustatė, kad, naudojant mtDNR cyt *b* žymenį, 90% atvejų genetiniai atstumai yra didesni nei 2% (Walker 1999). Tačiau disertaciniame darbe nustatyti genetiniai atstumai tarp *L. fluviatilis* ir *L. planeri* buvo mažesni nei nustatytas 2% kriterijus. Gauti rezultatai nesutampa su naujausiais Mateus *et al.* 2013b *L. planeri* ir *L. fluviatilis* tyrimų rezultatams, gautiems antros kartos Illumina RADseq sekoskaitos metodu. Toks neatitikimas galimas dėl Pirėnų pusiasalio kaip refugiumo vaidmens per paskutinius apledėjimus. Jame išlikusios simpatrinės *L. planeri* ir *L. fluviatilis* populiacijos turėjo pakankamai ilgą evoliucinį laikotarpį diverguoti į savarankiškas rūšis. Ši teiginį dalinai patvirtina tos pačios mokslininkų grupės (Mateus *et al.* 2013b) atlikti tyrimai, kurių metu kitame Tagus upės intake – Nabao upėje, aprašyta nauja mokslui sėkli nėgių rūšis *Lampetra auremensis*. Todėl, nesant papildomų mtDNR rezultatų, negalima atmesti prielaidos, kad tyrimui buvo panaudoti *L. auremensis* ar kitame Tagus intake aptinkamos alopatriinės *L. planeri* populiacijos individai, galintys pretenduoti į savarankiškos rūšies statusą.

MtDNR NCR-I sekų genetinė įvairovė. Siekiant įvertinti nėgių genetinės diferenciacijos reiškinį kontinentiniu mastu, buvo palyginta *Lampetra* spp. nėgių diferenciacija tarp skirtingų Europos geografinių regionų. Tirtos Rytų Baltijos upės apjungtos į bendrą Baltijos jūros imtį, nėgių iš Reino ir Garrone upių molekulinį žymenų tyrimų duomenys apjungti į Šiaurės jūros ir Biskajos įlankos imtį (Pereira *et al.* 2010), o Pirėnų pusiasalio Sao Pedro, Sado ir Mondego upėse sugautos nėgės apjungtos į bendrą Pirėnų pusiasalio imtį (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013). Tarp Baltijos jūros ir Šiaurės jūros bei Biskajos įlankos populiacijų nustatyta vidutinio intensyvumo ($F_{ST} < 0,08$), o tarp Baltijos jūros ir Pirėnų pusiasalio – intensyvi diferenciacija ($F_{ST} < 0,18$) (4 lentelė). Natūralu, jog, didėjant geografiniam atstumui tarp tiriamų populiacijų, didėja ir diferenciacija tarp jų. Tačiau stebina nustatyta labai intensyvi diferenciacija tarp Pirėnų pusiasalio ir Šiaurės jūros bei Biskajos įlankos nėgių ($F_{ST} < 0,3$), kuri galimai gauta lyginant neproporcingas individų skaičiumi imtis. Gauti duomenys indikuoja, kad

tarp geografiškai nutolusių populiacijų genų mainų intensyvumas yra žemas bei suteikia pagrindo išskirti skirtingas populiacijas paplitimo areale.

Tiriant *Lampetra* spp. nėgių diferenciaciją Baltijos jūros mastu, nustatyta, jog bendru atveju genetinė diferenciacija tarp Rytų Baltijos baseino upėse aptinkamų *Lampetra* spp. nėgių populiacijų nėra arba ji yra silpnai išreikšta ($F_{ST} < 0,05$) (5 lentelė). Vienintelė šiame regione išsiskiria Ventos upės populiacija, kurioje genetinės diferenciacijos intensyvumas priklausomai nuo lyginamų porų kinta nuo vidutinės ($0,05 < F_{ST} < 0,15$) iki labai intensyvios ($F_{ST} > 0,25$). Realiausias veiksnys, lemiantis šios nėgių populiacijos diferenciaciją, yra neįveikiama natūrali kliūtis – Ventos slenkstis (lat. *Ventas rumba*), dėl kurios didžioji Ventos upės dalis yra izoliuota. Išskyrus šią išimtį, galima teigti, kad tyrimo metu analizuotos *Lampetra* genties atstovų subpopuliacijos Baltijos jūros baseine formuoja panmiksine populiaciją, o siekiant atskleisti subtilesnius genetinius skirtumus tarp skirtingų Baltijos jūros upių baseinų nėgių populiacijų būtina pasitelkti jautresnius molekulinis žymenis ir metodus.

Molekulinių tyrimų analizė leidžia teigti, jog tarp sėslių ir migruojančių *Lampetra* spp. populiacijų iki šiol vyksta genų mainai, kuriuos palaiko intensyvi *L. fluviatilis* individų migracija tarp Rytų Baltijos upių. Todėl galima manyti, jog *L. fluviatilis* rūšiai nebūdingas natalinio homingo reiškinys, o priešnerštinė migracija į upes vyksta atsitiktinai ir priklauso nuo suaugėlių lokalizacijos prieš prasidedant nerštinei migracijai

***L. fluviatilis* ir *L. planeri* rūšių mtDNR NCR-I haplotipų tinklas.** Siekiant išsiaiškinti galimas priežastis, dėl kurių genetinės diferenciacijos skaičiavimai tarp įvairių lyginamų *Lampetra* spp. imčių porų parodė genetinės diferenciacijos nebuvimą tiriamose rūšyse, buvo nuspręsta panagrinti *Lampetra* genties genetinę įvairovę ir evoliuciją. *L. fluviatilis* ir *L. planeri* MP haplotipų tinklas sukonstruotas iš 243 abiejų rūšių nėgių mtDNR NCR-I sekų, jos buvo nustatytos disertacinio darbo bei kitų autorių tyrimų (Pereira *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2013) metu, pateiktas 9 pav.

Siekiant supaprastinti haplotipų tinklo analizę, remiantis metodinėje disertacinio darbo dalyje aprašytais haplogrupių identifikavimo principais, visos *Lampetra* spp. artimų haplotipų sekos sugrupuotos į penkių mtDNR NCR-I MJ haplogrupių tinklą. Haplotipų tinklo konfigūracija indikuoja, kad *Lampetra* genties nėgių populiacinė-genetinė struktūra pasižymi keliomis aiškiai išreikštomis genetinėmis linijomis, paplitusiomis visoje Europoje (A, D ir E haplogrupės) (10 pav.). Labiau tarp nustatytų haplogrupių išsiskyrė B ir C haplogrupės. B haplogrupė išskirtinai aptikta tik Baltijos jūroje. Ši haplogrupė neturi gerai išreikšto centrinio haplotipo, todėl tikėtina, jog į šią genetinę liniją sujungta dėl klimato kaitos ciklų Šiaurės Europoje anksčiau nepriklausomai besiformavusių, tačiau dalinai sunykusių linijų atstovai. C haplogrupei priskirtas vienintelis haplotipas (H35) ir kaip, B haplogrupės atveju, gali būti sunykusios linijos atstovas.

Gauti duomenys atskleidžia Pirėnų pusiasalio, kaip refugiumo svarbą, iš kurio atsitraukus ledynui, *Lampetra* spp. atstovai rekolonizavo Šiaurinius Europos vandenis. Visos tyrime panaudotos Pirėnų pusiasalį reprezentuojančių nėgių sekos priklauso izoliuotoms *L. planeri* populiacijoms. Dėl šios priežasties Sado, Sao Pedro ir Mondego upėse genų mainai tarp *L. planeri* ir *L. fluviatilis* negalimi, o kiekvienoje upėje fiksuota skirtinga A, D ar E haplogrupė. Remiantis haplogrupių paplitimu Europoje, galime teigti, kad Europos vandenys, nepriklausomai viena nuo kitos, rekolonizavo skirtingos Pirėnų pusiasalio populiacijos.

***L. planeri*, *L. fluviatilis* ir *E. mariae* in situ hibridizacijos tyrimai.** Siekiant išsiaiškinti hibridizacijos galimybes tarp abiejų nėgių gyvenimo strategijų natūraliomis sąlygomis, Šventosios (Baltijos jūra), Blendžios ir Salanto upių 2012 05 05 – 2012 05 26, o taip pat ir Musės, Salanto ir Šventosios (Baltijos jūra) upių 2013 04 20 – 2013 05 13 neršto ruožuose, buvo atliekami *L. planeri* ir *L. fluviatilis* kryžminimo eksperimentai. Pasirinktuose ruožuose buvo žinomos tik *L. planeri* ir *L. fluviatilis* nėgių rūšys, todėl visos mažesnio dydžio nėgės *a priori* priskirtos *L. planeri*. Atlikus molekulinis tyrimus paaiškėjo, kad 2012 m. Blendžios upėje kryžmintos ♂ *E. mariae* × ♀ *L. fluviatilis* rūšių nėgės. Iš viso bendruose nerštiniuose lizduose buvo sugautos 36 nėgės (23 – *L. fluviatilis*, 12 – *L. planeri* ir 1 – *E. mariae*). Pirmaisiais tyrimų metais (2012 m.) visuose lizduose sugauti *L. fluviatilis* ir *L. planeri* patinai ir patelės. Antraisiais metais (2013 m.) *L. planeri* patelių Musės ir Blendžios upėse nesugauta, todėl kryžminimas atliktas tik tarp galimų kombinacijų. Abejais tyrimų metais nerštiniuose lizduose dominavo *L. fluviatilis*, o *L. planeri*/*L. fluviatilis* santykis lizduose kito 0,35–0,45. Bendras abiejų rūšių patelių ir patinėlių santykis buvo panašus: *L. fluviatilis* jis kito 0,45–0,55, o *L. planeri* – 0,25–0,71.

Iš viso tyrimų laikotarpiu išsiriti 246 lervos, kurių 16 buvo ♂ *L. planeri* × ♀ *L. fluviatilis* ar ♂ *L. fluviatilis* × ♀ *L. planeri* hibridai, 18 ♂ *E. mariae* × ♀ *L. fluviatilis* ir 212 *L. fluviatilis* lervos grupėje, kurios buvo naudojamos kaip kontrolinė grupė (6 lentelė). Išsiritusių lervų skaičius dėžutėse gana smarkiai kito nuo 1 iki 148, tačiau remiantis šiais duomenimis negalima spręsti apie hibridų išgyvenamumą. Siekiant, kad eksperimento sąlygos maksimaliai atspindėtų natūralias, nebuvo naudotos jokios priemonės ikrų lipnumui pašalinti, o nėgių lytiniai produktai išspausti tiesiai į inkubacijos dėžutes. Dėl šios priežasties tikslus ikrų skaičius inkubacinėse dėžutėse nebuvo nustatytas, tačiau vertinant vizualiai jis galėjo svyruoti nuo kelių dešimčių iki kelių tūkstančių ikrų. Lervų išsiritimas stebėtas po 21 inkubacijos dienos. Vėliau lervos dar 41 dieną laikytos dėžutėse, stebint jų išgyvenamumą. Per šį laikotarpį nepastebėtas hibridų mirtingumas, tad eksperimento metu neatskleistas hibridų mirtingumo padidėjimas pradinėse nėgių gyvenimo stadijose.

Remiantis molekuliniais metodais ir kryžminimo eksperimentais, *L. fluviatilis* ir *L. planeri* Baltijos jūros regione, kaip ir gyvenančio sėsčiai margojo upėtakio (*Salmo trutta*) bei praeivio šlakio (*Salmo trutta*) atvejais, gali būti laikomos sėsčiai ir migruojančia nominalios rūšies formomis. Toks gyvenimo strategijų išsiskyrimas, gali būti vienu iš būdų užtikrinti genų mainus tarp skirtingų migruojančios formos kohortų, kurios į nerštavietes migruoja vienodo amžiaus. Kita vertus, tai vienas iš būdų užtikrinti sėslių formų genetinės įvairovės palaikymą, kuomet migruojančios nėgės atlieka vektoriaus funkciją, papildydamos sėslias populiacijas naujais genais.

NATURA2000 tinklo buveinių apsaugai svarbių teritorijų įvertinimas. Lyginant 2008 m. ir 2012–2013 m. tyrimų periodus (7 lentelė), matome, kad 7 BAST bendras nėgių apsaugos statusas pagerėjo arba pirmą kartą buvo nustatyta kaip tinkamas. Vis dėlto 6 BAST apsaugos būklė suprastėjo. Vienoje BAST teritorijoje statusas išliko nepakankamas, trys pirmą kartą buvo identifikuotos kaip nepakankamos ar blogos apsaugos statuso teritorijos bei taip pat trijose apsaugos statusas iš tinkamo tapo netinkamu. Toks statuso pasikeitimas gali būti paaiškintas skirtingų metodų taikymu 2008 m. ir 2012–2013 m. Šventojoje, Širvintoje ir Siesartyje. Šiose upėse 2008 m. taikytas vizualinis tyrimų metodas, kuomet upinių nėgių gausumas vertintas pagal nerštinių lizdų kiekio rezultatus, pakeistas upinių nėgių vingilių tankumo tyrimais. Taikant skirtingus tyrimo metodus, tiesioginis rodiklių palyginimas tarp abiejų laikotarpių negalimas. Lyginimas įmanomas tik lyginant bendrą apsaugos statuso pokytį (16 lentelė). Šiuo atveju, apsaugos statusas pasikeitė visose tirtose upėse iš tinkamo į pakankamą arba netinkamą.

Stebima tendencija nėra palanki nėgių populiacijų būklės atžvilgiu, ypač turint galvoje tai, kad pokyčiai buvo vertinami apsaugai skirtose teritorijose. Vis dėlto tokią tendenciją reikia vertinti atsargiai, kadangi *L. fluviatilis* būklės vertinimo metodika minėtuoju laikotarpiu keitėsi. Taip pat būtina atsižvelgti į tai, kad Lietuvoje nustatyto vingilių tankumo kriterijaus reikšmė yra labai aukšta. Šiuo metu šis kriterijus tenkinamas tik ypatingose susikaupimo vietose, t.y. žemiau nerštaviečių.

IŠVADOS

1. Pagal šiuo metu priimtą sistematiką, Lietuvos upėse aptinkamos keturios nėgių rūšys: nereguliariai užklystanti *P. marinus*, dažnos *L. fluviatilis* ir *L. planeri* ir naujai aptikta *Eudontomyzon mariae*.
2. Skirtinguose Lietuvos upių baseinuose nėgių *Lampetra* spp. paplitimas ir populiacijų tankumas skiriasi. Labiausiai nėgės paplitusios Neries, Šventosios ir Šventosios (Baltijos jūros intakas) upių sistemose. Gausiausia populiacija rasta Šventosios (Baltijos jūros intakas) baseine, o mažiausiu gausumu ir paplitimu pasižymėjo Pajūrio upių baseinas.
3. Nėgių gausumui turi įtakos skirtingų upių baseinų ar pabaseinių hidrologinis ir hidromorfologinis savitumas ($r=0,43$) bei nuolydis tirtose upių atkarpose ($r=0,4$), kuris apsprendžia reprodukcijai tinkamų buveinių skaičių ir hidrologines sąlygas jose.
4. Dėl sąlyginai nedidelės vingilių sklaidos upėse (6,3–6,9 km iki metamorfozės pradžios), atstumas iki nerštaviečių yra vienas iš esminių veiksnių darančių įtaką skirtingam vingilių amžinių grupių paplitimui (įvairaus dydžio upėse $0,88 < r < 0,9$) ir fiksuojamam gausumui..
5. Naudojant NCR-I ir cyt *b* mtDNR molekulinis žymenis, tarp pietryčių Baltijos regione aptinkamų *L. fluviatilis* ir *L. planeri* atitinkamai nustatyti $0,4 \pm 0,2$ % (\pm SE) ir $0,1 \pm <0,01$ % (\pm SE) genetiniai atstumai, kurie buvo identiški nustatytiems vidurūšiniams atstumams.
6. Naudojant mtDNR NCR-I molekulinį žymenį, nustatyta, jog *Lampetra* spp. nėgės Pietryčių Baltijos regione pasižymi panašia genetinė įvairove kaip ir kituose tirtuose Europos geografiniuose regionuose aptinkamos nėgės, o šių nėgių populiacinei-genetinei struktūrai būdingos kelios gerai išreikštos linijos, kurias reprezentuoja išskirtos A, D ir E haplogrupės.
7. Tarp Baltijos jūros *Lampetra* spp. populiacijos ir kitų Europos teritoriniuose vandenyse aptinkamų populiacijų nustatyta vidutiniškai ar intensyviai išreikšta genetinė diferenciacija ($0,08 < F_{ST} < 0,18$), o tarp pietryčių Baltijos jūros *Lampetra* spp. populiacijų genetinės įvairovės skirtumai yra nežymūs ($0 < F_{ST} < 0,02$). Juos lemia menka reprodukcinė izoliacija tarp skirtingų nėgių populiacijų. Šiame regione išsiskiria izoliuota Ventos baseino *L. planeri* populiacija, kuri pasižymi didesniais genetinės įvairovės skirtumais nuo kitų regiono nėgių populiacijų ($0,09 < F_{ST} < 0,3$).

ARTICLES ON THE SUBJECT OF THE THESIS

Staponkus, R. & Kesminas, V. (2014). Status assessment of lampreys in Natura 2000 network in Lithuania. *Biologija*, 60(1):1-7.

Staponkus, R., Butkauskas D., Kesminas V., Sruoga A. (2014). Investigation into genetic variability of parasitic and non-parasitic lampreys inhabiting western rivers in Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika*, 68(90): 77- 83.

Staponkus, R. & Kesminas, V. (2014). Confirmation on hybrids of river lamprey *Lampetra fluviatilis* and brook lamprey *Lampetra planeri* from *in situ* hybridisation experiment in lowland rivers of Lithuania. *Polish Journal of Natural Sciences*, Vol 29(1): 49-54.

ABSTRACTS OF CONFERENCE REPORTS

Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos 2011. Lietuvos nęginių apskritažiomenių būklės pokytis per 50 metų ir „ankstyvo perspėjimo“ monitoringo metodikos tobulinimas.

11th International Congress on the Biology of Fish 2014. Investigation into genetic variability of parasitic and non-parasitic lampreys inhabiting western rivers in Lithuania.

CURRICULUM VITAE

Name and Surname: Robertas Staponkus.

Date and Place of birth: 7th August 1985, Kaunas, Lithuania

Education: In 2004, I finished Vytautas Magnus gymnasium in Klaipėda and entered the Faculty of Natural Sciences (FNC) of Vilnius University (VU) where I studied according to the Biology program (61201B105). In 2008, I graduated from Vilnius University with a Bachelor's Degree in Biology. In 2010, I completed the studies according to the Zoology program (62101B105) at the FNC of VU and obtained a Master's Degree in Zoology. The same year I started my PhD studies according to the Ecology and Environmental Research program (03 B) and joined the Nature Research Centre (NRC). I prepared the thesis at the Laboratory of Molecular Ecology of NRC.

Work experience: Since 2008 an employee at the Laboratory of Ecology and Physiology of Hydrobionts at the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

Research interests: Ichthyology and molecular ecology. Particular, investigation into the anthropogenic influence on the formation of the population genetic structure of commercially exploited fish species.

Contacts: Laboratory of Ecology and Physiology of Hydrobionts, Address: the Institute of Ecology of Nature Research Centre, Vilnius, 98 Verkiai Str., LT- 08406.

E-mail: robertas.staponkus@gmail.com