

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

Adomas Ragauskas

**INVESTIGATION INTO POPULATION GENETIC STRUCTURE OF EEL *ANGUILLA  
ANGUILLA* (L.) AND PERCH *PERCA FLUVIATILIS* L. WITHIN THE CONTEXT OF  
ANTHROPOGENIC ACTIVITY**

Summary of doctoral thesis

Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences (03B)

Vilnius, 2013

This thesis was prepared during the period between 2008-2013 at the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

Scientific Supervisor:

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

Scientific Consultant:

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

The thesis will be defended at the Vilnius University Council of Ecology and Environmental Research:

*Chairman:*

Prof. Dr. Habil. **Juozas Rimantas Lazutka** (Vilnius University, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

*Members:*

Prof. Dr. **Virginijus Sruoga** (Lithuanian University of Educational Sciences, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

Dr. **Vesta Skrodenytė-Arbačiauskienė** (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 – 03B)

Prof. Dr. Habil. **Saulius Petkevičius** (Lithuanian University of Health Science, Academy of Veterinary, Agricultural Sciences, Veterinary Medicine – 02A)

*Opponents:*

Prof. Dr. **Algimantas Paulauskas** (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Dr. **Tomas Virbickas** (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B)

The thesis will be defended at the public meeting of the Council of Ecology and Environmental Research on June 20, 2013 at 2 p.m. in the Conference Hall of the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

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

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

Date of mailing the thesis: 17 May 2013

The thesis is available at the libraries of Institute of Ecology of Nature Research Centre and Vilnius University.

**GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS  
VILNIAUS UNIVERSITETAS**

Adomas Ragauskas

**UNGURIO *ANGUILLA ANGUILLA* (L.) IR EŠERIO *PERCA FLUVIATILIS* L.  
POPULIACINĖS-GENETINĖS STRUKTŪROS TYRIMAI ANTROPOGENINIO  
POVEIKIO KONTEKSTE**

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

Vilnius, 2013

Disertacija rengta 2008 – 2013 metais Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute.

Darbo mokslinis vadovas:

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

Mokslinis konsultantas:

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

Disertacija bus ginama Vilniaus universiteto Ekologijos ir aplinkotyros krypties taryboje:

*Pirmininkas:*

Prof. habil. dr. **Juozas Rimantas Lazutka** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

*Nariai:*

Prof. dr. **Virginijus Sruoga** (Vilniaus edukologijos universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Dr. **Vesta Skrodenytė-Arbačiauskienė** (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

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

Prof., habil. dr. **Saulius Petkevičius** (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarinė medicina – 02A)

*Oponentai:*

Prof. dr. **Algimantas Paulauskas** (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Dr. **Tomas Virbickas** (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Disertacija bus ginama viešame Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties tarybos posėdyje 2013 m. birželio mėn. 20 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: 2013. 05. 17.

Disertaciją galima peržiūrėti Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto ir Vilniaus universiteto bibliotekose.

## INTRODUCTION

**Relevance of the study.** In order to create a sustainable exploitation of populations of the commercially valuable fish species with the aim to protect their genetic resources, it is necessary to gather a great mass of data based on the population genetic structure of such fish species (Laikre *et al.* 2005a). The most common definition of population genetic structure is the distribution pattern of genetic diversity within and between populations. The formation of this structure depends on processes that occur during fish spawning. Differently from the Hardy-Wainberg theoretical model wild populations in each of their generations have relative volatility of population genetic structure due to the fact that frequencies of alleles and genotypes in wild population are unstable. An exhaustive examination of population genetic structure gives the opportunity to create the strategy of sustainable exploitation of resources at a genetic diversity level (Hauser & Carvalho 2008) and preserve the genetic diversity of the species (Laikre *et al.* 2008). Unfortunately, investigations into the field of population genetics of many fish species are either very fragmentary or they are not carried out at all nowadays. In addition, the fish resources management plans do not always take into account the already existing data about the population genetic structure of exploited fish species.

Quite recently two genetic studies of representatives of *Salmo* genus have been initiated in Lithuania (Leliūna 2008, Samuilovienė 2012). These studies increased our knowledge about the impact of artificially reared individuals, which were later stocked in Lithuanian water bodies, on the formation of the population genetic structure of the commercially exploited fish species. The subject of this thesis associated with the European eel *Anguilla anguilla* (L.) research differs from the previous genetic studies of salmonid fish species in two aspects. Firstly, differently from the spawning of salmon that of the eel takes place not in the locations where eels were stocked but in the Sargasso Sea because the eel is a catadromous fish species. Secondly, due to the fact that eels stocking is based on catching of young eels in one geographic location followed by releasing them for rearing into water bodies located in other geographic location the eels were introduced to represent a part of the natural eel population. Because of these two aspects the investigations that aim at clarifying the impact of stocking on the formation of the population genetic structure of the eel are complicated. Since *Anguilla* spp. stocking is not restricted to the introduction of various young eels in just one continent, nowadays the natural distribution of several species of *Anguilla* genus, including *A. anguilla*, is changed.

Alongside the research of freshwater eels, the Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. as a species, which is prevalent in the continent, was additionally investigated in this thesis. This was done in order to reveal the peculiarities of formation of the population genetic structure of the

commercially exploited fish species, which were affected by the different types of anthropogenic impacts. Differently from the freshwater eels, peculiarities of the population genetic structure of Eurasian perch was studied in natural dwellings of Lithuanian and Latvian inland water bodies. The newly obtained data were compared with the data obtained by previous studies of this species (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999, Sruoga *et al.* 2007b). The accumulated data on the perch mtDNA D-loop region make it possible to reveal the phylogeographic patterns specific to this species in the Baltic States.

Due to several objective reasons main attention in this work was devoted to mtDNA research. Despite the fact that great progress in genetic investigations into the European eel has recently been achieved using DNA microsatellite markers, much less attention has been given to the studies of the population genetic structure of the eel using mtDNA markers. Prior to undertaking this thesis two articles (Lintas *et al.* 1998, Daemen *et al.* 2001), whose results were based on the eel mtDNA D-loop region and *cyt b* research, were published. It is worth mentioning that the conclusions about the panmixia hypothesis in this species that the authors drew were contrary to each other. In addition, investigations based on the eel DNA microsatellites analysis are insufficiently informative to clarify the intraspecific evolution of this species. Therefore, population genetic studies, which are based on the analysis of the European eel mtDNA sequences, are relevant and important today. The newly established DNA sequences of the studied fish species obtained when carrying out the thesis were combined with the data obtained by other researchers. This decision gave us the opportunity to carry out our investigations at a global level. The examination of the analogous mtDNA sequences of the different species makes it possible to compare the levels of genetic diversity, ascertain other important genetic parameters of the populations and expand our knowledge about the population genetic structure of the commercially exploited fish species.

#### **Scientific innovation of the study:**

1. Identification of *A. anguilla* and *A. japonica* species based on discriminating the eel samples of uncertain origin using the originally constructed primer pair Ang1 designed for amplification of partial D-loop sequences was applied for the first time.
2. The genetic diversity of European eel was comprehensively studied in Lithuania and Latvia using DNA microsatellites and mtDNA molecular markers for the first time.
3. The comparison of the genetic diversity of the eel groups naturally recruited and introduced to Lithuania and Latvia was made for the first time.

4. The population genetic structure of the perch inhabiting Lithuanian and Latvian water bodies was comprehensively studied using the mtDNA D-loop region molecular marker for the first time.
5. The impact of Ignalina Nuclear Power Plant on formation of the population genetic structure of perch using molecular DNA markers was studied for the first time.

**Scientific and practical significance.** Today European eel is considered to be a critically endangered species. Despite the fact that during the last decades this species has been comprehensively studied, at the present time we still lack basic knowledge of the life cycle, the intraspecific evolution, spawning grounds, reproduction, the population genetic structure and behaviour of this fish. The results of the thesis that are based on the eel mtDNA molecular markers are relevant and important to a better understanding of the population genetic structure and the intraspecific evolution. Besides, they are important from the practical point of view because new data from the genetic studies can be of use to the protection of this species by creating sustainable exploitation plans. For instance, the comparison of parameters of the genetic diversity of the eel groups naturally recruited (ATPL) and introduced (INTR) to Lithuania and Latvia provides a background for eel management and provides solutions of the issues related to the eel stocking. Creating and applying a new molecular approach to the identification of *A. anguilla* and *A. japonica* species also increases the practical importance of the work.

The thesis also reveals phylogeographic patterns of the Eurasian perch in the Baltic States. The collected molecular data revealed a more comprehensive picture of the perch genetic diversity and are of importance to the analysis of changes in the genetic diversity that may have been caused by the anthropogenic activity.

**The objective and tasks of the study.** The main objective of the study is to examine the intraspecific genetic diversity of *A. anguilla* and *P. fluviatilis* species using DNA microsatellite and mtDNA markers seeking to assess a possible anthropogenic impact on the formation of the population genetic structure of the commercially exploited fish species. The following tasks were set to achieve this objective:

1. To determine the eel species from the samples of uncertain origin using originally constructed primer pair that was designed for studying the *A. anguilla* mtDNA D-loop region.
2. To ascertain parameters of the intraspecific genetic diversity of the eel using DNA microsatellite and mtDNA D-loop region and *cyt b* markers.

3. To evaluate a possible stocking impact on the formation of the population genetic structure of the eel by comparing the genetic diversity between the eel groups naturally recruited and introduced to Lithuania and Latvia.
4. To ascertain the genetic diversity of the perch inhabiting Lithuanian and Latvian water bodies using the mtDNA D-loop region molecular marker.
5. To compare the genetic diversity of the perch populations inhabiting the Baltic States and other European countries.
6. To ascertain parameters of the genetic diversity of the perch populations inhabiting Lithuanian and Latvian water bodies and compare it with the respective data of the perch population in Lake Drūkšiai in order to evaluate the possible anthropogenic impact on the formation of population genetic structure.

**Statements to be defended:**

1. The originally developed primer pair designated to amplify the mtDNA D-loop region enables a reliable discrimination of *A. anguilla* and *A. japonica* species to be made.
2. Based on DNA microsatellite and mtDNA studies the population genetic structure of the eel is characterized by a genetic mosaic, which is formed due to the existence of reproductively isolated groups.
3. Based on mtDNA markers the statistically significant genetic differentiation between the eel groups naturally recruited and introduced to Lithuania and Latvia has not been determined.
4. The eels living in different lakes of Lithuania are characterized by a different genetic diversity according to DNA microsatellite and mtDNA markers.
5. The perch populations inhabiting the inshore zone and the western part of Lithuania and Latvia are characterised by a different genetic diversity in comparison to the perch populations inhabiting the eastern continental part of both countries.
6. Prevalence of the representatives of haplogroup B of the mtDNA D-loop region is characteristic of the perch population inhabiting the continental part of the Baltic states but it is rare in other European regions.

**Scientific approval and publications.** The results of the present study were published in 4 scientific articles and 5 abstracts of international conferences reports. In total, 5 oral and one poster presentations have been made on the subject of the thesis at the conferences that took place in Lithuania, Latvia, Taiwan.



**Structure of the thesis.** The thesis consist of the following chapters: Abbreviations, Introduction, Literature review, Material and methods, Results and Discussion, Conclusions, Reference list, Articles on the subject of the Thesis, Abstracts of conference reports, Acknowledgements, Appendix. Without Appendix the number of the thesis is 165 pages, it contains 33 tables and 26 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 to my scientific supervisor Dr. (Hb.) Dalius Butkauskas, the staff of the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre, scientific consultant Dr. Vytautas Kesminas, all co-authors of scientific publications, people who collected fish samples, my family and friends. I express my sincere gratitude to the board of managers of the Institute of Ecology of the Nature Research Centre for the opportunity to begin and finish my PhD studies. Warm thanks goes to Dr. C. L. Nesbø and Dr. K. S. Jakobsen for corresponding and sharing their data, *i.e.* correct sequences of previously detected different haplotypes of the *Perca fluviatilis* mtDNA D-loop region. I am also grateful to the staff of the Laboratory of Marine Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre for cooperation.

This work would have been impossible to carry out without the financial support from the Mutual Fund of Lithuania, Latvia and Taiwan (Republic of China), the Research Council of Lithuania, the Lithuanian State Studies Foundation and the Ministry of Education and Science.

## LITERATURE REVIEW

In this chapter the author reviews research subjects, *i.e.* the European eel and the Eurasian perch, their population genetics, the population genetic structure of fishes and their types, the anthropogenic impact on the formation of the population genetic structure of commercially exploited fish species and microsatellite DNA and mtDNA markers.

## MATERIAL AND METHODS

**Sampling.** In the course of work a a total of 221 eels and 262 perch were analysed. All studied eels were yellow eels or silver eels. Some part of the eels was obtained from the Klaipėda Customs Office when the shipment of 25 t of eels was arrested in the Sea Port of Klaipėda in the autumn of 2009. The supplier claimed that all frozen fish in the cargo were Japanese eels. The remaining eels, as well as the perch, were caught in various locations in

Lithuania and Latvia. Detailed information about the collected fish samples is presented in Table 1.

Table 1. Location, time and sample size of fishes that were used for research.

1 lentelė. Tyrimams panaudotų žuvų sugavimo vieta, laikas, mėginių skaičius.

Species	Location / Coordinates / Code	Sampling Time	Sample Size
<i>Anguilla anguilla</i> <sup>▲</sup>	Lake Balsys / 54° 47' 43" N, 25° 19' 6" E / <b>BAL</b>	07-2009	30
	Baltic Sea (near Šventoji) / 56° 1' 31" N, 21° 4' 54" E / <b>BJ</b>	07-2005	40
	Lake Dringis / 55° 22' 11" N, 26° 5' 57" E / <b>DRI</b>	09-2004	8
		08-2006	15
	United Kingdom (Coast of England) / <b>UK</b>	2007	1
	Curonian Lagoon / 55° 21' 0" N, 21° 12' 0" E / <b>KM</b>	07-2004	8
		07-2006	10
	Gulf of Riga / 57° 20' 0" N, 23° 7' 0" E / <b>RĪ</b>	09-2005	14
Lake Siesartis / 55° 13' 9.24" N, 25° 29' 25.54" E / <b>SIE</b>	01-2006	20	
	05-2006	21	
	03-05-2010	23	
<i>A. japonica</i> <sup>●●</sup>	Unknown <sup>●</sup>	10-2009	31
<i>Perca fluviatilis</i>	Lake Babites / 56° 55' 23" N, 23° 45' 1" E / <b>BAB</b>	06-2010	24
	Lake Cirīšu / 56° 8' 0" N, 26° 58' 0" E / <b>CIR</b>	2011	38
	Lake Drūkšiai / 55° 37' 17" N, 26° 36' 21" E / <b>DRŪ</b>	06-2009	45
		06-2010	8
	Lake Kālezers / 56° 51' 44" N, 25° 49' 42" E / <b>KĀL</b>	07-2010	24
	Lake Metelys / 54° 17' 51" N, 23° 46' 18" E / <b>MET</b>	10-2010	19
	Nemunas River (Lower part) / 55° 12' 10.8" N, 21° 30' 50.4" E / <b>NEM</b>	06-2009	14
		09-2010	18
	Neris River (near Nemenčinė) / 54° 51' 43.64" N, 25° 24' 4.70" E / <b>NER</b>	07-2009	10
		07-2010	6
Lake Plateliai / 56° 2' 50" N, 21° 51' 23" E / <b>PLA</b>	08-2010	20	
Lake Svantes / 55° 51' 0" N, 26° 21' 0" E / <b>ŠŽ</b>	2011	36	

● – samples of fish tissues were obtained from the Klaipėda Customs Office when custom officers requested to determine the species of the frozen eels individuals of uncertain origin; ●● – it was declared by supplier that the eels belonged to *A. japonica* species; ▲ – the eels caught in Lithuania and Latvia were preliminary ascribed to *A. anguilla* species because the available data indicated that the stocking activity in Lithuania was based on European eels.

Based on the data of *A. anguilla* otolith research (Shiao *et al.* 2006, Lin *et al.* 2007) the eels caught in the Baltic Sea, the Curonian Lagoon and the Gulf of Riga were ascribed to naturally recruited (ATPL) eel group, while eels samples from Lake Balsys, Lake Dringis and Lake Siesartis represented introduced (INTR) eel group.

**Primer pairs Ang1 and Ang2 designed for the molecular analysis of the eel.** The characteristics of the primer pairs designed for the amplification of different mtDNA regions is presented in Table 2.

Both primer pairs were designed in the Laboratory of Molecular Ecology based on a comparative analysis of *Anguilla* spp. mtDNA sequences that were deposited in the GenBank using Primer3 program (Rozen & Skaletsky 2000).

Table 2. The characteristics of the primer pairs designed for the amplification of different mtDNA regions.

2 lentelė. MtDNR regionų amplifikacijai skirtų pradmenų charakteristikos.

Species	Region	Primer Pair	Primer Sequences (5'-3')	T <sub>m</sub> , °C	bp
<i>Anguilla anguilla</i>	D-loop	Ang1•	F: tcggttttgaatccgaaga R: ccaaagccagtaatagttcatttta	59 59	610
	cyt <i>b</i>	Ang2	F: tggcaaacctacgaaaaacc R: aagtggaatgcaagaatcg	57 57	547

• – This primer pair was also used for the amplification of *A. japonica* D-loop region.

**Procedures in the laboratory.** DNA was extracted from frozen or ethanol preserved muscle tissues using the previously described method (Aljanabi & Martinez 1997) with slight variations. DNA amplification of eels was carried out using the Ang1 and Ang2 primer pairs, originally constructed in the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre, and AF237898, AF237899, AF237900, AF237901, AF237902 primer pairs (Wirth & Bernatchez 2001). The perch mtDNA D-loop region amplification was carried out using the HV2 and CSB-D primer pair (Nesbø *et al.* 1998a). DNA sequencing was carried out in the Sequencing Centre of the Institute of Biotechnology and in the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

**The determination of eel species.** In order to determine the species of eels, which were obtained from the Klaipėda Customs Office or caught in various locations in Lithuania and Latvia, it was decided to conduct a phylogenetic analysis of DNA sequences. The eel species were determined by constructing the UPGMA dendrogram (Michener & Sokal 1957), which is based on the alignment of mtDNA D-loop region sequences of the eels of uncertain origin together with 450-455 bp length *A. anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata* sequences deposited in the GenBank under accession numbers AJ225953, AJ225956, AJ225969, AM997243, AM997253, AM997255, AM997258, M95867, AB030662, AP007249. The construction of UPGMA dendrogram was carried out using CLC Sequence Viewer 5.1.1 ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)) program.

**Statistical analysis of *A. anguilla* DNA microsatellites.** Relative sizes of alleles in all loci were determined by examining DNA fragments in electrophoretograms. For this purpose TotalLab v1.10 (Amersham Biosciences) program was used and for the purpose of comparing the available results of DNA sequencing of the chosen European eel individuals were used. Genetic distances (Nei 1972) were calculated using TFGA v1.3 (Miller 1997) program. F statistics (F<sub>ST</sub>, F<sub>IS</sub> and F<sub>IT</sub>) (Cockerham 1973, Weir & Cockerham 1984) and significance levels of genetic differentiation, *i.e.* genic differentiation (Raymond & Rousset 1995a) and genotypic

differentiation (Goudet *et al.* 1996), were calculated using GENEPOP (Raymond & Rousset 1995b, Rousset 2008) program.

**MtDNA sequence analysis.** A total of 229 sequences whose length was 493 bp were used for the sequence analysis of the European eel mtDNA D-loop region. Out of these 229 sequences 148 sequences were established during work (the sequences of the different haplotypes are deposited in the GenBank under FJ707255-FJ707280 and JX162682-JX162753 accession numbers), while 81 sequences were deposited in GenBank by the previous researchers.

A total of 201 sequences whose length was 392 bp were used for the sequence analysis of the European eel mtDNA *cyt b*. Out of these 201 sequences 82 sequences were established during the work (currently the sequences of the different haplotypes are not available in the GenBank), while 119 sequences were deposited in GenBank by the previous researchers.

A total of 807 sequences whose length was 389-400 bp were used for the sequence analysis of the perch mtDNA D-loop region. Out of these 807 sequences 262 sequences were established during the work (the sequences of the different haplotypes are deposited in the GenBank under HM992571-HM992578 and JX034742-JX034749 accession numbers), whereas 545 sequences were established by the previous researchers (Nesbø *et al.* 1998b (in total 66 sequences), Refseth *et al.* 1998 (in total 109 sequences), Nesbø *et al.* 1999 (in total 313 sequences), Sruoga *et al.* 2007b (in total 56 sequences) and one sequence that was deposited in the GenBank (EF118012)).

The alignment of DNA sequences of the studied fish species and the construction of NJ trees (Saitou & Nei 1987) was carried out using CLC Sequence Viewer 5.1.1 and/or MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) programs. DNA sequences were aligned using ClustalW (Higgins *et al.* 1994) algorithm when MEGA 4 program was used.

The number of polymorphic sites in the DNA ( $S$ ), a total number of mutations ( $\eta$ ), the haplotype diversity ( $h$ ) (Nei 1987), nucleotide diversity ( $\pi$ ) (Lynch & Crease 1990), the average number of nucleotide differences ( $K$ ) (Tajima 1983), the divergence between groups of sequences as measured by the uncorrected average number of nucleotide substitutions per site between populations ( $K_{XY}$ ) (Nei 1987) and the fixation index ( $\Phi_{ST}$ ) (Hudson *et al.* 1992b) with the significance levels of genetic differentiation ( $p$ ) (Hudson *et al.* 1992a) were estimated using the DNASP 4.50.3 program (Rozas *et al.* 2003). All deletions were considered as the 5th position (A, C, G, T, -), but sequences that had > 5 bp length deletions were removed from the analysis when calculations using DNASP 4.50.3 program were made.

Haplotype networks were constructed using the median joining (MJ) algorithm (Bandelt *et al.* 1999) that was installed in the NETWORK 4.6.1.0 program (www.fluxus-engineering.com/). In order to simplify the haplotype network that consisted of the European eel mtDNA D-loop region sequences it was decided to use the additional maximum parsimony (MP) algorithm (Polzin & Daneshmand 2003) that was also installed in the NETWORK 4.6.1.0 program. The construction of the complex haplotype network that comprised the European eel mtDNA D-loop region sequences was based on the additional DNA Alignment 1.3.1.1. program, whereas the data for constructing other haplotype networks was entered manually in the NETWORK 4.6.1.0 program. While constructing haplotype networks all positions with gaps were included into the analysis but mtDNA sequences, which had > 5 bp length deletions, were eliminated from the analysis. Based on the haplotype networks related mtDNA sequences were combined together to haplogroups. 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 sequences representing different haplotypes, the haplotype frequency, the number of mutational steps, which separates several rare haplotypes from the haplotype with greater frequency that connects them all.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Molecular investigations of *Anguilla anguilla*

**The determination of the eel species.** DNA amplification based on Ang1 primer pair, which was designed for the amplification of the mtDNA D-loop region of the European eel, was successful using all available eels samples. After the investigated eel sequences and homologous mtDNA D-loop region sequences (450-455 bp length) collected from GenBank have been aligned it has become clear that all the investigated sequences of the eel caught in Lithuania and Latvia belonged to *A. anguilla* species and all investigated sequences of the eel obtained from Klaipėda Customs Office belonged to *A. japonica* species. The investigated eel sequences were attributed to particular species based on their individual groupings with established *A. anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata* sequences in UPGMA dendrogram. In Fig 1 sequences of the eels obtained from Klaipėda Customs Office are grouped with the sequences belonging to *A. japonica* species forming a separate cluster that is separate from other two clusters of sequences that represent *A. anguilla* and *A. rostrata* species. In this figure four sequences (GenBank: FJ707257, FJ707264, FJ707265, FJ707273) that belong to *A. anguilla* cluster were established during the work and represent the European eels caught in Lithuania and Latvia.

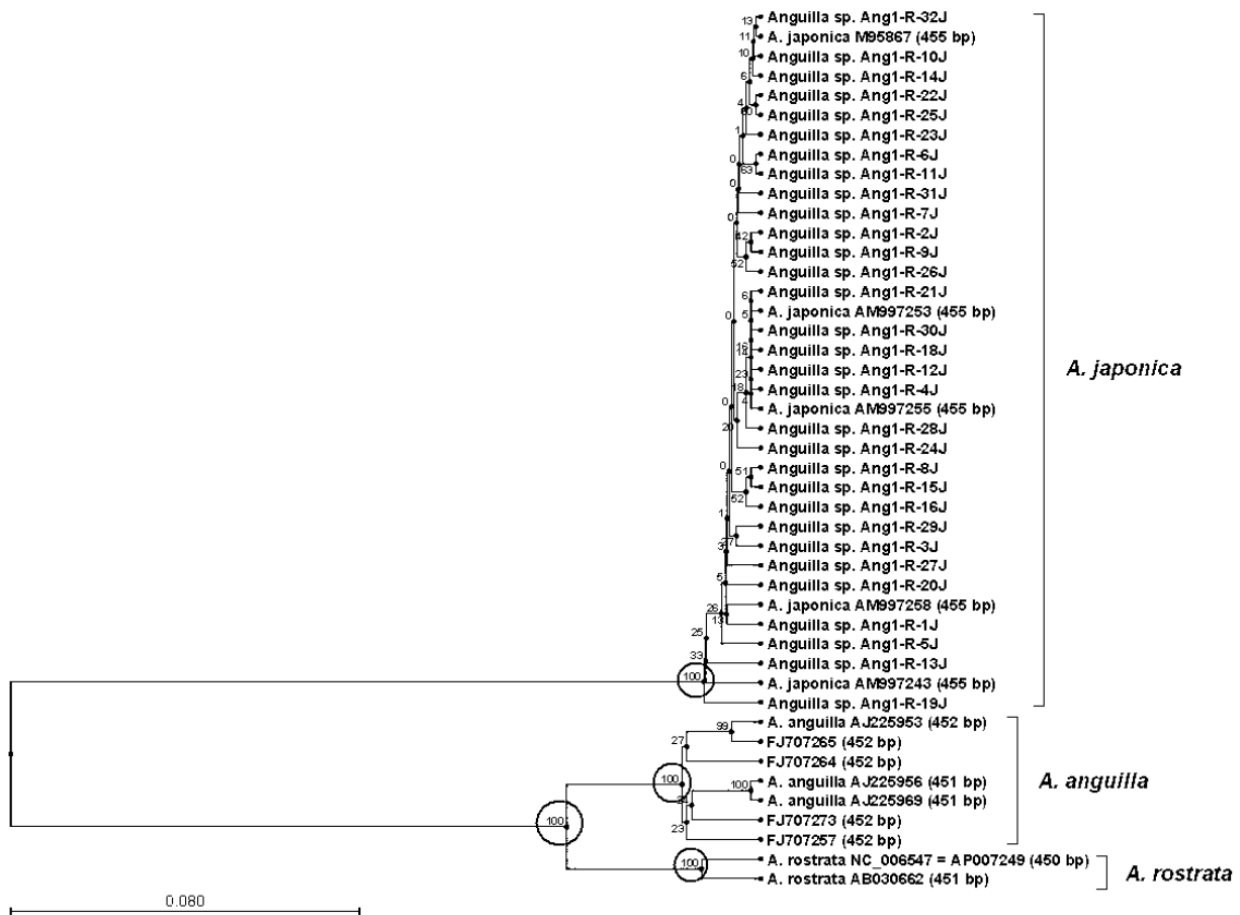


Fig. 1. UPGMA dendrogram constructed on the basis of homologous sequences (450-455 bp length) of mtDNA D-loop region of *A. anguilla*, *A. rostrata* and *A. japonica* species and 35 investigated eels of uncertain origin (FJ7072<sup>••</sup>; *Anguilla* sp. Ang1-R<sup>•••</sup>).

1 pav. Žinomų rūšinės priklausomybės individų, priklausančių *A. anguilla*, *A. rostrata* ir *A. japonica* rūšims bei 35 tiriamojo unguorio (FJ7072<sup>••</sup>; *Anguilla* sp. Ang1-R<sup>•••</sup>) mtDNR D-kilpos regiono 450-455 bp ilgio homologinių sekų pagrindu sukonstruota UPGMA dendrograma.

**Analysis of DNA microsatellites.** After microsatellite analysis of 114 European eels has been completed the smallest number of alleles was detected in the *Ang101* locus (7 alleles), while the greatest number of alleles was detected in the *Aro121* locus (13 alleles). 9, 8 and 11 alleles were determined in the *Aro063*, *Ang151* and *Ang114* loci, respectively. The results of the analysis (Table 3) that was based on all available eel samples obtained from Lithuania and Latvia revealed a slight but statistically significant genetic differentiation ( $F_{ST} = 0.0084$ ,  $p < 0.01$ , both by genic and genotypic differentiation). Statistically significant genetic differentiation between ATPL and INTR groups of the eels was not determined (Analysis III). Slight but statistically significant genetic differentiation between the samples of the eels caught in Lake Dringis and Lake Siesartis was determined (Analysis IV;  $F_{ST} = 0.0157$ ,  $p < 0.01$ , both by genic and genotypic differentiation). The obtained values of  $F_{IS}$  and  $F_{IT}$  of different analyses were similar.

Table 3. Obtained values of F statistics ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  ir  $F_{IT}$ ) between different comparisons of the eel samples based on DNA microsatellite data.

3 lentelė. Apskaičiuotos *A. anguilla* DNR mikrosatelitų F statistikos ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  ir  $F_{IT}$ ) vertės tarp įvairių lyginamų imčių kombinacijų.

Analysis	N	I	Comparisons of Samples	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$
I	8	114	BJ2005 / KM2004 / KM2006 / RĲ2005 / DRI2004 / DRI2006 / SIE2006a / SIE2006b	0.0084 ●● ▲▲	0.2514	0.2577
II	5	114	BJ2005 / KM / RĲ2005 / DRI / SIE	0.0049 ●● ▲	0.254	0.2576
III	2	114	ATPL / INTR	0.0014	0.2563	0.2573
IV	2	64	DRI / SIE	0.0157 ●● ▲▲	0.2555	0.2672

Genic differentiation: ● –  $p < 0.05$ , ●● –  $p < 0.01$ ; Genotypic differentiation: ▲ –  $p < 0.05$ , ▲▲ –  $p < 0.01$ ; BJ2005 – eels caught in the Baltic Sea in 2005; KM2004 – eels caught in the Curonian Lagoon in 2004; KM2006 – eels caught in the Curonian Lagoon in 2006; RĲ2005 – eels caught in the Gulf of Riga in 2005; DRI2004 – eels caught in Lake Dringis in 2004; DRI2006 – eels caught in Lake Dringis in 2006; SIE2006a – eels caught in Lake Siesartis in 01-2006; SIE2006b – eels caught in Lake Siesartis in 05-2006; KM – eels caught in the Curonian Lagoon; DRI – eels caught in Lake Dringis; SIE – eels caught in Lake Siesartis; ATPL – eels naturally recruited to Lithuania and Latvia; INTR – eels that were introduced to Lithuanian lakes; N – the number of samples; I – total number of investigated eels.

**Genetic variability of mtDNA D-loop region sequences.** Values of  $\Phi_{ST}$  and  $p$  of different comparisons of the eel samples whose calculations were based on the available European eel mtDNA D-loop region data are presented in Table 4.

Table 4. Values of the fixation index ( $\Phi_{ST}$ ; below diagonal) and significance levels of genetic differentiation ( $p$ ; above diagonal) between different comparisons of the eel samples; these values were calculated using *A. anguilla* mtDNA D-loop region data.

4 lentelė. Genetinę diferenciaciją tarp įvairių ungurių imčių kombinacijų atspindinčio fiksacijos indekso  $\Phi_{ST}$  (žemiau įstrižainės) ir šio rodiklio patikimumo  $p$  (virš įstrižainės) vertės, nustatytos naudojant *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono duomenis.

n	ŠP	AVR	ŠJR	VJR	ATPL	INTR
ŠP	<b>96</b>	0.3636	-	0.4577	-	0.4093
AVR	-0.00014	<b>20</b>	0.3850	0.397	0.4073	0.5117
ŠJR	-	0.01103	<b>24</b>	0.3712	0.3455	0.3589
VJR	0.00809	0.00033	0.01074	<b>38</b>	0.4932	0.458
ATPL	-	-0.00603	-0.00689	0.00524	<b>72</b>	0.4471
INTR	-0.00444	-0.00302	-0.00671	0.00365	-0.00546	<b>75</b>

ŠP – hypothetical Northern eel population; AVR – Atlantic Ocean Region; ŠJR – North Sea Region; VJR – Mediterranean Sea Region; ATPL – eels naturally recruited to Lithuania and Latvia; INTR – eels that were introduced to Lithuanian lakes.

All these results clearly indicate that the investigated species is panmictic.

The haplotype network consisting of 229 *A. anguilla* mtDNA D-loop region sequences is presented in Fig. 2.

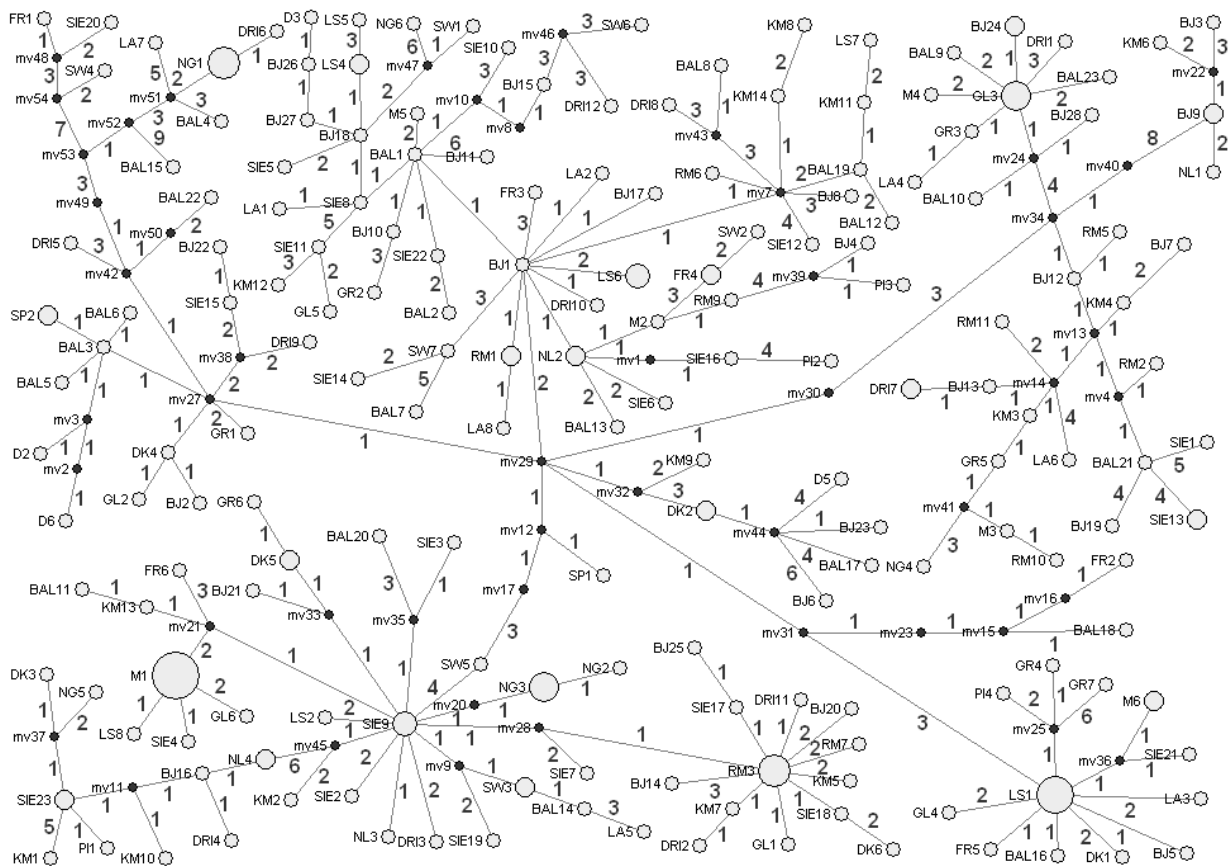


Fig. 2. MP haplotype network of 229 *A. anguilla* mtDNA D-loop region sequences: the numbers between nodes indicate mutational steps between the most related sequences; the radius of circles is proportional to the frequency of haplotypes; mv• – hypothetical sequences that were not found during the study but are important for the construction of haplotype network.

2 pav. *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono MP haplotipų tinklas, sudarytas iš 229 sekų: skaičiai tarp taškų parodo mutacinius žingsnius tarp artimiausių sekų; skritulių dydis proporcingas haplotipų aptikimo dažnumui; mv• – nenustatytos hipotetinės sekos, panaudotos konstruojant haplotipų tinklą.

Due to the fact that a large number of haplotypes makes the analysis of this haplotype network complicated, it was decided to connect the related sequences that share common ancestor to the haplogroups. The haplogroup network consisting of 47 European eel mtDNA D-loop region haplogroups is presented in Fig. 3. Using the earlier described principle all 47 European eel mtDNA D-loop region haplogroups can be grouped into different superhaplogroups (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L).

The results of the distribution of the European eel mtDNA D-loop region superhaplogroups in Europe are equivocal (Fig. 4). On the one hand the distribution of A, B, C, F, H and I superhaplogroups in all studied geographic regions supports the panmixia hypothesis in *A. anguilla* species. On the other hand noticeable genetic differences between the eels inhabiting the Mediterranean Sea Region and other geographic regions were determined. In fact, the representatives of D, E, G, J, K and L superhaplogroups were not found in the Mediterranean Sea Region. Based on a chaotic distribution of the representatives of different



superhaplogroups in Europe the conclusion can be drawn that the results of the thesis once again confirm that the population genetic structure of the investigated species is characterized by the genetic mosaic, which is formed due to existence of reproductively isolated groups.

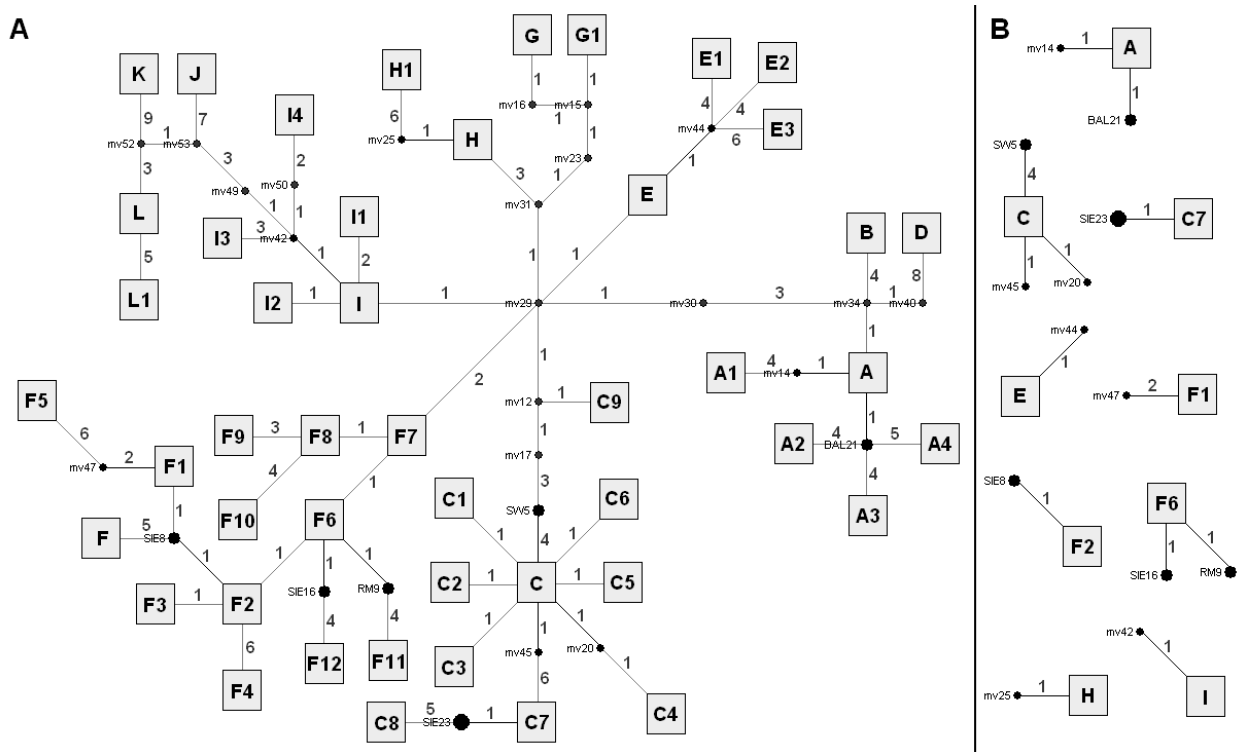


Fig. 3. MP haplogroup network of *A. anguilla* mtDNA D-loop region: **A** – links between 47 haplogroups; **B** – particular haplotypes or hypothetical sequences (mv) which are attributed to certain haplogroups; the numbers between squares and nodes indicate mutational steps.

3 pav. *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono MP haplogrupių tinklas: **A** – ryšiai tarp 47 haplogrupių; **B** – haplogrupės, kurių sudėtyje yra haplotipų ar hipotetinių sekų (mv), esančių jungiamąja grandimi su kitomis haplogrupėmis; skaičiai tarp kvadratų ir taškų parodo mutacinius žingsnius.

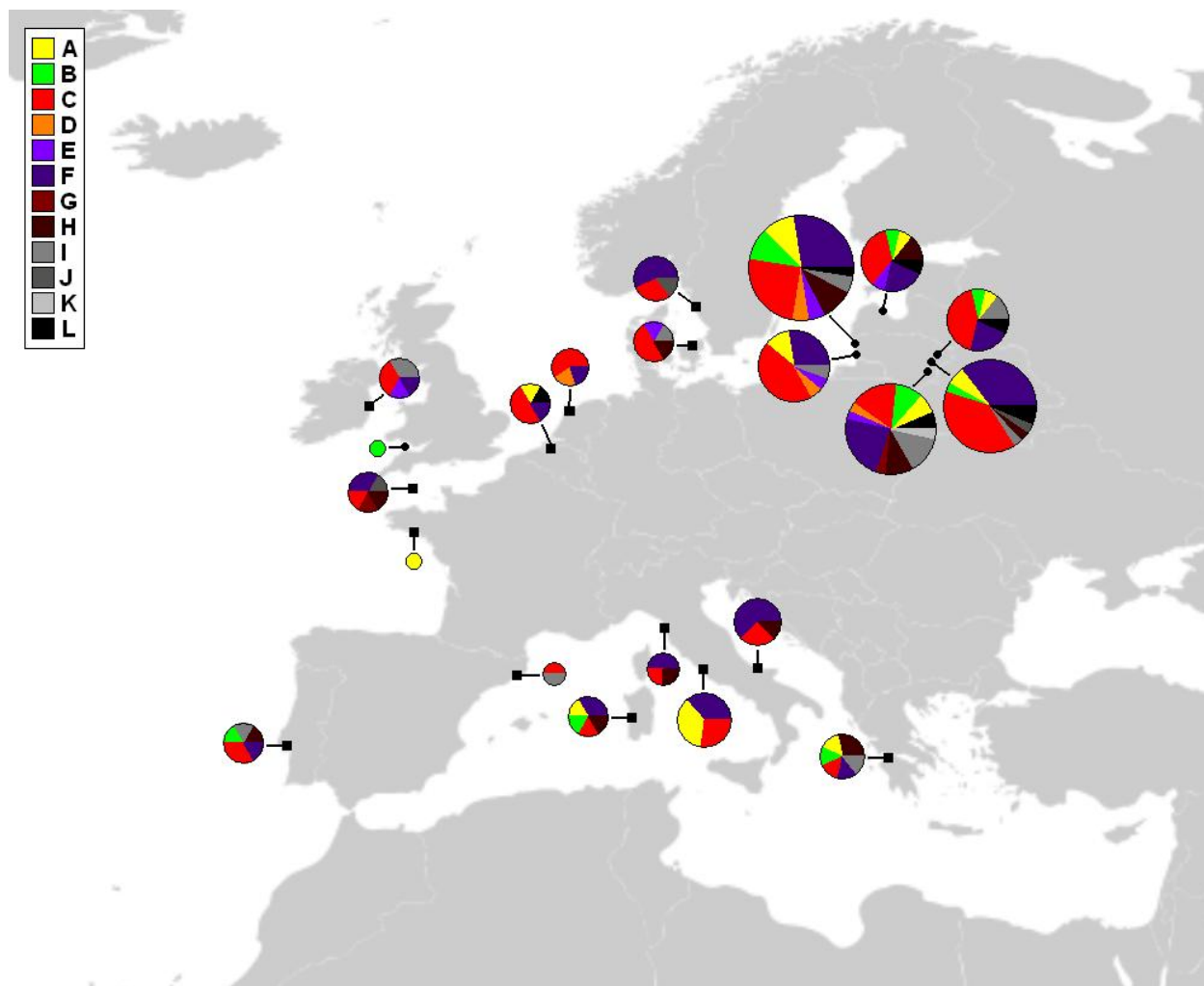


Fig. 4. The distribution of *A. anguilla* mtDNA D-loop region superhaplogroups in Europe: the eel samples collected during the earlier studies (Lintas *et al.* 1998, Minegishi *et al.* 2005 and unpublished investigation of Murgia R., Tola G., Hirano J. ir Archer S. N.) are indicated in squares, while the eel samples collected during the work are indicated in circles; the diameter of pie charts is proportional to the number of sequences (1-40 sequences).

4 pav. *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono superhaplogrupių paplitimas Europoje: kvadratais pažymėtos imtys reprezentuoja ankstesnių tyrimų duomenis (Lintas *et al.* 1998, Minegishi *et al.* 2005 ir nepublikuotas Murgia R., Tola G., Hirano J. ir Archer S. N. tyrimas), o apskritimais pažymėtos imtys yra šio disertacinio darbo duomenys; skritulinių diagramų diametras proporcingas sekų skaičiui imtyje nuo vienos iki 40 sekų.

**Genetic variability of mtDNA *cyt b* sequences.** A small but statistically significant genetic differentiation between ŠJR and AVR eel samples ( $\Phi_{ST} = 0.03831$ ,  $p = 0.0053$ ), as well as between ŠP and AVR eel samples ( $\Phi_{ST} = 0.02968$ ,  $p = 0.0251$ ), was determined using the data of mtDNA *cyt b* investigation (Table 5). It is worth mentioning that these results are different from those of the analogous analysis (Table 4) of the European eel mtDNR D-loop region, which clearly indicates that this species is panmictic. The available data presuppose that the determination of a statistically significant genetic differentiation could mainly be explained by genetic differences between ŠJR eels sample and other eels samples.

Table 5. Values of the fixation index ( $\Phi_{ST}$ ; below diagonal) and significance levels of genetic differentiation ( $p$ ; above diagonal) between different comparisons of the eel samples; these values were calculated using *A. anguilla* mtDNA *cyt b* data.

5 lentelė. Genetinę diferenciaciją tarp įvairių ungiurių imčių kombinacijų atspindinčio fiksacijos indekso  $\Phi_{ST}$  (žemiau įstrižainės) ir šio rodiklio patikimumo  $p$  (virš įstrižainės) vertės, nustatytos naudojant *A. anguilla* mtDNR *cyt b* duomenis.

<b>n</b>	ŠP	AVR	ŠJR	VJR	ATPL	INTR
ŠP	<b>69</b>	<b>0.0251</b>	-	0.6499	-	0.1431
AVR	<b>0.02968</b>	<b>72</b>	<b>0.0053</b>	0.3117	0.0596	0.3675
ŠJR	-	<b>0.03831</b>	<b>24</b>	0.2513	0.3428	0.0586
VJR	0.02055	0.02393	0.02868	<b>23</b>	0.5285	0.6039
ATPL	-	0.01982	-0.01416	0.00961	<b>45</b>	0.2367
INTR	0.01894	-0.086	0.02367	-0.00595	0.01104	<b>36</b>

Statistically significant ( $p < 0.05$ )  $\Phi_{ST}$  and  $p$  values are in bold; ŠP – hypothetical Northern eel population; AVR – Atlantic Ocean Region; ŠJR – North Sea Region; VJR – Mediterranean Sea Region; ATPL – eels naturally recruited to Lithuania and Latvia; INTR – eels that were introduced to Lithuanian lakes.

A total of 34 different haplotypes were detected in the haplotype network (Fig. 5) comprising 201 European eel mtDNA sequences. All these 34 haplotypes can be ascribed to one of nine haplogroups. The results of the distribution of *A. anguilla* mtDNA *cyt b* haplogroups in Europe and Northern Africa (Fig. 6) indicate that the eel samples, which represent the North Sea Region, differ from the eel samples collected in other geographic regions due to the fact that the representatives of haplogroup B were not found in the eel samples from the North Sea Region. The representatives of haplogroup B found in the Baltic Sea could have come here from Lithuanian lakes. The representatives of D and E haplogroups were not detected in the Mediterranean Sea Region. The representatives of haplogroup H were detected only in the eel samples from England and Lake Siesartis. The largest number (seven haplogroups) of different haplogroups was detected in the eel sample from the Baltic Sea.

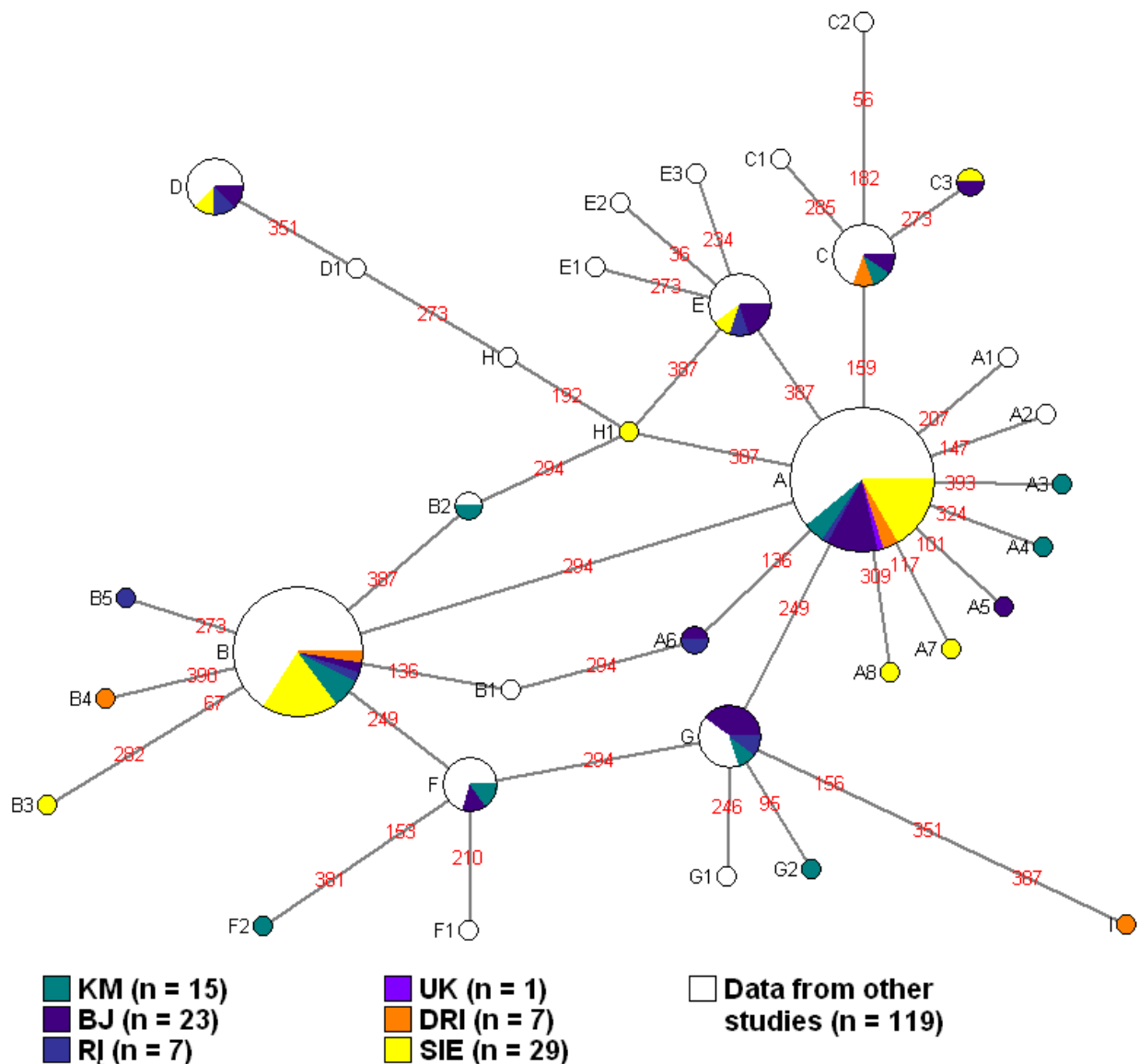


Fig. 5. MJ haplotype network of 201 *A. anguilla* mtDNA cyt *b* sequences: mtDNA cyt *b* sequences of eels caught in other European locations, as well as their frequency, are marked in white; the numbers between the nodes indicate mutational steps between the most related sequences; the radius of circles is proportional to the frequency of haplotypes; BJ – Baltic Sea; KM – Curonian Lagoon; RĹ – Gulf of Riga; UK – Coast of England; DRI – Lake Dringis; SIE – Lake Siesartis.

5 pav. *A. anguilla* mtDNR cyt *b* MJ haplotipų tinklas, sudarytas iš 201 sekos: baltai pažymėtos kitose Europos lokacijose sugautų ungurių mtDNR cyt *b* sekos bei jų dažnis haplotipų tinkle; skaičiai tarp taškų parodo mutacinius žingsnius tarp artimiausių sekų; skritulių dydis proporcingas haplotipų aptikimo dažnumui; BJ – Baltijos jūra; KM – Kuršių marios; RĹ – Rygos įlanka; UK – Anglijos pajūris; DRI – Dringio ež.; SIE – Siesarčio ež.

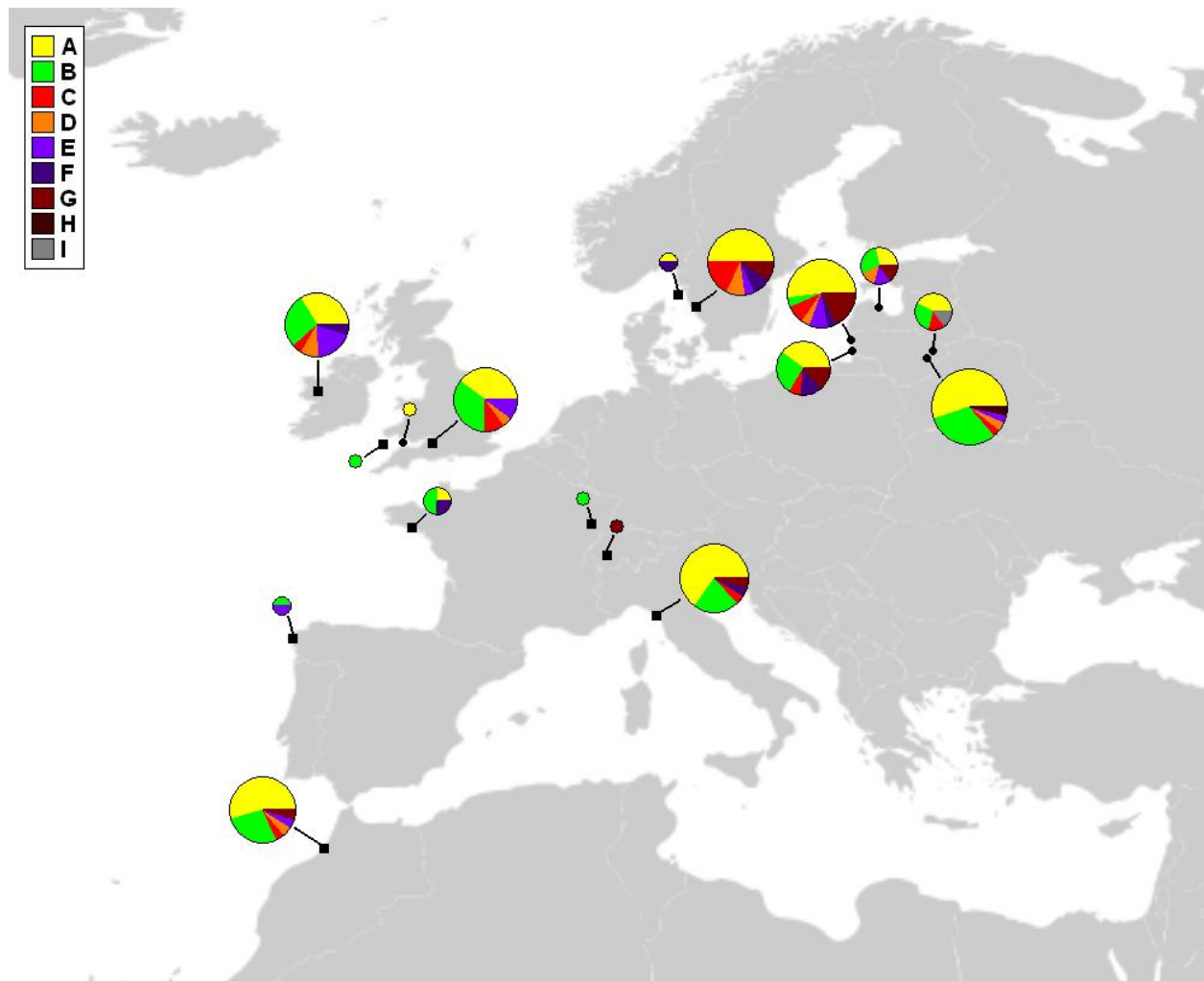


Fig. 6. The distribution of *A. anguilla* mtDNA *cyt b* haplogroups in Europe and Northern Africa: the eel samples collected during the earlier studies (Aoyama & Tsukamoto 1997, Wolf *et al.* 2000, Aoyama *et al.* 2001, Daemen *et al.* 2001, Lin *et al.* 2001, Minegishi *et al.* 2005 and data from GenBank (EF427617-EF427618, EU223996-EU223997, EU492326-EU492327)) are indicated in squares, while the eel samples collected during the work are indicated in circles; the diameter of pie charts is proportional to the number of sequences (1-29 sequences).

6 pav. *A. anguilla* mtDNA *cyt b* haplogrupių paplitimas Europoje ir šiaurės Afrikoje: maži kvadratai žymi imtis, surinktas ankstesnių tyrimų metu (Aoyama & Tsukamoto 1997, Wolf *et al.* 2000, Aoyama *et al.* 2001, Daemen *et al.* 2001, Lin *et al.* 2001, Minegishi *et al.* 2005 ir GenBank duomenys (EF427617-EF427618, EU223996-EU223997, EU492326-EU492327)), o apskritimais pažymėtos imtys yra disertacinio darbo duomenys; skritulinių diagramų diametras proporcingas sekų skaičiui nuo vienos iki 29 sekų.

### ***Perca fluviatilis* mtDNA D-loop region investigations**

Fig. 7 represents NJ tree, which is based on  $K_{XY}$  distances between different samples of the perch ( $K_{XY}$  distances were calculated using mtDNA D-loop region data obtained during the work and earlier Sruoga *et al.* (2007b) study) from Lithuania and Latvia. The arrangement of the perch samples in NJ tree reflects not only their geographic differences but also the similarity of the genetic diversity in those perch samples that were collected in the inshore zone or in the inland localities distributed close to the Baltic Sea. The perch sample of Lake Drūkšiai occupies

the intermediate position in the NJ tree that distinguishes this perch population from all other investigated perch samples.

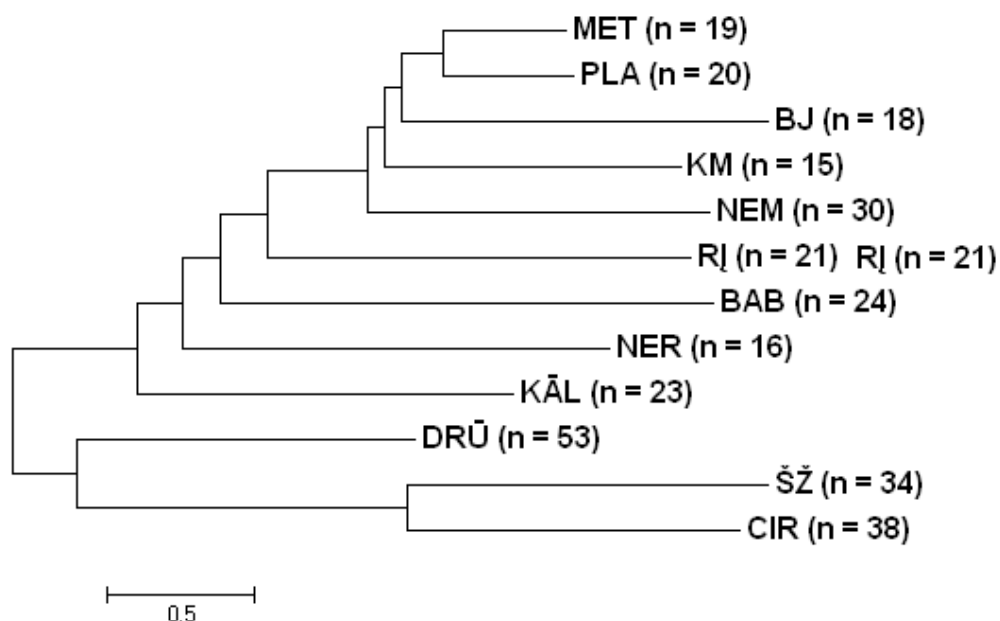


Fig. 7. NJ tree, based on  $K_{XY}$  distances between different samples of the perch from Lithuania and Latvia: BJ – Baltic Sea; KM – Curonian Lagoon; RĶ – Gulf of Riga; ŠŽ – Lake Sventes; BAB – Lake Babites; CIR – Lake Cirišu; DRŪ – Lake Drūkšiai; KĀL – Lake Kālezers; MET – Lake Metelys; NEM – Nemunas River; NER – Neris River; PLA – Lake Plateliai.

7 pav. NJ dendrograma pagrīsta  $K_{XY}$  atstumais tarp skirtingu Latvijas ir Lietuvas ešeriu imciu: BJ – Baltijos jura; KM – Kuršiu marios; RĶ – Rygos ūlanka; ŠŽ – Sventes ezeras; BAB – Babytēs ezeras; CIR – Cirišu (ezeras); DRŪ – Drūkšiai (ezeras); KĀL – Kālezers (ezeras); MET – Metelys (ezeras); NEM – Nemunas (upē); NER – Neris (upē); PLA – Plateliai (ezeras).

On the basis of  $\Phi_{ST}$  and  $p$  values of pairwise comparisons between all available perch samples that were collected in Lithuania and Latvia it could be stated that the genetic differentiation increases between the geographically distant perch samples. Very intensive ( $\Phi_{ST} > 0,25$ ) genetic differentiation between some perch samples was determined. However, statistically significant genetic differentiation was not determined between the perch samples from the Baltic Sea, the Curonian Lagoon, the Nemunas River, Lake Plateliai and Lake Metelys, representing the perch populations from the western and southern parts of Lithuania. The perch sample of Lake Drūkšiai was genetically different from all other perch samples that were investigated during the work.

The haplotype network of the perch mtDNA D-loop region consisting of 333 sequences established during the work and earlier studies (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999, Sruoga *et al.* 2007b), is presented in Fig. 8.

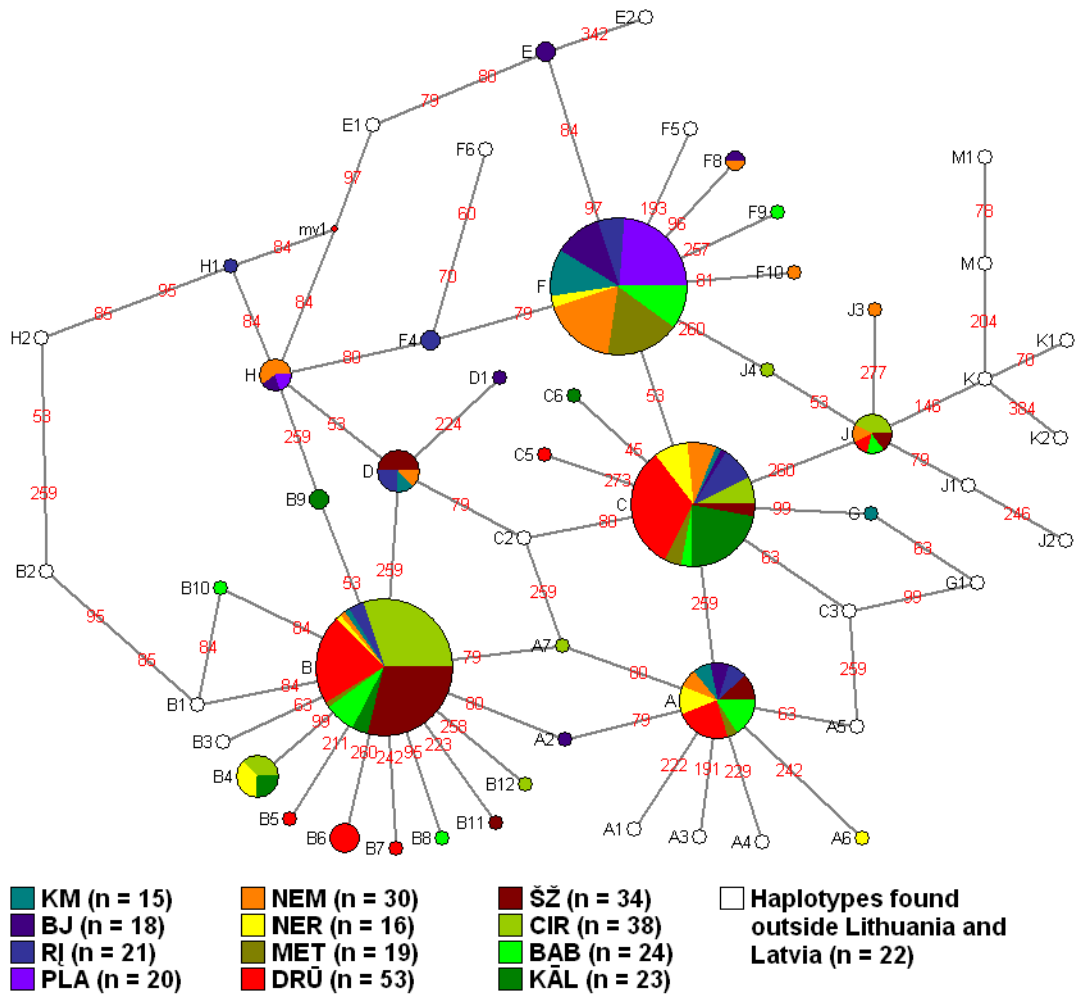


Fig. 8. MJ haplotype network of 333 *P. fluviatilis* mtDNA D-loop region sequences: white circles represent haplotypes found in the perch samples collected outside Lithuania and Latvia in other European countries (these haplotypes frequencies are not presented); the numbers between the nodes indicate particular sites of mutations; the radius of circles is proportional to the frequency of haplotypes; mv1 – hypothetical sequence that was not found during the study, but was important for the construction of haplotype network; BJ – Baltic Sea; KM – Curonian Lagoon; RĪ – Gulf of Riga; ŠŽ – Lake Svantes; BAB – Lake Babites; CIR – Lake Cirišu; DRŪ – Lake Drūkšiai; KĀL – Lake Kālezers; MET – Lake Metelys; NEM – Nemunas River; NER – Neris River; PLA – Lake Plateliai.

8 pav. *P. fluviatilis* mtDNA D-kilpos regiono MJ haplotipų tinklas, sudarytas iš 333 sekų: baltais apskritimais pažymėti haplotipai, kurie buvo nustatyti kitose Europos šalyse, tačiau neaptikti, tiriant Lietuvos ir Latvijos ešerių imtis (haplotipų tinkle tokių haplotipų dažnis yra nepateikiamas); skaičiai tarp taškų parodo konkrečias mutacijas; skritulių dydis rodo haplotipų aptikimo dažnumą; mv1 – hipotetinė seka, kuri nebuvo nustatyta tarp tiriamų sekų, bet buvo reikalinga konstruojant haplotipų tinklą; BJ – Baltijos jūra; KM – Kuršių marios; RĪ – Rygos įlanka; ŠŽ – Šventės ežeras; BAB – Babytės ežeras; CIR – Cirišu (ežeras); DRŪ – Drūkšiai (ežeras); KĀL – Kālezers (ežeras); MET – Metelys (ežeras); NEM – Nemunas (upė); NER – Neris (upė); PLA – Plateliai (ežeras).

Haplotypes B and F were the most frequent in Lithuania and Latvia. Each of them is represented by 80 perch mtDNA sequences. A total of 53 different haplotypes composes the haplotype network. Out of these 53 haplotypes, 17 haplotypes were determined the first time during the work. B5, B6, B7 and C5 haplotypes were determined exclusively in the perch sample from Lake Drūkšiai. Despite the fact that haplotype F was quite frequent in Lithuania, it

was not detected in the perch sample from Lake Drūkšiai and all other perch samples from Latvian lakes, except for the perch samples from Lake Babites. Although, this haplotype dominates in the perch populations that inhabit the water bodies situated not far from the Baltic Sea. Based on the principles applied to the identification of haplogroups, which are described in the material and methods section, all 53 haplotypes were attributed to nine perch mtDNA D-loop region haplogroups. The greatest genetic diversity (13 haplotypes) was determined in haplogroup B. The peculiarities of the distribution of the perch haplogroups found in the western and eastern parts of Lithuania and in the western and southeastern parts of Latvia are presented in Fig. 9.

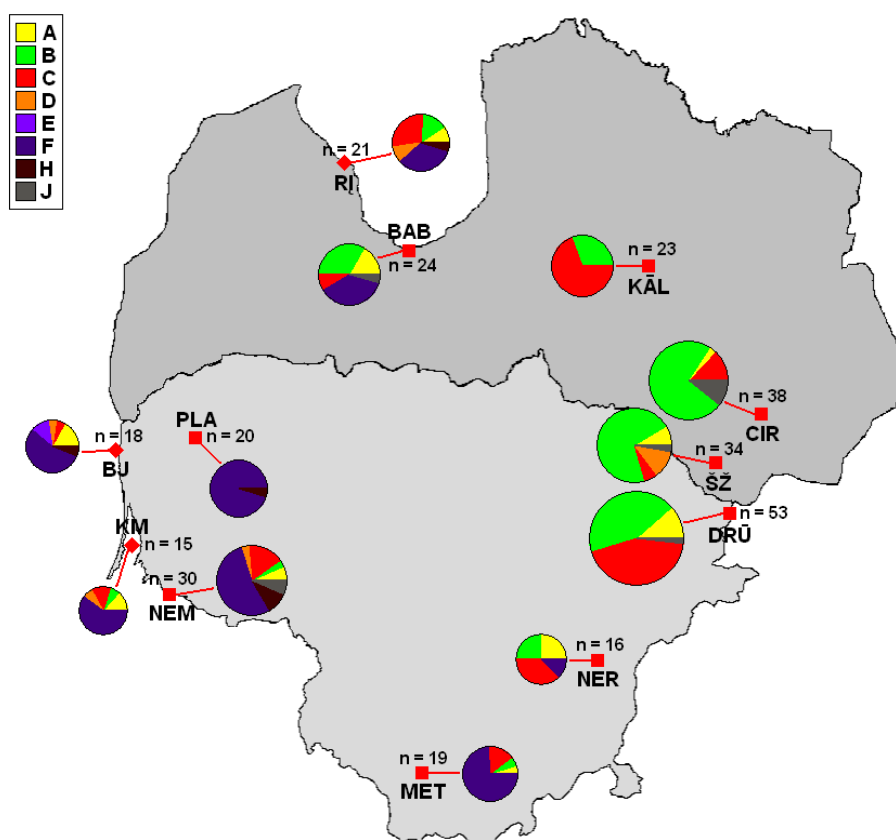


Fig. 9. The distribution of *P. fluviatilis* mtDNA D-loop region haplogroups among investigated water bodies of Lithuania and Latvia: the perch samples collected during the earlier Sruoga *et al.* (2007b) study are indicated in diamonds, while the perch samples collected during the work are indicated in squares; the diameter of pie charts is proportional to the number of sequences (15-53 sequences); BJ – Baltic Sea; KM – Curonian Lagoon; RĪ – Gulf of Riga; ŠŽ – Lake Sventes; BAB – Lake Babites; CIR – Lake Cirīšu; DRŪ – Lake Drūkšiai; KĀL – Lake Kālezers; MET – Lake Metelys; NEM – Nemunas River; NER – Neris River; PLA – Lake Plateliai.

9 pav. *P. fluviatilis* mtDNR D-kilpos regiono haplogrupių paplitimas tirtuose Lietuvos ir Latvijos vandens telkiniuose: rombais pažymėtos imtys surinktos ankstesnio Sruoga *et al.* (2007b) tyrimo metu, o kvadratais pažymėtos imtys yra disertacinio darbo duomenys; skritulinės diagramos proporcingos individų skaičiui imtyje; BJ – Baltijos jūra; KM – Kuršių marios; RĪ – Rygos įlanka; ŠŽ – Šventės ežeras; BAB – Babytės ežeras; CIR – Cirīšu (ežeras); DRŪ – Drūkšiai (ežeras); KĀL – Kālezers (ežeras); MET – Metelys (ežeras); NEM – Nemunas (upė); NER – Neris (upė); PLA – Plateliai (ežeras).



## Discussion

**The determination of the eel species.** The research results obtained unambiguously confirm that the identification of *A. anguilla*, *A. rostrata* and *A. japonica* species was reliable when homologous sequences (450-455 bp length) of the mtDNA D-loop region were analyzed. Based on the available data of *Anguilla* genus species mtDNA D-loop region investigations during the work, it could be stated that there are no *A. japonica* and *A. rostrata* species in the inland and territorial water bodies of Lithuania.

**Discussion of the results based on *A. anguilla* DNA microsatellites data.** The results of the work confirm that the eels found in the Baltic Sea, the Curonian Lagoon and the Gulf of Riga could be ascribed to one ATPL eel group. Besides, the results also confirm that the genetic diversity of the eels caught in different Lithuanian lakes is different. Due to the fact that the eels released into Lithuanian lakes were caught in England and France in different years it is rational to assume that the genotypes of the eels belonging to the different batches of the introduced eels were markedly different. The gradual introduction of new eel groups into Lithuanian lakes should have had an impact on the formation of the genetic diversity of eels in Lithuanian lakes. This assumption was confirmed by the results of the work because statistically significant genetic differentiation was determined between the eel samples from Lake Dringis and Lake Siesartis (Table 3, Analysis IV).

To sum up, the investigation of *A. anguilla* DNA microsatellites carried out during the work was mainly aimed at finding out genetic peculiarities and differences between ATPL and INTR groups of eels. It should be stated that statistically significant genetic differences between the above-mentioned groups were not determined. Consequently, it was decided to use mtDNA molecular markers in order to verify the panmixia hypothesis in *A. anguilla* species.

**Discussion of the results based on *A. anguilla* mtDNA D-loop region data.** A total of 75 different haplotypes of the mtDNA D-loop region were determined in Europe after 81 European eels have been investigated (Lintas *et al.* 1998, Minegishi *et al.* 2005 and unpublished Murgia R., Tola G., Hirano J. ir Archer S. N. research). These 75 haplotypes could be ascribed to 30 different haplogroups. During the work a total of 148 eels were investigated and 107 different haplotypes, which could be attributed to 39 haplogroups, were determined. After the data of this study has been combined with the available data of earlier studies, a dataset comprised of 229 sequences was analyzed. It should be noted that the obtained results are equivocal. Some of them support the panmixia hypothesis in *A. anguilla* species, whereas others

deny it. Main arguments supporting the panmixia hypothesis in this species are as follows: i) statistically significant genetic differentiation between various samples of eels was not determined; ii) the random distribution of more common haplotypes, haplogroups or superhaplogroups in different geographic regions. Some other arguments deny the panmixia hypothesis in this species: i) the population genetic structure of eel is identified as the genetic mosaic; ii) the detection of rare haplogroups and superhaplogroups is fragmentary; iii) a non-random distribution of haplotypes, which are evolutionarily related, on a microgeographic scale; the characteristics of the genetic diversity of ŠJR and VJR eel samples are different from all other studied eel samples. There are no marked differences of the genetic diversity between eels introduced to Lithuanian lakes and the eels that inhabit the Baltic Sea and the North Sea. However, marked genetic diversity differences, represented by different haplotypes, haplogroups or superhaplogroups between the samples of the eels from the Lithuanian lakes were determined.

To sum up, it could be concluded that the European eel is panmictic by maternal line based on all available data. However, there is growing evidence that this species was not panmictic during its previous phases of evolution.

**Discussion of the results based on *A. anguilla* mtDNA *cyt b* data.** A total of 20 different haplotypes of mtDNA *cyt b* were determined in Europe and North Africa after 119 eels have been investigated (Aoyama & Tsukamoto 1997, Wolf *et al.* 2000, Aoyama *et al.* 2001, Daemen *et al.* 2001, Lin *et al.* 2001, Minegishi *et al.* 2005 and data from the GenBank (EF427617-EF427618, EU223996-EU223997, EU492326-EU492327)). These 20 haplotypes could be ascribed to 8 different haplogroups. During the work a total of 82 eels were investigated and 14 different haplotypes, which could be attributed to 7 haplogroups, were determined. After the research data was combined with the available data of earlier studies, dataset of 201 sequences was analyzed. The obtained results revealed the genetic mosaic consisting of reproductively isolated groups in the European eel. It is interesting to note that statistically significant values of  $\Phi_{ST}$  were determined for the first time using the European eel mtDNA *cyt b* marker.

Statistically significant ( $p < 0.05$ ) genetic differentiation between ATPL and INTR groups of eels was not determined using the data of mtDNA *cyt b*. However, it was revealed that genetic diversity between eels that inhabit Lake Dringis and Lake Siesartis is different because different haplotypes were determined in these lakes. After analysing the results of the European eel mtDNA D-loop region and *cyt b* investigations it became apparent that these two mtDNA markers enabled similar tendencies of the formation of genetic diversity to be revealed.

**Genetic mosaic in *A. anguilla* species.** Due to the fact that too little attention has been devoted to the investigations of the intraspecific evolution of the European eel thus far the main reason of the genetic mosaic in this species was not determined. More detailed investigation into the intraspecific evolution of the European eel that was carried out during the work showed that the main reason for observing the genetic mosaic in this species is the existence of different evolutionary lines in the eel population. The obtained data presuppose that it could not be explained by the genetic patchiness and/or Hedgecock effect (Selkoe *et al.* 2010, Hedgecock & Pudovkin 2011, Pujolar *et al.* 2011a).

**Factors that had an impact on the formation of the population genetic structure of *A. anguilla* species.** We can distinguish two potential reasons why European eel is considered to be panmictic nowadays: i) changes in geographic locations of spawning and feeding grounds of the eels caused by the glacial period; ii) stocking, which could have had an impact on the abundance and the migrational behaviour of the eels.

It could be concluded that differences in the genetic diversity, which were determined during the work, between ATPL and INTR groups of eels were small and statistically insignificant. Therefore, it is reasonable to continue investigations of the genetic diversity of eels. Especially those investigations that aim at finding out whether the intensive anthropogenic activity, which is associated with the eels stocking and fishing during the past decades, had (or did not have) a strong impact on this species, *i.e.* its decreasing abundance, alterations in the eels migrational behaviour and weakening of its genetic differentiation between different eel groups in population.

**Reproductively isolated groups of individuals in *A. anguilla* species.** If it can be shown that there are local populations in *A. anguilla* species, *i.e.* reproductively isolated groups of eels, whose representatives are able to return to the spawning grounds of their parents from generation to generation, the hypothesis of panmixia in this species should be rejected. Despite the fact that local populations of eels have not been determined until now, the discussions about them are held (Kettle & Haines 2006, Maes & Volckaert 2007). The data of the thesis do not reject the hypothesis of panmixia in this species. However, it also indicates that local populations of eels existed in the past.

**Peculiarities of the perch population inhabiting Lake Drūkšiai.** Taking into account the fact that ichthyofauna of Lake Drūkšiai was strongly affected by anthropogenic activities too little attention has been devoted to the investigations of the population genetic structure of fish

species inhabiting this lake thus far. In order to evaluate the possible impact, which was exerted by anthropogenic activities related to the development of nuclear energy, on the formation of the population genetic structure of the commercially exploited fish, it was decided to initiate an investigation of the genetic diversity of mtDNA D-loop region of the perch species in Lake Drūkšiai and other inland water bodies of Lithuania and Latvia. The results of the investigation revealed statistically significant ( $p < 0.05$ ) genetic differences between the perch population of Lake Drūkšiai and all other Lithuanian and Latvian perch populations, investigated during the work and Sruoga *et al.* (2007b) study. In addition, B5, B6, B7 and C5 haplotypes were found exclusively in the perch sample from Lake Drūkšiai (Fig. 8). The slightest genetic differentiation was determined between NER and DRŪ perch samples ( $\Phi_{ST} = 0.03041$ ,  $p < 0.01$ ), whereas the greatest genetic differentiation was determined between MET and DRŪ perch samples ( $\Phi_{ST} = 0.38966$ ,  $p < 0.001$ ). The data of the thesis indicate that differences in the genetic diversity between the perch population of Lake Drūkšiai and other Lithuanian perch populations increased because of hystorical natural processes.

#### **Peculiarities of genetic differentiation of Lithuanian and Latvian perch populations.**

Thus far the genetic investigations of perch populations inhabiting Lithuania and Latvia have been quite fragmentary. The research conducted during the work revealed that the greatest genetic differences were between the perch samples from the western parts of Lithuania and Latvia and the perch samples from the eastern part of Lithuania and Southeastern Latvia.

**Distribution of perch haplotypes and haplogroups in Europe.** After 489 perch from Eurasia, excluding the perch samples from Lithuania and Latvia, have been investigated, 35 different haplotypes were determined (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999 and one sequence from the GenBank (EF118012)). These 35 haplotypes belong to 9 different haplogroups. Most common haplotypes in Eurasia are F and C. The greatest diversity of haplotypes belonging to haplogroup A (A, A1, A2, A3, A4 and A5 haplotypes) was observed in Norway. Due to the fact that B1 and B2 haplotypes were detected in the perch samples from Estonia but they were not found either in Lithuania, or in Latvia it could be stated that genetic diversity of the perch in each Baltic States is partially unique. It can be assumed that the formation of the genetic diversity of the perch in Lithuania, Latvia and Estonia was influenced by similar or common hystorical natural processes.

During the work a total of 262 perch caught in the inland water bodies of Lithuania and Latvia were investigated and 29 different haplotypes, which could be attributed to 7 haplogroups, were determined. Out of these 29 haplotypes 21 haplotypes were determined only

in the perch samples collected during the work. Due to the fact that 8 haplotypes (A2, D1, E ir G bei F4, H1, L1 and L2), not detected during the work, were detected in the western parts of Lithuania and Latvia during the earlier Sruoga *et al.* (2007b) study, thus a total of 37 different haplotypes were determined exclusively in Lithuania and Latvia. These 37 haplotypes represent all haplogroups, except haplogroup M, which is found in the southern parts of Europe. Distribution patterns of haplotypes in Europe revealed peculiarities of the perch populations found in the Baltic States: i) the representatives of haplogroup M were not detected in the Baltic States; ii) the representatives of haplogroup B, which are rare or absent in other European regions (Fig. 10), dominate in the Baltic States. Based on the results of this investigation it could be stated that there is a contact zone of different perch genetic lineages from the southwestern parts of Lithuania to the central part of Latvia.

To sum up, thus far a total of 807 perch has been studied in Europe, including the perch samples from the work, and 60 haplotypes, which could be attributed to 9 haplogroups, were determined. The perch populations inhabiting inland water bodies situated in the vicinity of the Baltic Sea have a larger diversity of haplogroups as compared to the perch populations found in the eastern parts of Lithuania and Latvia. However, more representatives of A, B and C haplogroups are found in the perch samples from the eastern parts of Lithuania and Latvia.

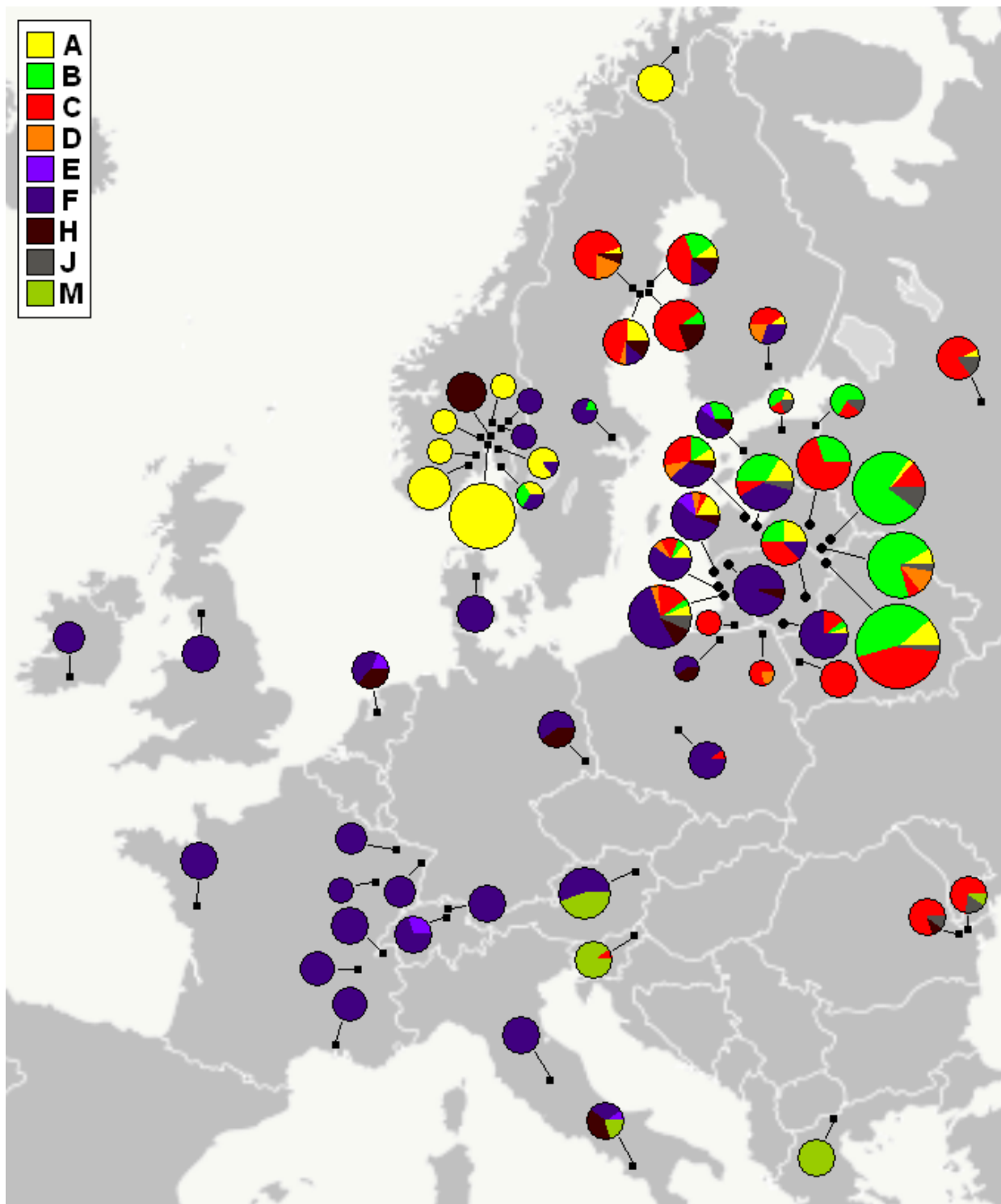


Fig. 10. The distribution of *P. fluviatilis* mtDNA D-loop region haplogroups in Europe: the perch samples collected during the earlier studies (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999, Sruoga *et al.* 2007b) are indicated in squares, while the perch samples collected during Sruoga *et al.* (2007b) study and the work are indicated in circles; the diameter of pie charts is proportional to the number of sequences (5-53 sequences); some geographically close perch samples from Norway were combined.

10 pav. *P. fluviatilis* mtDNR D-kilpos regiono haplogrupių paplitimas Europoje: kvadratais pažymėtos imtys surinktos ankstesnių tyrimų metu (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999), o apskritimais pažymėtos imtys yra Sruoga *et al.* (2007b) ir disertacinio darbo duomenys; skritulinių diagramų skersmuo proporcingas sekų skaičiui imtyje; mažiausias skritulys reprezentuoja 5 sekas, o didžiausias skritulys reprezentuoja 53 sekas; kai kurios geografiškai artimos Norvegijos ešerių imtys apjungtos.

## CONCLUSIONS

1. The originally designed primer pair Ang1 is useful for investigations into the intraspecific genetic diversity of the European eel and can be used to identify *A. anguilla* and *A. japonica* species.
2. A relatively great genetic diversity of the European eel and the population genetic structure characterized by the genetic mosaic, which is formed due to the existence of reproductively isolated groups, was determined using different DNA markers. Values of all characteristics of the genetic diversity were higher in the mtDNA D-loop region as compared to the investigated fragment of *cyt b* gene.
3. After analysing five DNA microsatellite loci statistically significant genetic differentiation between the eel samples caught in different inland and territorial water bodies of Lithuania and Latvia was determined.
4. Eel groups naturally recruited to Lithuania and Latvia and introduced to Lithuanian lakes have slight though statistically insignificant genetic differences. The data of the study indicate that quantitative parameters of the genetic diversity between naturally recruited and introduced eels are similar. The eels stocked into different lakes of Lithuania differs by their mtDNA haplotype diversity.
5. Based on the perch mtDNA D-loop region marker it was determined that the perch populations inhabiting water bodies situated in the vicinity of the Baltic Sea area and the perch populations inhabiting inland water bodies situated in the eastern part of the Baltic Countries are characterised by a different diversity of haplotypes and are genetically differentiated.
6. The genetic diversity of the perch populations inhabiting the Baltic Countries are characterised by the greatest haplotype diversity of the representatives of haplogroup B, which are rare in other regions of Europe. A total of 30 different perch haplotypes was determined in the inland water bodies of Lithuania and Latvia of which 21 were detected for the first time.
7. The perch population of Lake Drūkšiai is distinctive and genetically differentiated from all other perch populations inhabiting inland and territorial water bodies of Lithuania and Latvia. The determined genetic differences arose mainly as a result of historical natural processes which occurred during the glaciation period.

## IVADAS

**Darbo aktualumas.** Siekiant tvariai eksploatuoti verslinių žuvų populiacijas nesukeliant pavojaus jų genetiniams resursams būtina sukaupti daug duomenų apie šių rūšių populiacinę-genetinę struktūrą (Laikre *et al.* 2005a). Populiacinė-genetinė struktūra dažniausiai apibrėžiama kaip rūšies genetinės įvairovės pasiskirstymo pobūdis populiacijose, t. y. jų viduje bei tarp populiacijų, o šios struktūros formavimasis žuvų populiacijose didele dalimi priklauso nuo neršto metu vykstančių procesų. Skirtingai nuo teorinio modelio, apibrėžiamo Hardžio-Vainbergo dėsnio, dėl alelių ir genotipų dažnių pokyčių, kurie skiriasi nuo teorinių paskaičiavimų, gamtinės populiacijos kiekvienoje naujoje generacijoje pasižymi santykinu populiacinės-genetinės struktūros kintamumu. Išsamūs rūšies populiacinės-genetinės struktūros tyrimai suteikia galimybę sukurti tvarią, genų įvairovės lygmenyje, išteklių naudojimo strategiją (Hauser & Carvalho 2008) arba išsaugoti rūšies genetinę įvairovę (Laikre *et al.* 2008). Deja, šiuo metu daugelio žuvų rūšių populiaciniai genetiniai tyrimai yra labai fragmentiški arba išvis nevykdomi, o žuvų išteklių naudojimo planuose ne visada atsižvelgiama į jau turimus duomenis apie eksploatuojamų rūšių populiacinę-genetinę struktūrą.

Lietuvoje neseniai pradėti vykdyti dviejų *Salmo* genties rūšių genetiniai tyrimai (Leliūna 2008, Samuilovienė 2012), kurių dėka kaupiamos žinios apie dirbtinėmis sąlygomis užaugintų individų, kurie vėliau yra išuvinami Lietuvos vidaus vandens telkiniuose, įtaką verslinių žuvų rūšių populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi. Lyginant su lašišinių žuvų tyrimais šio disertacinio darbo problematika, susijusi su europinio upinio ungurio – *Anguilla anguilla* (L.) tyrimais, skiriasi dviem aspektais: 1) unguris yra katadrominė rūšis, todėl kitaip, nei atlantinė lašiša – *Salmo salar* L., neršia ne išuvinimo vietovėse, o Sargaso jūroje, 2) introdukuoti ungurių jaunikliai reprezentuoja natūralią ungurių populiaciją, nes ungurių išuvinimo veikla pagrįsta natūraliai išneršusių ungurių jauniklių gaudymu vienoje geografinėje vietovėje ir perkėlimu auginimui kitoje geografinėje vietovėje. Dėl šių priežasčių išuvinimo poveikio tyrimai, siekiant nustatyti šios antropogeninės veiklos įtaką ungurių populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi, yra komplikuoti. Kadangi *Anguilla* spp. išuvinimo veikla neapsiriboja įvairių ungurių jauniklių introdukcijomis tik viename kontinente, šiuo metu kai kurių *Anguilla* genties rūšių, įskaitant *A. anguilla*, natūralus paplitimas yra pakitęs (Maes & Volckaert 2007).

Siekiant atskleisti verslinių žuvų rūšių, patiriančių skirtingo pobūdžio antropogeninį poveikį, populiacinės-genetinės struktūros formavimosi ypatumus, šiame disertaciniame darbe šalia upinių ungurių papildomai tyrinėta kontinente paplitusi rūšis – paprastasis europinis ešeris – *Perca fluviatilis* L. Skirtingai nuo upinių ungurių, šios rūšies populiacinės-genetinės struktūros ypatumai tirti natūraliose buveinėse Lietuvos ir Latvijos vidaus vandenyse, lyginant gautus



duomenis su anksčiau vykdytais šios rūšies tyrimais (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999, Sruoga *et al.* 2007b). Sukaupti naujausi ešerio mtDNR D-kilpos regiono duomenys įgalino atskleisti šios rūšies filogeografijos ypatumus Baltijos šalyse.

Dėl kelių objektyvių priežasčių šiame darbe didžiausias dėmesys buvo skiriamas mtDNR tyrimams. Pastaruoju metu europinio upinio unгурio genetiniai tyrimai dažniausiai buvo vykdomi pasitelkiant mikrosatelitinius DNR žymenis, tačiau daug mažiau dėmesio buvo skirta unгурių populiacinės-genetinės struktūros tyrimams naudojant mtDNR žymenis. Iki šio disertacinio darbo pradžios buvo publikuoti du straipsniai (Lintas *et al.* 1998, Daemen *et al.* 2001), kurių rezultatai paremti unгурio mtDNR D-kilpos regiono ir *cyt b* tyrimais. Pažymėtina, kad autorių skelbiamos išvados nesutapo panmiksijos hipotezės šioje rūšyje klausimu. Be to, unгурio DNR mikrosatelitų tyrimai nėra pakankamai informatyvūs siekiant išsiaiškinti šios rūšies vidurūšinę evoliuciją. Todėl europinio upinio unгурio populiacinės genetikos tyrimai, pagrįsti mtDNR sekų analize, šiuo metu yra labai svarbūs ir aktualūs. Sujungus kitų tyrėjų gautus tiriamų žuvų DNR sekų duomenis su šio darbo metu naujai nustatytais DNR sekomis atsirado galimybė atlikti tyrimus globaliu lygmeniu. Tiriant skirtingų rūšių analogiškas mtDNR sekas atsiranda galimybė palyginti tiriamų rūšių genetinę įvairovę, nustatyti kitus svarbius šių rūšių populiacijų genetinius parametrus, papildyti žinias apie verslinių žuvų rūšių populiacinę-genetinę struktūrą.

#### **Darbo naujumas:**

1. *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono tyrimams buvo sukonstruota originali pradmenų pora Ang1, kuri taip pat gali būti panaudota *A. anguilla* ir *A. japonica* rūšių identifikavimui.
2. Pirmą kartą išsamiai tirta europinio upinio unгурio genetinė įvairovė Lietuvoje ir Latvijoje naudojant mikrosatelitinės DNR ir mtDNR molekulinis žymenis.
3. Pirmą kartą atliktas natūraliai į Lietuvą ir Latviją atplaukiančių ir introdukuotų unгурių grupių genetinės įvairovės palyginimas.
4. Pirmą kartą išsamiai tirta Lietuvos ir Latvijos vidaus vandenų ešerių populiacinė-genetinė struktūra naudojant mtDNR D-kilpos regiono genetinius žymenis.
5. Pirmą kartą naudojant molekulinis DNR žymenis tirta Ignalinos atominės elektrinės veiklos įtaka ešerio populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi.

**Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė.** Europinis upinis unгурys pastaruoju metu laikomas nykstančia rūšimi. Nepaisant intensyvių šios rūšies tyrinėjimų pastaraisiais dešimtmečiais, šiuo metu vis dar trūksta esminių žinių apie šios žuvies gyvenimo ciklą, vidurūšinę evoliuciją, nerštamą, reprodukciją, populiacinę-genetinę struktūrą, elgseną. Šiame disertaciniame darbe

pateikti unguorio mtDNR žymenimis pagrįsti tyrimų rezultatai yra reikšmingi ir svarbūs populiacinės-genetinės struktūros ir vidurūšinės evoliucijos suvokimui, bei praktiniu požiūriu, nes gauti nauji genetinių tyrimų duomenys gali būti panaudoti kuriant tvarios eksploatacijos planus, siekiant apsaugoti rūšį nuo išnykimo grėsmės. Pavyzdžiui, natūraliai į Lietuvą ir Latviją atplaukusią (ATPL) ir introdukuotą Lietuvos ežeruose (INTR) unguorių grupių palyginimas pagal jų genetinės įvairovės parametrus sukuria prielaidas unguorių išteklių valdymui bei klausimų, susijusių su unguorių žuvinimo veikla bei poveikiu rūšies ištekliams sprendimui. Praktinės reikšmės darbui taip pat suteikia originalios pradmenų poros, skirtos *A. anguilla* ir *A. japonica* rūšių identifikavimui, sukūrimas ir panaudojimas.

Disertaciniame darbe taip pat atskleisti paprastojo europinio ešerio filogeografijos dėsningumai Baltijos šalyse. Sukaupti ešerių genetinės įvairovės molekuliniai duomenys yra svarbūs tiriant genetinės įvairovės pokyčius, kuriuos galima indukuoja antropogeninė veikla.

**Darbo tikslas ir uždaviniai.** Šio darbo tikslas – *A. anguilla* ir *P. fluviatilis* vidurūšinės genetinės įvairovės tyrimai naudojant mikrosatelitinės DNR ir mtDNR žymenis, siekiant įvertinti galimą antropogeninį poveikį verslinių žuvų rūšių populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi. Tikslui pasiekti buvo suformuluoti šie uždaviniai:

1. Nustatyti unguorių rūšinę priklausomybę naudojant sukonstruotą originalių pradmenų porą, skirtą *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono tyrimams.
2. Naudojant mikrosatelitinės DNR ir mtDNR D-kilpos regiono bei *cyt b* geno žymenis nustatyti unguorio vidurūšinės genetinės įvairovės parametrus.
3. Atlikti natūraliai į Lietuvą ir Latviją atplaukiančių ir introdukuotų unguorių grupių genetinės įvairovės palyginimą, siekiant įvertinti žuvinimo poveikį unguorio populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi.
4. Nustatyti Lietuvos ir Latvijos vidaus vandens ešerių genetinę įvairovę naudojant mtDNR D-kilpos regiono genetinius žymenis.
5. Palyginti Baltijos šalių ir kitų Europos šalių ešerių populiacijų genetinę įvairovę.
6. Palyginti Drūkšių ežero bei Lietuvos ir Latvijos vidaus vandens telkinių ešerių populiacijų genetinės įvairovės parametrus siekiant įvertinti galimą antropogeninį poveikį populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi.

**Ginamieji teiginiai:**

1. Sukonstruota nauja mtDNR D-kilpos regiono originalių pradmenų pora yra tinkama *A. anguilla* ir *A. japonica* rūšių identifikacijai.

2. Pagal mikrosatelitinės DNR ir mtDNR žymenų tyrimus ungurio populiacinė-genetinė struktūra pasižymi genetinė mozaika, kurios susiformavimą lemia reproduktyviai izoliuotos grupės.
3. Natūraliai į Lietuvą ir Latviją atplaukiančių ir introdukuotų ungurių grupės genetinė diferenciacija nepasižymi pagal mtDNR žymenis.
4. Skirtinguose Lietuvos ežeruose gyvenantys unguriai pasižymi skirtinga genetinė įvairove pagal mikrosatelitinės DNR ir mtDNR žymenis.
5. Lietuvos ir Latvijos priekrantės bei vakarinės dalies vandens telkinių ir rytinės kontinentinės dalies ešerių populiacijos pasižymi skirtinga genetinė įvairove.
6. Baltijos šalių ešerių populiacijai būdinga mtDNR D-kilpos regiono haplogrupė B, retai aptinkama kituose Europos regionuose.

**Rezultatų pristatymas ir aprobavimas.** Disertacinio darbo rezultatai paskelbti 4 straipsniuose ir 5 tarptautinėse konferencijų tezėse. Disertacijos tema perskaityti 5 pranešimai bei pristatytas vienas standinis pranešimas tarptautinėse mokslinėse konferencijose Lietuvoje, Latvijoje, Taivanyje.

**Disertacijos struktūra.** Disertaciją sudaro šie skyriai: Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas, Išvados, Literatūros sąrašas, Disertacijos tema publikuoti straipsniai, Konferencijų tezės, Padėkos, Priedai. Neįskaitant priedų, disertacijos apimtis – 165 puslapiai, 33 lentelės ir 26 paveikslai. Disertacija parašyta lietuvių kalba.

## LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje apžvelgiami tyrimų objektai – europinis upinis ungurys ir paprastasis europinis ešeris, jų populiacinė genetika, žuvų populiacinė-genetinė struktūra, jos tipai, antropogeninio poveikio įtaka verslinių žuvų rūšių populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi bei mikrosatelitinės DNR ir mtDNR žymenys.

## MEDŽIAGA IR METODAI

**Medžiagos surinkimas.** Iš viso tyrimams panaudoti 221 unguriai ir 262 ešeriai. Visi tirti unguriai buvo geltonojo arba sidabrinio ungurio stadijų. Dalis ungurių buvo gauta iš Klaipėdos teritorinės muitinės 2009 metų rudenį Klaipėdos uoste sulaikius 25 t ungurių siuntą. Pasak tiekėjo, visos užšaldytos žuvys dėžėse buvo japoniniai upiniai unguriai. Visi kiti unguriai bei

ešeriai buvo sugauti įvairiose Lietuvos ir Latvijos vietovėse. Detalesnė informacija apie surinktas žuvų imtis pateikta 1 lentelėje.

Remiantis Lietuvoje atliktų *A. anguilla* otolitų tyrimų duomenimis (Shiao *et al.* 2006, Lin *et al.* 2007) Baltijos jūroje, Kuršių mariose ir Rygos įlankoje pagauti unguriai priskirti natūraliai į Lietuvą ir Latviją atplaukiančių ungurių grupei (ATPL), o Balsio, Dringio ir Siesarčio ežerų ungurių imtys reprezentuoja introdukuotus ungurius (INTR).

**Ungurių molekulinei analizei sukurtos Ang1 ir Ang2 pradmenų poros.** MtDNR regionų amplifikacijai skirtų pradmenų charakteristikos pateiktos 2 lentelėje.

Abi pradmenų poros sukurtos Molekulinės ekologijos laboratorijoje remiantis *Anguilla* genties rūšių mtDNR sekų, kurios buvo įkeltos į GenBank duomenų bazę, palyginamąja analize ir Primer3 programa (Rozen & Skaletsky 2000).

**Laboratorinės procedūros.** DNR buvo išskirta naudojant Aljanabi & Martinez (1997) metodą su nežymiais pakitimais; dažniausiai buvo naudojamas raumeninis audinys. Ungurių DNR amplifikacijai panaudotos originalios pradmenų poros Ang1, Ang2, sukonstruotos Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijoje, bei AF237898, AF237899, AF237900, AF237901 ir AF237902 (Wirth & Bernatchez 2001) pradmenų poros, o ešerių mtDNR D-kilpos regiono dalinės sekos amplifikuotos naudojant HV2 ir CSB-D pradmenis (Nesbø *et al.* 1998a). DNR sekoskaita atlikta Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre bei Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute, Molekulinės ekologijos laboratorijoje.

**Ungurių rūšinės priklausomybės nustatymas.** Siekiant identifikuoti ungurių, gautų iš Klaipėdos teritorinės muitinės bei pagautų įvairiose Lietuvos ir Latvijos vietovėse, rūšį, atlikta DNR sekų filogenetinė analizė. Naudojant CLC Sequence Viewer 5.1.1 ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)) programą bei remiantis nepasvertų porų-grupių metodu su aritmetiniu vidurkiu (UPGMA) (Michener & Sokal 1957) ir mtDNR D-kilpos regiono abejotinos kilmės ungurių sekų sulyginimu su genų banke deponuotomis 450-455 bp ilgio *A. anguilla*, *A. japonica* ir *A. rostrata* sekomis (GenBank: AJ225953, AJ225956, AJ225969, AM997243, AM997253, AM997255, AM997258, M95867, AB030662, AP007249) buvo sukonstruota UPGMA dendrograma. Šios UPGMA dendrogramos konfigūracija įgalino tiriamąsias sekas priskirti vienai iš ungurių rūšių.

***A. anguilla* DNR mikrosatelitų statistinė analizė.** Alelių santykiniai dydžiai visuose DNR mikrosatelitų regionuose buvo įvertinti analizuojant DNR fragmentų judėjimo pobūdį elektroforetogramose, pasinaudojant TotalLab v1.10 (Amersham Biosciences) programa, bei atsižvelgiant į pasirinktų ungurių individų DNR sekvenavimo rezultatus. Genetiniai atstumai

(Nei 1972) buvo apskaičiuoti naudojant TFPGA v1.3 (Miller 1997) programą. F statistika ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  bei  $F_{IT}$ ) (Cockerham 1973, Weir & Cockerham 1984) ir jos patikimumas, t. y. alelinė diferenciacija (angl. genic differentiation) (Raymond & Rousset 1995a) ir genotipinė diferenciacija (angl. genotypic differentiation) (Goudet *et al.* 1996), buvo apskaičiuotos naudojant GENEPOP (Raymond & Rousset 1995b, Rousset 2008) programą.

**MtDNR sekų analizė.** Iš viso europinio upinio unguorio mtDNR D-kilpos regiono sekų analizei panaudotos 493 bp ilgio 229 sekos, iš kurių 148 nustatytos vykdant šį disertacinį darbą (skirtingų haplotipų sekos GenBank duomenų bazėje: FJ707255-FJ707280, JX162682-JX162753), o 81 buvo deponuota genų banke anksčiau tyrimus vykdžiusių mokslininkų.

Iš viso europinio upinio unguorio mtDNR cyt *b* fragmentų analizei panaudotos 392 bp ilgio 201 sekos, iš kurių 82 nustatytos šio disertacinio darbo metu (šiuo metu sekos į GenBank neįkeltos), o 119 deponuotos genų banke kitų tyrėjų.

Iš viso ešerio mtDNR D-kilpos regiono sekų analizei panaudotos 389-400 bp ilgio 807 sekos, iš kurių 262 nustatė šio disertacinio darbo autorius (skirtingus haplotipus atstovaujančios sekos deponuotos GenBank duomenų bazėje: HM992571-HM992578, JX034742-JX034749). Likusias 545 sekas anksčiau nustatė kiti mokslininkai (Nesbø *et al.* 1998b (iš viso 66 sekos), Refseth *et al.* 1998 (iš viso 109 sekos), Nesbø *et al.* 1999 (iš viso 313 sekos), Sruoga *et al.* 2007b (iš viso 56 sekos) ir viena seka iš GenBank (EF118012)).

Tiriamų žuvų rūšių DNR sekų sulyginimas bei dendrogramų, paremtų kaimynų-jungimo metodu (NJ) (Saitou & Nei 1987), konstravimas buvo atliktas naudojant CLC Sequence Viewer 5.1.1 ir/arba MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) programas. MEGA 4 programos atveju, DNR sekų sulyginimui naudotas ClustalW (Thompson *et al.* 1994) algoritmas.

Polimorfinių saitų DNR grandinėje skaičius ( $S$ ), bendras mutacijų skaičius ( $\eta$ ), haplotipų įvairovės parametras ( $h$ ) (Nei 1987), nukleotidų įvairovės parametras ( $\pi$ ) (Lynch & Crease 1990), nukleotidų pakaitų vidurkio koeficientas ( $K$ ) (Tajima 1983), genetinis atstumas tarp lyginamų populiacijų, kuris yra išreiškiamas nekoreguotu nukleotidų pakaitų vidurkiu saitui, t. y. lyginamų sekų grupių skirtumų koeficientas ( $K_{XY}$ ) (Nei 1987) ir fiksacijos indeksas ( $\Phi_{ST}$ ) (Hudson *et al.* 1992b) su patikimumo reikšmėmis ( $p$ ) (Hudson *et al.* 1992a) buvo apskaičiuoti naudojant DNASP 4.50.3 programą (Rozas *et al.* 2003). Atliekant skaičiavimus DNASP 4.50.3 programa delecijos buvo vertinamos kaip penkta pozicija (A, C, G, T, -), tačiau mtDNR sekos, kuriose įsiterpusios didesnės nei 5 bp delecijos, iš analizės būdavo pašalinamos.

Haplotipų tinklai buvo konstruojami naudojant medianų-jungimo metodą (MJ, angl. *median joining*) (Bandelt *et al.* 1999) įdiegtą NETWORK 4.6.1.0 programoje (www.fluxus-engineering.com/). Siekiant supaprastinti *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono haplotipų tinklą,

pasitelktas papildomas maksimalaus šykštumo metodas (MP, angl. *maximum parsimony*) (Polzin & Daneshmand 2003), kuris taip pat įdiegtas NETWORK 4.6.1.0 programoje. Sudėtingam europinio upinio ungurio mtDNR D-kilpos regiono haplotipų tinklui konstruoti pasitelkta papildoma DNA Alignment 1.3.1.1. programa, o kitų haplotipų tinklų konstravimui reikalingi duomenys į NETWORK 4.6.1.0 programą būdavo suvedami rankiniu būdu. Konstruojant haplotipų tinklus delecijos visada būdavo vertinamos kaip penkta pozicija, tačiau mtDNR sekos, kuriose įsiterpusios didesnės nei 5 bp delecijos, iš analizės būdavo pašalinamos. Remiantis sukonstruotais haplotipų tinklais, mažai tarpusavyje besiskiriančios mtDNR sekos būdavo apjungiamos 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.

## REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### *Anguilla anguilla* molekuliniai tyrimai

**Ungurių rūšinės priklausomybės nustatymas.** Panaudojus Ang1 pradmenų porą, skirtą europinio upinio ungurio mtDNR D-kilpos regiono sekoms pagausinti, buvo sėkmingai amplifikuotos visų tirtų ungurių mtDNR D-kilpos regiono sekos. Atlikus tiriamų ungurių mtDNR D-kilpos regiono sekų ir iš GenBank duomenų bazės paimtų dešimties 450-455 bp ilgio homologinių sekų palyginamąją analizę paaiškėjo, jog visų ungurių, kurie buvo pagauti Lietuvoje ir Latvijoje, tiriamos sekos priklauso *A. anguilla* rūšiai, o visų ungurių, kurie buvo gauti iš Klaipėdos teritorinės muitinės, tiriamos sekos priklauso *A. japonica* rūšiai. Tiriamosios sekos priskirtos konkrečioms ungurių rūšims atsižvelgiant į šių sekų individualų grupavimąsi UPGMA dendrogramoje kartu su žinomomis *A. anguilla*, *A. japonica* ir *A. rostrata* sekomis. Pateiktoje UPGMA dendrogramoje (1 pav.) visų ungurių, kurie buvo gauti iš Klaipėdos teritorinės muitinės, sekos grupuojasis kartu su *A. japonica* rūšies sekomis sudarydamos atskirą klasterį, atsiskyrusį nuo kitų dviejų *A. anguilla* ir *A. rostrata* rūšims priskiriamų sekų klasterių. Šiame paveiksle keturios *A. anguilla* klasteriui priskiriamos sekos buvo nustatytos šio disertacinio darbo metu (GenBank: FJ707257, FJ707264, FJ707265, FJ707273) ir reprezentuoja ungurių, kurie buvo sugauti Lietuvoje ir Latvijoje, rūšį.

**DNR mikrosatelitų analizė.** Atlikus mikrosatelitų analizę naudojant 114 europinių upinių ungurių DNR pavyzdžius, mažiausiai alelių, septyni, nustatyta *Ang101* regione, o daugiausiai, trylika, nustatyta *Aro121* regione. *Aro063*, *Ang151* ir *Ang114* regionuose, kuriuose atitinkamai

nustatyta 9, 8 ir 11 alelių. 3 lentelėje atliktos analizės su visomis turimomis ungurių imtimis iš Lietuvos ir Latvijos rezultatai ( $F_{ST} = 0,0084$ ,  $p < 0,01$ , tiek pagal alelinę, tiek pagal genotipinę, diferenciaciją) indikuoja, nedidelę, bet statistiškai labai patikimą genetinę diferenciaciją. Tarp ATPL ir INTR ungurių grupių statistiškai patikimos genetinės diferenciacijos nenustatyta (III analizė). Tarp Dringio ir Siesarčio ežerų ungurių imčių (IV analizė) nustatyta nedidelė, bet statistiškai labai patikima genetinė diferenciacija ( $F_{ST} = 0,0157$ ;  $p < 0,01$ , tiek pagal alelinę, tiek pagal genotipinę, diferenciaciją). Skirtingų analizių  $F_{IS}$  ir  $F_{IT}$  rezultatai yra panašūs.

**MtDNR D-kilpos regiono sekų genetinė įvairovė.** Apskaičiuotos iš turimų europinio upinio unguorio mtDNR D-kilpos regiono duomenų  $\Phi_{ST}$  ir  $p$  vertės tarp įvairių lyginamų ungurių imčių kombinacijų yra pateiktos 4 lentelėje. Visi šie rezultatai vienareikšmiškai indikuoja, jog tiriamoji ungurių rūšis yra panmiksiniė.

Sukonstruotas haplotipų tinklas, sudarytas iš 229 *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono sekų pateiktas 2 pav. Kadangi didelė haplotipų įvairovė apsunkina šio haplotipų tinklo analizę, buvo nuspręsta artimų haplotipų sekas apjungti į didesnius vienetus – haplogrupes. Tokiu būdu gautas 47 europinio upinio unguorio mtDNR D-kilpos regiono haplogrupių tinklas (3 pav.). Visos 47 išskirtos europinio upinio unguorio mtDNR D-kilpos regiono haplogrupės gali būti grupuojamos į didesnes grupes – superhaplogrupes (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L).

Gauti europinio upinio unguorio mtDNR D-kilpos regiono superhaplogrupių paplitimo Europoje duomenys (4 pav.) yra dviprasmiški: 1) A, B, C, F, H ir I superhaplogrupių paplitimas visuose skirtinguose geografiniuose regionuose paremia *A. anguilla* panmiksijos hipotezę; 2) D, E, G, J, K ir L superhaplogrupių atstovų neaptikimas Viduržemio jūros regione indikuoja žymesnius genetinės įvairovės skirtumus tarp Viduržemio jūros regione gyvenančių ungurių ir kituose geografiniuose regionuose gyvenančių ungurių. Remiantis chaotišku skirtingoms superhaplogrupėms priskiriamų ungurių paplitimu Europoje galime teigti, kad šio tyrimo rezultatai dar kartą patvirtina žinomą faktą – tiriamos rūšies populiacinė-genetinė struktūra pasižymi genetinė mozaika, kurios susiformavimą lemia reproduktyviai izoliuotos grupės.

**MtDNR cyt b sekų genetinė įvairovė.** Skirtingai nuo analogiškų europinio upinio unguorio mtDNR D-kilpos regiono analizių (4 lentelė), kurios vienareikšmiškai indikavo, jog ši rūšis yra panmiksiniė, mtDNR cyt b tyrimo duomenys 5 lentelėje rodo nedidelę, bet statistiškai patikimą genetinę diferenciaciją tarp ŠJR ir AVR ungurių imčių ( $\Phi_{ST} = 0,03831$ ,  $p = 0,0053$ ), bei ŠP ir AVR ungurių imčių ( $\Phi_{ST} = 0,02968$ ,  $p = 0,0251$ ). Turimi duomenys suponuoja, jog genetinė diferenciacija atsiranda dėl ŠJR ungurių imties genetinių skirtumų, lyginant su kitomis ungurių imtimis.

Iš viso sukonstruotą iš 201 europinio upinio ungurio mtDNR cyt *b* sekos haplotipų tinklą (5 pav.) sudaro 34 skirtingi haplotipai, kurie gali būti priskirti 9 haplogrupėms. Europinio upinio ungurio mtDNR cyt *b* haplogrupių paplitimo Europoje ir šiaurės Afrikoje duomenys (6 pav.) rodo, jog Šiaurės jūros regioną reprezentuojančios ungurių imtys skiriasi nuo visų kitų geografinių regionų, kuriuos reprezentuoja konkrečios ungurių imtys, nes joje nerasta haplogrupės B atstovų. Baltijos jūroje aptinkami haplogrupės B atstovai galėjo čia atsirasti dėl išplaukusių iš ežerų introdukuotų ungurių. Haplogrupių D ir E atstovų neaptikta Viduržemio Jūros regione. Haplogrupės H atstovai rasti tik Anglijoje ir Siesarčio ežere. Daugiausia, septynios, skirtingų haplogrupių aptikta Baltijos jūros ungurių imtyje.

### ***Perca fluviatilis* mtDNR D-kilpos regiono tyrimai**

7 pav. pateikta NJ dendrograma, kuri yra pagrįsta  $K_{XY}$  atstumais tarp skirtingų ešerių imčių, apskaičiuotais naudojant Sruoga *et al.* (2007b) ir disertaciniame darbe tirtų Latvijos ir Lietuvos ešerių mtDNR D-kilpos regiono sekų duomenis. Ešerių imčių išsidėstymas šioje NJ dendrogramoje atspindi ne tik šių ešerių imčių geografinius skirtumus, bet ir Latvijos ir Lietuvos ešerių genetinės įvairovės panašumą tose imtyse, kurios aptinkamos arčiau Baltijos jūros. Drūkšių ežero ešerių imtis NJ dendrogramoje užima tarpinę padėtį, atskiriančią Drūkšių ežero ešerių populiaciją nuo kitų tiriamų imčių.

Sprendžiant iš porinių palyginimų tarp visų Lietuvoje ir Latvijoje surinktų ešerių imčių  $\Phi_{ST}$  ir *p* verčių, genetinė diferenciacija didėja tarp geografiškai tolimesnių ešerių imčių. Tarp kai kurių ešerių imčių genetinė diferenciacija yra labai intensyvi ( $\Phi_{ST} > 0,25$ ), tačiau patikimos genetinės diferenciacijos nenustatyta tarp vakarų bei pietų Lietuvos ešerių populiacijų, kurias šiame darbe reprezentuoja Baltijos jūros, Kuršių marių, Nemuno ir Platelių bei Metelio ežerų ešerių imtys. Drūkšių ežero ešerių imtis yra genetiškai diferencijuota, lyginant su visomis kitomis disertaciniame darbe tirtomis ešerių imtimis.

Ešerio mtDNR D-kilpos regiono haplotipų tinklas, sudarytas iš 333 sekų, kurios buvo nustatytos disertacinio darbo bei ankstesnių tyrimų (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999, Sruoga *et al.* 2007b) metu, pateiktas 8 pav. Dažniausiai Lietuvoje ir Latvijoje aptinkami B ir F haplotipai. Kiekvieną iš šių haplotipų reprezentavo 80 ešerių mtDNR sekų. Iš viso haplotipų tinklą sudaro 53 skirtingi haplotipai, iš kurių 17 nustatyti pirmą kartą atliekant molekulinis tyrimus disertacinio darbo metu. Keturi iš šių haplotipų (B5, B6, B7 ir C5) nustatyti tik Drūkšių ežero ešerių imtyje. Haplotipas F, dažniau aptinkamas Lietuvos ešerių imtyse, neaptiktas Drūkšių ežere bei visose Latvijos ežerų ešerių imtyse, išskyrus Babytės ežero



ešerių imtį. Šis haplotipas didesniu dažniu aptinkamas arčiau Baltijos jūros įsikūrusiose ešerių populiacijose.

Remiantis metodinėje disertacinio darbo dalyje aprašytais haplogrupių identifikavimo principais visi ešerių haplotipai sugrupuoti į devynių ešerio mtDNR D-kilpos regiono haplogrupių tinklą. Taigi, visus 53 haplotipus galime priskirti 9 haplogrupėms. Didžiausia įvairovė, trylika haplotipų, pasižymėjo haplogrupė B. Ešerių haplogrupių pasiskirstymo ypatumai Lietuvos vakarinėje ir rytinėje dalyse bei Latvijos vakarinėje ir pietrytinėje dalyse pateikti 9 pav.

## Rezultatų aptarimas

**Ungurių rūšinės priklausomybės nustatymas.** Gauti rezultatai vienareikšmiškai patvirtina, kad *A. anguilla*, *A. rostrata* ir *A. japonica* rūšių identifikacija, analizuojant mtDNR D-kilpos regiono 450-455 bp ilgio homologines sekas, buvo patikima. Remiantis disertacinio darbo metu atliktais *Anguilla* genties rūšių mtDNR D-kilpos regiono tyrimais, galima teigti, jog šiuo metu *A. japonica* ir *A. rostrata* rūšių, tiek tirtuose Lietuvos vidaus vandens telkiniuose, tiek Lietuvos teritoriniuose vandenyse nėra.

***A. anguilla* DNR mikrosatelitų tyrimų rezultatų aptarimas.** Disertacinio darbo rezultatai patvirtina, jog unguariai, kurie yra aptinkami Baltijos jūroje, Kuršių mariose ir Rygos įlankoje, gali būti vertinami kaip viena ATPL unguarių grupė, o skirtinguose Lietuvos ežeruose gyvenantys unguariai pasižymi skirtinga genetinė įvairovė. Kadangi Lietuvos ežeruose būdavo paleidžiami unguarių jaunikliai, pagaunami Anglijoje ir Prancūzijoje skirtingais metais, tad racionalu manyti, jog skirtingų atvežamų ir išleidžiamų unguarių jauniklių partijų genotipai žymiai skyrėsi. Toks palaiptis vykdomas vis naujų unguarių grupių introdukavimas į Lietuvos ežerus turėjo įtakoti Lietuvos ežerų unguarių genetinės įvairovės formavimąsi. Šią prielaidą patvirtina disertacinio darbo rezultatai, gauti nustačius patikimą genetinę diferenciaciją tarp Dringio ir Siesarčio ežerų unguarių imčių (3 lentelė, IV analizė).

Reziumuojant, disertacinio darbo metu atliktas unguarių DNR mikrosatelitų tyrimas pagrindinai buvo skirtas išsiaiškinti ATPL ir INTR unguarių grupių ypatybes ir skirtumus. Tenka konstatuoti, kad mikrosatelitiniai žymenys neatskleidė statistiškai patikimų genetinės įvairovės skirtumų tarp ATPL ir INTR unguarių grupių. Siekiant patikrinti panmiksijos hipotezę *A. anguilla* rūšyje, buvo nuspręsta naudoti mtDNR molekulinis žymenis.

***A. anguilla* mtDNR D-kilpos regiono tyrimų rezultatų aptarimas.** Ištyrus 81 unguarį, iš viso Europoje buvo nustatyti 75 skirtingi mtDNR D-kilpos regiono haplotipai, priklausantys 30

haplogrupių (Lintas *et al.* 1998, Minegishi *et al.* 2005 bei nepublikuotas Murgia R., Tola G., Hirano J. ir Archer S. N. tyrimas). Disertacinio darbo metu buvo ištirti 148 unguniai. Nustatyti 107 skirtingi haplotipai, priklausantys 39 haplogrupėms. Apjungus disertacinio darbo ir ankstesnių tyrėjų duomenis, analizuoti 229 sekų duomenys. Gauti rezultatai yra dviprasmiški, nes vieni iš jų paremia panmiksijos hipotezę *A. anguilla* rūšyje, o kiti – neigia šią hipotezę. Pagrindiniai argumentai už šios rūšies panmiksiją: 1) nenustatyta patikima genetinė diferenciacija tarp įvairių lyginamų ungunių imčių; 2) atsitiktinis dažnesnių haplotipų, haplogrupių ir superhaplogrupių paplitimas skirtinguose geografiniuose regionuose. Pagrindiniai argumentai prieš šios rūšies panmiksiją: 1) ungunių populiacinė-genetinė struktūra identifikuojama kaip genetinė mozaika; 2) fragmentuotai aptinkamos retos haplogrupės bei superhaplogrupės; 3) neatsitiktinis haplotipų, kurie yra artimi evoliuciškai, paplitimas mikrogeografiniu mastu; 4) ŠJR ir VJR ungunių imčių genetinės įvairovės charakteristikų skirtumai, lyginant su kitomis ungunių imtimis. Tarp introdukuotų į Lietuvos ežerus ungunių genetinės įvairovės ir Šiaurės jūroje bei Baltijos jūroje esančios ungunių genetinės įvairovės nėra žymių skirtumų. Tačiau, nustatyti žymūs genetinės įvairovės skirtumai, kuriuos atspindi skirtingi haplotipai ir haplogrupės, ar net superhaplogrupės, tarp Lietuvos ežerų ungunių imčių.

Apibendrinant visus gautus duomenis galime teigti, jog pagal motininę liniją europinis upinis ungunys yra panmiksinė rūšis, tačiau daugėja įrodymų, kad ankstesniais rūšies evoliucionavimo etapais ši žuvis panmiksija nepasižymėjo.

***A. anguilla* mtDNR cyt b tyrimų rezultatų aptarimas.** Ištyrus 119 ungunių, iš viso Europoje ir šiaurės Afrikoje buvo nustatyta 20 skirtingų mtDNR cyt *b* haplotipų, priklausančių 8 haplogrupėms (Aoyama & Tsukamoto 1997, Wolf *et al.* 2000, Aoyama *et al.* 2001, Daemen *et al.* 2001, Lin *et al.* 2001, Minegishi *et al.* 2005 ir GenBank duomenys (EF427617-EF427618, EU223996-EU223997, EU492326-EU492327)). Disertacinio darbo metu buvo ištirti 82 unguniai. Nustatyta 14 skirtingų ir ankstesnių tyrimų metu neaptiktų haplotipų, priklausančių 7 haplogrupėms. Apjungus disertacinio darbo ir ankstesnių tyrėjų duomenis, analizuoti 201 sekos duomenys. Gauti rezultatai rodo, kad europinis upinis ungunys pasižymi genetinė mozaika. Pažymėtina, jog pirmąkart nustatytos statistiškai patikimos  $\Phi_{ST}$  vertės naudojant mtDNA cyt *b* žymenį.

Statistiškai patikima ( $p < 0,05$ ) genetinė diferenciacija tarp ATPL ir INTR ungunių grupių, naudojant cyt *b* tyrimų duomenis, nenustatyta. Tačiau Siesarčio ir Dringio ežeruose gyvenantys unguniai pasižymi genetinės įvairovės skirtumais, nes kiekviename iš jų aptikta skirtingų haplotipų. Analizuojant europinio upinio ungunio mtDNR D-kilpos regiono ir cyt *b* tyrimų

rezultatus išryškėja, jog dviejų skirtingų mtDNR genetinių žymenų panaudojimas leidžia atskleisti panašias genetinės įvairovės formavimosi tendencijas.

**A. *anguilla* rūšies genetinė mozaika.** Kadangi iki šiol pasaulyje per mažai dėmesio buvo skiriama europinio upinio unгурio vidurūšinės evoliucijos tyrimams, tad pagrindinė genetinės mozaikos atsiradimo šios rūšies populiacijoje priežastis likdavo neišaiškinta. Detalesni disertacinio darbo metu atlikti europinio upinio unгурio vidurūšinės evoliucijos tyrimai atskleidė, kad pagrindinė genetinės mozaikos atsiradimo unгурio populiacijoje priežastis – skirtingų unгурių evoliucinių linijų egzistavimas. Gauti duomenys suponuoja, kad pagrindinė priežastis, dėl kurios nustatoma genetinė mozaika europinio upinio unгурio rūšyje, negali būti paaiškinta genetinio nevienalytiškumo, chaotiško genetinio nevienodumo ir/ar Hedgecocko efekto sąvokomis (Selkoe *et al.* 2010, Hedgecock & Pudovkin 2011, Pujolar *et al.* 2011).

**A. *anguilla* rūšies populiacinės-genetinės struktūros formavimąsi įtakoję veiksniai.** Galime išskirti dvi galimas priežastis, dėl kurių šiuo metu yra priimta manyti, kad europinis upinis unгурys yra panmiktinė rūšis: 1) unгурių nerštaviečių bei maitinimosi vietų geografinės lokacijos pokyčiai, įtakoti ledynmečio; 2) įžuvinimas, galėjęs kardinaliai paveikti unгурių skaitlingumą ar net migracinę elgseną.

Apibendrinant galima konstatuoti, kad disertacinio darbo metu tarp ATPL ir INTR unгурių grupių nustatyti genetinės įvairovės skirtumai buvo nedideli bei statistiškai nereikšmingi. Todėl vertėtų tęsti unгурių genetinės įvairovės tyrimus, orientuotus į siekį sukaupti duomenis, įrodančius, kad intensyvi antropogeninė veikla, susijusi su dešimtmečius trunkančia stiklinių unгурių įžuvinimo politika Europoje bei intensyvi suaugusių unгурių žvejyba turi (arba neturi) lemiamos įtakos rūšies skaitlingumo mažėjimui, migracinės elgsenos pokyčiams bei diferencijuotos genetinės struktūros praradimui.

**Reproduktyviai izoliuotos A. *anguilla* individų grupės.** Jei būtų įrodyta, kad A. *anguilla* rūšyje egzistuoja lokaliai populiacijos, t. y. reproduktyviai izoliuotos unгурių grupės, kurių daugelio kartų atstovai sugeba sugrįžti į jų tėvų nerštavietes, tuomet panmiksijos hipotezė šioje rūšyje turėtų būti atmesta. Nors iki šiol lokalių unгурių populiacijų nenustatyta, bet apie jas diskutuojama (Kettle & Haines 2006, Maes & Volckaert 2007). Disertacinio darbo duomenys neleidžia atmesti panmiksijos hipotezės A. *anguilla* rūšyje, bet taip pat indikuoja, kad anksčiau lokaliai unгурių populiacijos egzistavo.

**Drūkšių ežero ešerių populiacijos ypatybės.** Nors antropogeninio poveikio įtaka Drūkšių ežero ichtiofaunai buvo akivaizdi, tačiau iki šiol per mažai dėmesio buvo skiriama šio

ežero žuvų rūšių populiacinės-genetinės struktūros tyrimams. Todėl siekiant įvertinti žmogaus ūkinės veiklos, susijusios su atominės energetikos vystymu, galimą poveikį verslinių žuvų rūšių populiacinės-genetinės struktūros formavimuisi, disertacinio darbo metu buvo inicijuoti ešerių, kaip patogios modelinės rūšies, natūraliai paplitusios Europos vandenyse, variabilaus mtDNR D-kilpos regiono genetinės įvairovės tyrimai Drūkšių ežero ir kituose Lietuvos ir Latvijos vidaus vandens telkiniuose. Atliktų tyrimų rezultatai rodo, jog Drūkšių ežero ešerių populiacija statistiškai patikimai ( $p < 0,05$ ) skiriasi nuo visų kitų disertacinio darbo ir Sruoga *et al.* (2007b) tyrimo metu tirtų Lietuvos ir Latvijos ešerių populiacijų. Be to, Drūkšių ežero imtyje aptikti B5, B6, B7 ir C5 haplotipai, kurie iki šiol nebuvo aptikti kitose Eurazijos lokacijose (8 pav.). Mažiausia genetinė diferenciacija nustatyta tarp NER ir DRŪ ešerių imčių ( $\Phi_{ST} = 0,03041$ ,  $p < 0,01$ ), o didžiausia – tarp MET ir DRŪ ešerių imčių ( $\Phi_{ST} = 0,38966$ ,  $p < 0,001$ ). Režiumuojant, šiuo metu turimi disertacinio darbo duomenys rodo, kad Drūkšių ežero ešerių populiacijos genetinių skirtumų nuo kitų Lietuvos ešerių populiacijų atsiradimui labiausiai turėjo įtakos istoriniai gamtiniai procesai, vykę ledynmečio metu.

**Ešerių populiacijų genetinės diferenciacijos ypatybės Lietuvoje ir Latvijoje.** Iki šiol ešerių populiacijų, gyvenančių Lietuvoje ir Latvijoje, populiacinės genetikos tyrimai buvo gana fragmentiški. Atlikti disertacinio darbo metu tyrimai rodo, kad didžiausi ešerių populiacijų genetiniai skirtumai nustatomi, lyginant vakarų Lietuvos ir Latvijos ešerių populiacijas su rytų Lietuvos ir pietryčių Latvijos ešerių populiacijomis.

**Ešerių haplotipų ir haplogrupių paplitimas Europoje.** Ištyrus 489 ešerius, iš viso Eurazijoje, neįskaitant Lietuvos ir Latvijos, nustatyti 35 skirtingi mtDNR D-kilpos regiono haplotipai, priklausantys devynioms haplogrupėms (Nesbø *et al.* 1998b, Refseth *et al.* 1998, Nesbø *et al.* 1999 ir viena seka iš GenBank (EF118012)). Dažniausiai Eurazijoje paplitę F ir C haplotipai. Norvegijoje buvo nustatyta didžiausia haplogrupės A haplotipų įvairovė: A, A1, A2, A3, A4 ir A5 haplotipai. Kadangi Estijos ešerių imtyse aptikti B1 ir B2 haplotipai, kurie nebuvo aptikti Lietuvoje ir Latvijoje, priklauso haplogrupei B, tad galima teigti, jog kiekvienoje iš Baltijos šalių aptinkama savita ešerių genetinė įvairovė, kurios formavimasis buvo įtakotas panašių ar net bendrų istorinių gamtinių procesų.

Disertacinio darbo metu ištyrus 262 ešerius, kurie buvo pagauti Lietuvos ir Latvijos vidaus vandenyse, nustatyti 29 skirtingi haplotipai, priklausantys 7 haplogrupėms. Iš šių 29 haplotipų, 21 haplotipas buvo aptiktas tik disertacinio darbo metu tirtose ešerių imtyse. Kadangi, ankstesnio Sruoga *et al.* (2007b) tyrimo metu vakarų Lietuvos bei Latvijos ešerių imtyse nustatyti aštuoni haplotipai (A2, D1, E ir G bei F4, H1, L1 ir L2, atitinkamai) neaptikti Lietuvos

ir Latvijos vidaus vandens telkinių ešerių imtyse, tad iš viso Lietuvoje ir Latvijoje nustatyti 37 skirtingi haplotipai, reprezentuojantys visas haplogrupes, išskyrus haplogrupę M, kuri aptinkama pietų Europoje. Ešerių haplotipų paplitimo palyginimas Europos mastu atskleidžia Baltijos šalyse gyvenančių ešerių populiacijų genetinės įvairovės ypatumus: Baltijos šalyse neaptikta haplogrupės M atstovų, o dominuoja haplogrupė B, kuri yra reta arba neaptinkama kituose Europos regionuose (10 pav.). Remiantis tyrimo rezultatais galime teigti, kad nuo Lietuvos pietvakarinės dalies iki Latvijos centrinės dalies plyti kelių skirtingų ešerių genetinių linijų kontaktinė zona.

Apibendrinant, iki šiol iš viso Eurazijoje, įskaitant disertacinio darbo ešerių imtis, buvo iširti 807 ešeriai ir nustatyta 60 skirtingų haplotipų, priklausančių 9 haplogrupėms. Pastebėta, jog arčiau Baltijos jūros įsikūrusiose ešerių populiacijose, tipišku atveju, aptinkama šiek tiek didesnė haplogrupių įvairovė, lyginant su rytuose gyvenančiais ešeriais, tačiau rytų Lietuvoje ir Latvijoje aptinkama daugiau haplogrupių A, B ir C atstovų.

## IŠVADOS

1. Sukonstruota originalių pradmenų pora *Ang1* yra tinkama europinio upinio ungurio vidurūšinės genetinės įvairovės tyrimams bei gali būti panaudota *A. anguilla* ir *A. japonica* rūšių identifikacijai.
2. Naudojant skirtingus europinio upinio ungurio DNR molekulinis žymenis nustatyta, jog europinis upinis ungurys pasižymi santykinai didele genetinė įvairove, o šios rūšies populiacinei-genetinei struktūrai būdinga genetinė mozaika, kurios susiformavimą lemia reproduktyviai izoliuotos grupės. Visų genetinės įvairovės charakteristikų vertės buvo didesnės mtDNR D-kilpos regione, lyginant su tiriama *cyt b* geno sritimi.
3. Atlikus penkių DNR mikrosatelitinių regionų analizę nustatyta patikima genetinė diferenciacija tarp skirtingų Lietuvos ir Latvijos vidaus ir teritoriniuose vandenyse sugautų ungurių imčių.
4. Natūraliai į Lietuvą ir Latviją atplaukiančių ir introdukuotų Lietuvos ežeruose ungurių grupės pasižymi genetinės įvairovės skirtumais, tačiau šie skirtumai nėra statistiškai reikšmingi. Atliktų tyrimų duomenys parodo, jog natūraliai atplaukusių ir įžuvintų ungurių kiekybinai genetinės įvairovės parametrai yra panašūs. Skirtinguose Lietuvos ežeruose įžuvinti unguriai skiriasi mtDNR haplotipų įvairove.
5. Naudojant ešerio mtDNR D-kilpos regiono žymenis nustatyta, kad ešerių populiacijos, kurios gyvena vandens telkiniuose, esančiuose šalia Baltijos jūros, ir ešerių populiacijos,

kurios aptinkamos Baltijos šalių rytuose pasižymi skirtinga haplotipų įvairove bei yra genetiškai diferencijuotos.

6. Baltijos šalyse gyvenantys ešeriai pasižymi didžiausia haplogrupės B haplotipų įvairove, nebūdinga kitiems Europos regionams. Iš viso Lietuvos ir Latvijos vidaus vandenyse nustatyta 30 skirtingų ešerių haplotipų, iš kurių 21 haplotipas aptiktas pirmą kartą.
7. Drūkšių ežero ešerių populiacija yra savita ir genetiškai diferencijuota nuo visų kitų Lietuvos ir Latvijos vidaus ir teritoriniuose vandenyse gyvenančių ešerių populiacijų, o nustatytų genetinių skirtumų atsiradimui didžiausią įtaką turėjo istoriniai gamtiniai procesai, vykę ledynmečio metu.

## ARTICLES ON THE SUBJECT OF THE THESIS

1. Sruoga A, Butkauskas D, **Ragauskas A**, Ložys L (2007) Investigation of genetic variability in the European eel (*Anguilla anguilla* (L.)) in Lithuania using microsatellite DNA markers. *Acta Zoologica Lituanica* 17:116-123. ISSN 1392-1657
2. Butkauskas D, **Ragauskas A**, Sruoga A, Ložys L, Tzeng WN (2009) Current knowledge about European eel *Anguilla anguilla* (L.) mtDNA D-loop region haplotypic variety. *Acta Zoologica Lituanica* 19:253-267. ISSN 1648-6919
3. **Ragauskas A**, Butkauskas D, Sruoga A (2011) *Anguilla anguilla* ir *A. japonica* individų rūšinės priklausomybės nustatymas molekulinio metodu, pagrįstu mtDNR D-kilpos regiono homologinių sekų analize (Molecular technique for *Anguilla anguilla* and *A. japonica* specimens discrimination based on comparison of homologous mtDNA D-loop region sequences). *Veterinarija ir Zootechnika* 55:47-52. ISSN 1392-2130
4. Butkauskas D, **Ragauskas A**, Sruoga A, Kesminas V, Ložys L, Rashal I, Tzeng WN, Žalakevičius M (2012) Investigations into genetic diversity of the perch inhabiting Ignalina Nuclear Power Plant cooler and other inland water bodies of Lithuania on the basis of mtDNA analysis. *Veterinarija ir Zootechnika* 60:7-15. ISSN 1392-2130

## ABSTRACTS OF CONFERENCE REPORTS

1. **Ragauskas A**, Butkauskas D, Sruoga A (2009) Investigation into the haplotypic structure of the European eel *Anguilla anguilla* (L.) population based on mtDNA D-loop sequence analysis. 5th International Conference, Research and Conservation of Biological Diversity in Baltic Region: 113. Daugavpils
2. **Ragauskas A**, Butkauskas D, Sruoga A (2009) European eel *Anguilla anguilla* (L.) mtDNA D-loop region sequence analysis and species conservation. International Conference, Biodiversity, Protection and Prospects of Baltic Seashore Habitats: 43. Klaipėda
3. **Ragauskas A**, Butkauskas D, Sruoga A (2009) Genetic diversity of the European eel *Anguilla anguilla* (L.): A case study in the Lithuania. 4th International Student Conference, Biodiversity and Functioning of Aquatic Ecosystems in the Baltic Sea Region: 5. Dubingiai
4. **Ragauskas A**, Butkauskas D, Sruoga A (2010) Discrimination of *Anguilla anguilla* and *A. japonica* species by comparison of homologous mtDNA D-loop region sequences. 5th International Student Conference, Biodiversity and Functioning of Aquatic Ecosystems in the Baltic Sea Region: 69-70. Palanga
5. Butkauskas D, **Ragauskas A**, Sruoga A, Ložys L, Rashal I, Tzeng WN, Žalakevičius M (2011) Current knowledge based on D-loop data about perch population genetic structure and phylogeography in the Baltic States. Joint Symposium for the International Collaborative Study among Taiwan-Lithuania-Latvia, Evaluation of Nuclear Power Impact on Perch (*Perca fluviatilis*) Population by means of Genetic Based Analysis and Application of Fish Otoliths as Natural Recorders of Radiocontamination and Thermal Pollution: 29-39. Keelung
6. Butkauskas D, **Ragauskas A**, Sruoga A, Ložys L, Rashal I (2012) D-loop sequence variation and phylogeographic relationships of perch populations in the Baltic region. 5th International Conference, Baltic Congress of Genetics: 27. Kaunas

## CURRICULUM VITAE

**Name and Surname:** Adomas Ragauskas.

**Date and Place of birth:** 11 November 1983, Vilnius.

**Contacts:** Home address: Vilnius, Konarskio 28A-13, LT-03127. Office address: Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre, Vilnius, Akademijos 2, LT-08412. Mobil phone: +370 62542227. E-mail: adomas.ragauskas@gmail.com

**Education:** In 2002, I finished Jonas Basanavičius secondary school in Vilnius and entered the Faculty of Natural Sciences (FNC) of Vilnius University (VU) where I studied according to the Molecular Biology program (61201B105). In 2006, I graduated from University with a Bachelor's Degree in Molecular Biology. In 2008, I completed the new studies according to the Genetics program (62101B105) at the FNC of VU and obtained a Master's Degree in Genetics. In 2008, I started my PhD studies according to the Ecology and Environmental Research program (03 B) and joined the Institute of Ecology of Vilnius University (later this Institute become part of the Nature Research Centre (NRC)). I prepared the thesis at the Laboratory of Molecular Ecology of NRC. In 2010, I finished a 140-hour English course at the Department of Foreign Languages of the Lithuanian Academy of Sciences and was given B2 level.

**Work experience:** On 3 December 2012 I filled the position of a senior assistant position. Since 1 February 2013 I have occupied the position of a biologist at the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

**Research interests:** investigations into anthropogenic influence on the formation of the population genetic structure of commercially exploited fish species, especially the representatives of genus *Anguilla* and *Perca*, using molecular markers. Ichthyology and molecular ecology.

**Awards for Scientific activities:** In 2009, I won a PhD scholarship from the Lithuanian State Science and Studies Foundation (currently the Lithuanian State Studies Foundation). In 2010 and 2011, I was also granted PhD scholarships from the Lithuanian State Studies Foundation. In 2012, I gained a PhD scholarship from the Lithuanian Science Council.

**Foreign Language:** english.

**Faith:** christian.