

ANGUILLA ANGUILLA IR A. JAPONICA INDIVIDŲ RŪŠINĖS PRIKLAUSOMYBĖS NUSTATYMAS MOLEKULINIŲ METODŲ, PAGRĖSTŲ mtDNR D-KILPOS REGIONO HOMOLOGINIŲ SEKŲ ANALIZE

Adomas Ragauskas¹, Dalius Butkauskas¹, Aniolas Sruoga²

¹Gamtos tyrimų centras, Akademijos g. 2, LT-08412 Vilnius

tel. (8~5) 272 9287; faks.: (8~5) 272 9107; el. paštas: adomas.ragauskas@gmail.com

²Vytauto Didžiojo universitetas, K. Donelaičio g. 58, LT-44248 Kaunas

el. paštas: a.sruoga@gmf.vdu.lt

Santrauka. Įgyvendinant CITES konvencijos reikalavimus, norint nustatyti *Anguilla* sp. individų rūšinę priklausomybę, taikytas molekulinis metodas, pagrįstas PGR su Ang1 pradmenų pora, skirta amplifikuoti *A. anguilla* mtDNR D-kilpos regioną, ir gautų mtDNR fragmentų bei kelių *A. anguilla*, *A. rostrata* ir *A. japonica* sekų iš „GenBank“ homologinių sekų analize. Tyrimų rezultatai vienareikšmiškai patvirtina, kad *A. anguilla*, *A. rostrata* ir *A. japonica* rūšių identifikacija, analizuojant mtDNR D-kilpos regiono 450-455 bp homologines sekas, yra patikima. Panaudojus abejotinos kilmės 31 individo audinių pavyzdžius nustatyta, kad visos tirtos mtDNR D-kilpos regiono sekos priklauso *A. japonica* rūšiai ir priskirtinos skirtingiems haplotipams. Taikytas molekulinis metodas atitinka tarptautinius rūšies identifikavimo reikalavimus ir gali būti alternatyva kitiems metodams.

Raktažodžiai: *Anguilla* sp., molekulinis metodas, D-kilpa, rūšies identifikacija.

MOLECULAR TECHNIQUE FOR *ANGUILLA ANGUILLA* AND *A. JAPONICA* SPECIMENS DISCRIMINATION BASED ON COMPARISON OF HOMOLOGOUS mtDNA D-LOOP REGION SEQUENCES

Adomas Ragauskas¹, Dalius Butkauskas¹, Aniolas Sruoga²

¹Nature Research Center, Akademijos str. 2, LT-08412 Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 272 9287; e-mail: adomas.ragauskas@gmail.com

²Vytautas Magnus University, K. Donelaičio str. 58, LT-44248 Kaunas, Lithuania; e-mail: a.sruoga@gmf.vdu.lt

Summary. In order to clarify whether declared eels belong to *A. japonica* species or not, molecular technique which is based on PCR with Ang1 primer pair and alignment of newly obtained sequences with homologous *A. anguilla*, *A. rostrata* and *A. japonica* sequences from the GenBank, was used. It was shown that identification of *A. anguilla*, *A. rostrata* and *A. japonica* species based on analysis of 450-455 bp homologous mtDNA D-loop region sequences is reliable. After the study of 31 eels of uncertain origin it became clear that all investigated mtDNA D-loop region sequences belong to *A. japonica* species. Since this molecular technique is a powerful tool for *A. anguilla* and *A. japonica* discrimination, thus it could be used as an alternative to other methods.

Keywords: *Anguilla* sp., molecular technique, D-loop, species identification.

Įvadas. Upiniai unguriai (*Anguillidae*) yra senos kilmės gyvatės formos žuvis, kurioms būdingas sudėtingas gyvenimo ciklas (Lecomte-Finiger, 2003). Šiai šeimai priklauso tik viena gentis – *Anguilla* sp. Kadangi iš išvaizdos šios žuvis panašios viena į kitą, jų taksonomija yra sudėtinga ir neišbaigta (Lin et al., 2002; Watanabe et al., 2005). Šiuo metu pasaulyje žinoma 20 ungiurių rūšių bei porūšių (Aoyama, 2009; Teng et al., 2009). Įdomu tai, jog net dvi rūšys aptiktos visai neseniai (Teng et al., 2009; Watanabe et al., 2009). Dauguma *Anguilla* sp. atstovų gyvena tropikuose (Lehmann et al., 2000), bet šešios rūšys ir porūšiai randamos vidutinių platumų klimato juostoje. Skirtingose klimato juostose gyvenančių ungiurių rūšių ekologija ir reikšmė žmogui skiriasi (Aoyama, 2009; Wouthuyzen et al., 2009). Tropikų žuvis iki nerštaviečių migruoja ne daugiau kaip 500 km, o amerikinis ungiuris *A. rostrata* iki nerštavietės, kuri, manoma, yra Sargaso jūroje, turi nuplaukti bent 900 km (Aoyama et al., 2003). Dar toliau turi nuplaukti paprastasis ungiuris *A. anguilla* (Bonhommeau et al., 2008), kuris taip pat, manoma,

neršia Sargaso jūroje (Westin, 2003), ir japoninis ungiuris *A. japonica*, kurio nerštavietė aptikta netoli Marianų salų (Chow et al., 2009). Šios trys ungiurių rūšys nuo seno turi didelę komercinę reikšmę. Kitos dvi vidutinių platumų klimato juostoje gyvenančios rūšys (*A. australis* ir *A. deffenbachii*) yra menkiausiai komerciškai eksploatuojamos (Aoyama, 2009), o dauguma tropikuose gyvenančių ungiurių rūšių labiau yra svarbios moksliniu (Lin et al., 2005; Wouthuyzen et al., 2009) nei komerciniu požiūriu.

Kadangi prieš kelis dešimtmečius ženkliai sumažėjo *A. anguilla*, *A. rostrata* ir *A. japonica* ištekliai, suintensyvėjo prekyba stikliniais ungiuriukais tarp skirtingų geografinių regionų (Hwang et al., 2004) ir tų pačių regionų skirtingų šalių (Westin, 2003). Deja, tokia veikla išteklių nepagausino, o tik iškreipė šių rūšių natūralų paplitimą; tas tik sukėlė dar daugiau problemų (Maes, Volckaert, 2007). Pastaruoju metu šios žuvis nyksta, dėl to labai susirūpinta jų apsauga. Pavyzdžiui, norint apsaugoti *A. anguilla* rūšį, prieš kelerius metus nuspręsta ją įrašyti į CITES sąrašą (Bonhommeau et al.,

2008). Tas lėmė ženklų šios rūšies žuvies transportavimo į Azijos rinką sumažėjimą ir griežtą kontrolę prekiaujant. Esant tokiai situacijai, prekyba bei vandens telkinių įžuvinimas *A. rostrata* ir *A. japonica* stikliniais unguriukais Europos šalyse intensyvės. Taip pat tikėtina, kad daugės sukčiavimo atvejų, nes skirtingas *Anguilla* sp. rūšis atskirti vien tik pagal morfometrinius duomenis yra sudėtinga (Lehmann et al., 2000). Dėl minėtų priežasčių norint nustatyti konkrečių *Anguilla* sp. individų rūšinę priklausomybę, būtina taikyti molekulinės technologijas.

Darbo tikslas – nustatyti tiriamų *Anguilla* sp. individų rūšinę priklausomybę amplifikuojant abejotinos kilmės pavyzdžių mtDNR D-kilpos regioną, nustatyti šio pagausinto DNR fragmento seką bei filogenetinės analizės būdu palyginti su *A. anguilla*, *A. rostrata* ir *A. japonica* rūšių homologinėmis sekomis, identifikuojant tiriamojo pavyzdžio rūšį.

Medžiagos ir metodai. Šį darbą 2009 metų rudenį inicijavo Klaipėdos teritorinė muitinė, kai buvo sulaikyta 25 tonų *A. japonica* siunta. Anksčiau ungių tiekėjo siuntos buvo tikrintos keliose muitinėse – Lenkijos ir Jungtinės Karalystės. Paaškęjus, kad tarp deklaruotų *A. japonica* individų yra *A. anguilla*, dėl Klaipėdos uoste sulaikytos ungių siuntos buvo kreiptasi į tuometinio VU Ekologijos instituto Molekulinės ekologijos laboratoriją su prašymu nustatyti, ar nesikartoja tiekėjo pažeidimai. Be to, pagal Europos Bendrijos muitinės kodeksą ir CITES konvencijos reikalavimus *Anguilla* sp. rūšių identifikacija turi būti pagrįsta molekuliniiais metodais. Remiantis atsitiktinių mėginių parinkimo principu, iš skirtingų dėžių su sušaldytais ungių buvo pasirinkti konkretūs individai ir iš jų paimti raumeninio audinio pavyzdžiai DNR išskirti. Iš viso rūšiai identifikuoti panaudoti 31 individo pavyzdžiai. DNR buvo išskirta standartiniu metodu (Aljanabi, Martinez, 1997) su nežymiais pakeitimais. PGR buvo atlikta su „Eppendorf Mastercycler personal“ prietaisu naudojant Ang1 (Butkauskas et al., 2009) pradmenų porą: Ang1-F (5'-TCGGTTTTGTAATCCGAAGA-3') ir Ang1-R (5'-CCAAATGCCAGTAATAGTTCATTTTA-3'). Oligonukleotidai susintetinti „biomers.net GmbH“. PGR buvo naudojamas 25 µl reakcijos mišinys: 5 µl išskirtos DNR, kurios koncentracija buvo 50 µg/ml; 0,75 µl „Taq DNA Polymerase LC (Fermentas)“; 2,5 µl „Taq buffer + KCl (Fermentas)“; 2,5 µl MgCl₂ (Fermentas); 2,5 µl dNTP (2 mM, Fermentas); 1 µl Ang1-F; 1 µl Ang1-R ir dejonizuotas vanduo. Reakcijos ciklai: pradinė denatūracija (95°C temperatūroje 5 min), po jos vykę 35 amplifikavimo ciklai (94°C temperatūroje denatūracija – 45 s), 54°C temperatūroje pradmenų hibridizacija – 45 s), 72°C temperatūroje ilginimo žingsnis (1 min)) ir galutinis ilginimo žingsnis (72°C temperatūroje 5 min).

Po amplifikacijos buvo atliekama standartinė elektroforezė 1,5 proc. agarozės gelyje su „Pharmacia Gel GNA-100“ prietaisu, norint išsiaiškinti, ar mėginiai tinkami DNR sekvenuoti. Tada gelis buvo stebimas UV šviesoje su prietaisu „Biometra BioDocAnalyze“. Sėkmingai amplifikavęsi mėginiai būdavo išgryninami: 5 µl amplifikatas sumaišomas su 1 µl FastAP (Fermentas) ir 0,5 µl egzonukleaze I (Fermentas), o gautas mišinys

šildomas 15 min 37°C ir 15 min 85°C temperatūroje. DNR sekvenavimas atliktas Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre, naudojant išgrynintus PGR produktus, Ang1-F ir Ang1-R pradmenis, „Big-Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)“ ir „3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)“. Nukleotidų sekų chromatogramos įvertintos pagal „CHROMAS 2.33 (www.techneleysium.com.au)“ programą. Homologinių sekų analizė (450–455 bp) atlikta šio tyrimo metu nustatytas sekas palyginus su „GenBank“ duomenų bazėje pateiktomis sekomis: *A. anguilla* – AJ225953, AJ225956, AJ225969, FJ707257, FJ707264, FJ707265, FJ707273; *A. rostrata* – AP007249, AB030662; *A. japonica* – AM997243, AM997253, AM997255, AM997258, M95867. Naudojantis „CLC Sequence Viewer 5.1.1 (www.clcbio.com)“ programa pagal UPGMA algoritmą sukonstruotas filogenetinis medis. Haplotipų lentelė sudaryta pagal MEGA4 (Tamura et al., 2007) programą.

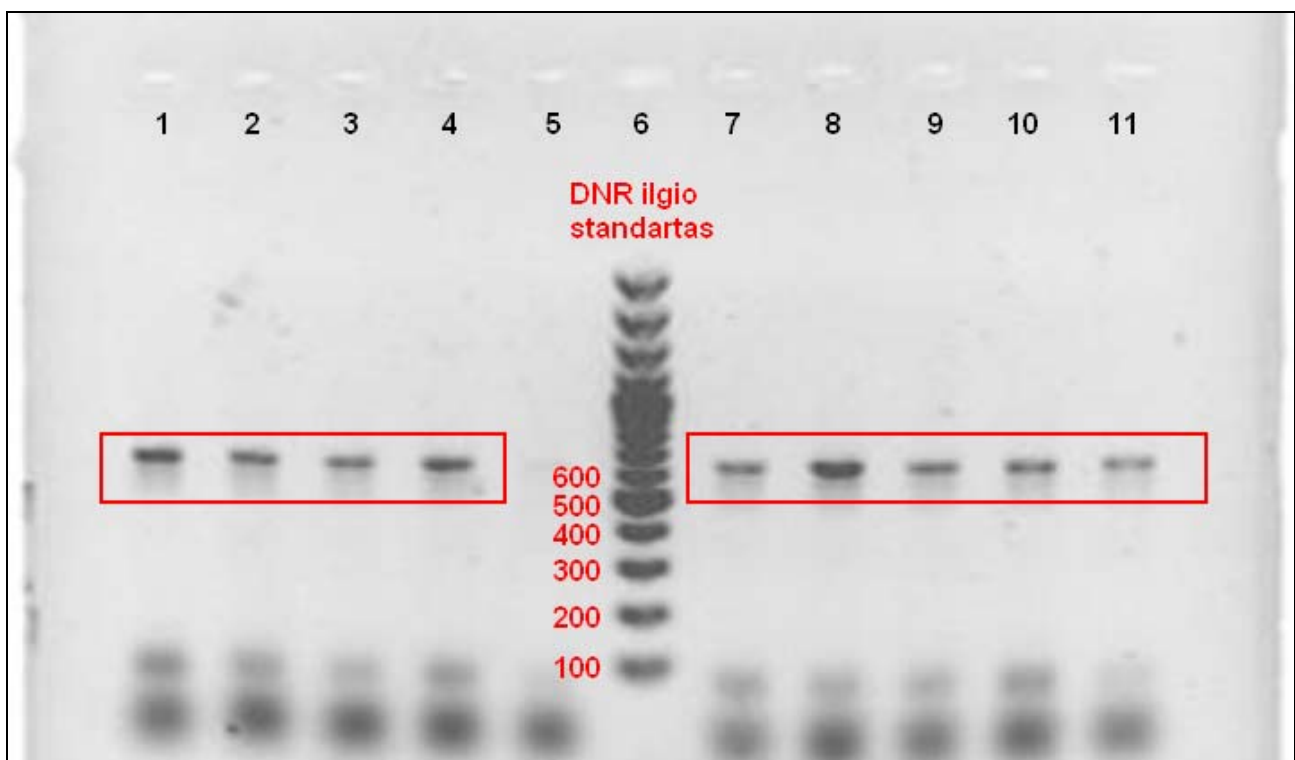
Tyrimų rezultatai. Panaudojus pradmenis, sukurtus *A. anguilla* rūšies individų D-kilpos sekoms pagausinti, buvo amplifikuoti 630 bp ilgio 31 tiriamojo ungių DNR pavyzdžiai (1 pav.) ir sekvenuotos mtDNR D-kilpos sekos. Palyginus tiriamąsias sekas tarpusavyje, nustatyta, kad jos reprezentuoja skirtingus haplotipus (2 pav.). Atlikus tiriamų ir iš „GenBank“ duomenų bazės paimtų keturiolikos 450–455 bp homologinių sekų palyginamąją analizę paaiškėjo, kad visos tiriamos sekos priklauso *A. japonica* rūšiai. Tiriamosios sekos priskirtos *A. japonica* rūšiai pagal jų individualų grupavimąsi UPGMA filogenetiniame medyje kartu su *A. japonica* sekomis, kai *A. anguilla* ir *A. rostrata* rūšims priskiriamos sekos grupavosi į atskirus klasterius (3 pav.). Kai tyrimo metu nustatytos *A. japonica* 500 bp ilgio sekos buvo palygintos su 143 *A. japonica* rūšies homologinėmis sekomis iš „GenBank“ duomenų bazės, paaiškėjo, kad nustatyti penki haplotipai jau buvo aptikti anksčiau, o tarp 174 tirtų individų net 153 buvo skirtingų haplotipų.

Tyrimų medžiagos aptarimas. Pirmoji publikacija, skirta apibendrinti *A. anguilla* populiacinę-genetinę struktūrą Lietuvoje, naudojant mtDNR D-kilpos regioną kaip molekulinį žymenį, paskelbta 2009 metais (Butkauskas et al., 2009). Atsižvelgdami į Lietuvos Respublikos muitinės departamento prašymą operatyviai nustatyti *Anguilla* sp. individų rūšinę priklausomybę, pritaikėme iki šiol tam tikslui netaikytą, tačiau, mūsų vertinimu, potencialiai tinkamą molekulinį metodą, paremtą Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto molekulinės ekologijos laboratorijoje sukurtų pradmenų, skirtų *A. anguilla* rūšies D-kilpos sekoms nustatyti, panaudojimu. Iki šio tyrimo mokslinių publikacijų apie *Anguilla* sp. rūšių identifikaciją, pagrįstą molekulinėmis technologijomis, Lietuvoje nebuvo.

Atlikto darbo rezultatai vienareikšmiškai patvirtina, kad *A. anguilla*, *A. rostrata* ir *A. japonica* rūšių identifikacija, analizuojant mtDNR D-kilpos regiono homologines sekas, buvo patikima: filogenetiniame medyje skirtingų *Anguilla* sp. rūšių sekos patikimai grupuojasi į atskirus klasterius (3 pav.). Visų abejotinos kilmės individų sekos priklauso *A. japonica* klasteriui.

Dėl DNR sekvenavimo ne tik atliekama homologinių sekų analizė, bet ir kaupiama duomenų bazė, kuri vėliau gali būti panaudota tiriant konkrečių rūšių populiacinę-genetinę struktūrą. Be to, rezultatai gali būti patikrinti kitų mokslinių grupių. Vis dėlto, DNR sekvenavimas ne visada yra pats optimaliausias metodas. Pavyzdžiui, kai apsiribojama tik skirtingų *Anguilla* sp. rūšių atskyrimu, vietoje DNR sekvenavimo racionaliau taikyti kitus metodus (Lin et al., 2002; Itoi et al., 2005; Trautner, 2006; Keszka et al., 2009). Kadangi šio tyrimo metu visi identifikuoti individai buvo japoniniai unguariai ir jų sekos skyrėsi, o naudota Ang1 pradmenų pora buvo skirta *A. anguilla* rūšies D-kilpos sekoms amplifikuoti, akivaizdu, jog ši pradmenų pora taip pat tinkama *A. japonica* rūšies genetiniams tyrimams. Ateityje būtų prasminga išsiaiškinti minimos pradmenų poros pritaikomumą kitų *Anguilla* sp. rūšių, ypač *A. rostrata*, kopuliacinės-genetinės struktūros tyrimams, taip pat nustatant *Anguilla* sp. rūšinę priklausomybę, kai turimi unguarių pavyzdžiai yra su iš dalies degradavusia DNR. Pavyzdžiui, tiriant termiškai apdorotų unguarių raumeninio audinio mėginius, DNR amplifikacija gali būti nesėkminga. Kadangi mtDNR yra paveldima tik iš motinos (Hwang et al., 2004), aprašomas metodas nėra tinkamas norint identifikuoti *Anguilla* sp. rūšių hibridus. Kai kurie mokslininkai (Keszka et al., 2009) linkę manyti, kad mtDNR, kaip molekulinis žymuo, nėra visada tinkama

nustatant *Anguilla* sp. individų rūšinę priklausomybę. Iš tikrųjų tai priklauso nuo pasirinkto analizuoti mtDNR fragmento ir šio fragmento ilgio. Tiek *A. anguilla*, tiek *A. japonica* rūšių mtDNR D-kilpos regiono homologinių sekų analizė įrodo, kad šios rūšys pasižymi didele haplotipų įvairove. Iki šiol iš turimų 229 *A. anguilla* 493 bp ilgio sekų nustatyti 182 haplotipai, o tarp 174 *A. japonica* individų, lyginant 500 bp ilgio D-kilpos sekas, nustatyti 153 skirtingi haplotipai. Apibendrinant: taikytas molekulinis metodas atitinka tarptautinius rūšies identifikavimo reikalavimus ir gali būti alternatyva kitiems metodams (Lee et al., 1997; Lin et al., 2002; Itoi et al., 2005; Trautner, 2006). Remiantis mūsų mokslinės grupės iki šiol atliktais, tačiau dar nepublikuotais unguarių mtDNR D-kilpos sekų nustatymo tyrimais naudojant Ang1 pradmenų porą, galima teigti, kad šiuo metu *A. japonica* ir *A. rostrata* rūšių tiek Lietuvos vidaus vandens telkiniuose, tiek Lietuvos teritoriniuose vandenyse nėra: ištyrus 133 unguarius iš Baltijos jūros, Kuršių marių bei Balsio, Siesarčio ir Dringio ežerų, paaiškėjo, kad visi individai priskirtini *A. anguilla* rūšiai. Šie duomenys patvirtina turimos informacijos apie stiklinių unguariukų įžuvinimo Lietuvoje teisingumą. Kadangi ateityje tikėtinas kitų *Anguilla* sp. rūšių importavimas, prekyba bei įžuvinimas stikliniais unguariukais, būtina šiuos procesus kontroliuoti.



1 pav. Tiriamų unguarių mtDNR D-kilpos regiono sekų pagausinimo vertinimas agarozės gelyje. 1–4 ir 7–11 numeriai žymi šulinėlius, kuriuose išryškėjo pagausinti skirtingų unguarių individų D-kilpos DNR fragmentai; penktame šulinėlyje silpnai amplifikuotos DNR pavyzdys; šeštame šulinėlyje – DNR ilgio standartas (skaičiais pažymėti 100–600 bazių porų fragmentai)

Išvados.

1. Ištyrus abejotinos kilmės 31 unguorio pavyzdžių mtDNR D-kilpos sekas nustatyta, kad jos reprezentuoja skirtingus *A. japonica* haplotipus.

2. Siūlomas molekulinis metodas atitinka tarptautinius rūšies identifikavimo reikalavimus ir gali būti taikomas kaip alternatyva kitiems metodams.

Padėka. Dėkojame recenzentams už vertingas pastabas rengiant rankraštį spaudai. Autoriai yra dėkingi Klaipėdos teritorinės muitinės personalui už galimybę atlikti šį darbą. Taip pat dėkojame Valstybiniam studijų fondui už finansinę paramą.

Literatūra

1. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 1997. T. 25. P. 4692–4693.

2. Aoyama J., Wouthuyzen S., Miller M. J., Inagaki T., Tsukamoto K. Short-distance spawning migration of tropical freshwater eels. *Biological Bulletin*. 2003. T. 204. P. 104–108.

3. Aoyama J. Life history and evolution of migration in catadromous eels (genus *Anguilla*). *Aqua-BioScience Monographs*. 2009. T. 2. P. 1–42.

4. Bonhommeau S., Chassot E., Rivot E. Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso sea. *Fisheries Oceanography*. 2008. T. 17. P. 32–44.

5. Butkauskas D., Ragauskas A., Sruoga A., Ložys L., Tzeng W-N. Current knowledge about European eel *Anguilla anguilla* (L.) mtDNA D-loop region haplotypic variety. *Acta Zoologica Lituanica*. 2009. T. 19. P. 253–267.

6. Chow S., Kurogi H., Mochioka N., Kaji S., Okazaki M., Tsukamoto K. Discovery of mature freshwater eels in the open ocean. *The Japanese Society of Fisheries Science*. 2009. T. 75. P. 257–259.

7. Hwang D-F., Jen H-C., Hsieh Y-W., Shiau C. Y. Applying DNA techniques to the identification of the species of dressed toasted eel products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 2004. T. 52. P. 5972–5977.

8. Itoi S., Nakaya M., Kaneko G., Kondo H., Sezaki K., Watabe S. Rapid identification of eels *Anguilla japonica* and *Anguilla anguilla* by polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphism-based specific probes. *Fisheries Science*. 2005. T. 71. P. 1356–1364.

9. Keszka S., Panicz R., Kempter J. Eel species identification by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Medycyna Weterynaryjna*. 2009. T. 65. P. 315–318.

10. Lecomte-Finiger R. The genus *Anguilla* Schrank,

1798: current state of knowledge and questions. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Kluwer Academic Publishers, 2003. T. 13. P. 265–279.

11. Lee S. C., Tsoi S. C. M., Cheng H. L., Chang J. T. Identification of *Anguilla japonica* and *A. marmorata* elvers by allozyme electrophoresis. *Journal of Fish Biology*. The Fisheries Society of the British Isles. 1997. T. 51. P. 208–210.

12. Lehmann D., Hettwer H., Taraschewski H. RAPD-PCR investigations of systematic relationships among four species of eels (Teleostei: Anguillidae), particularly *Anguilla anguilla* and *A. rostrata*. *Marine Biology*. Springer-Verlag, 2000. T. 137. P. 195–204.

13. Lin Y-S., Poh Y-P., Lin S-M., Tzeng C-S. Molecular techniques to identify freshwater eels: RFLP analyses of PCR-amplified DNA fragments and allele-specific PCR from mitochondrial DNA. *Zoological Studies*. 2002. T. 41. P. 421–430.

14. Lin Y-S., Tzeng C-S., Hwang J-K. Reassessment of morphological characteristics in freshwater eels (genus *Anguilla*, Anguillidae) shows congruence with molecular phylogeny estimates. *Zoologica Scripta*. The Norwegian Academy of Science and Letters. 2005. T. 34. P. 225–234.

15. Maes G. E., Volckaert F. A. M. Challenges for genetic research in European eel management. *ICES Journal of Marine Science*. 2007. T. 64. P. 1463–1471.

16. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007. T. 24. P. 1596–1599.

17. Teng H-Y., Lin Y-S., Tzeng C-S. A new *Anguilla* species and a reanalysis of the phylogeny of freshwater eels. *Zoological Studies*. 2009. T. 48. P. 808–822.

18. Trautner J. Rapid identification of European (*Anguilla anguilla*) and North American eel (*Anguilla rostrata*) by polymerase chain reaction. *Inf. Fischereiforsch. Bundesforschungsanstalt für Fischerei*. 2006. T. 53. P. 49–51.

19. Watanabe S., Aoyama J., Nishida M., Tsukamoto K. A molecular genetic evaluation of the taxonomy of eels of the genus *Anguilla* (Pisces: Anguilliformes). *Bulletin of Marine Science*. Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science of the University of Miami. 2005. T. 76. P. 675–690.

20. Watanabe S., Aoyama J., Tsukamoto K. A new species of freshwater eel *Anguilla luzonensis* (Teleostei: Anguillidae) from Luzon island of the Philippines. *Fisheries Science*. 2009. T. 75. P. 387–392.

21. Westin L. Migration failure in stocked eels *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology Progress Series*. Inter-Research. 2003. T. 254. P. 307–311.

22. Wouthuyzen S., Aoyama J., Sugeha H. Y., Miller M. J., Kuroki M., Minegishi Y., Suharti S. R., Tsukamoto K. Seasonality of spawning by tropical anguillid eels around Sulawesi Island, Indonesia. *Naturwissenschaften*. Springer-Verlag. 2009. T. 96. P. 153–158.

Gauta 2011 01 06

Priimta publikuoti 2011 06 27