

**MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII
UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
DEPARTAMENTUL BIOLOGIE ȘI ECOLOGIE**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 597/599:591.5(478)(043.2)

SÎTNIC VICTOR

**ABORDĂRI BIOINFORMATICE ÎN CERCETAREA DIVERSITĂȚII
VERTEBRATELOR TERESTRE ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

165.02. ZOOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:



NISTREANU Victoria,
doctor în științe biologice,
conferențiar cercetător

Autor:



CHIȘINĂU 2023

© SÎTNIC VICTOR, 2023

CUPRINS

ADNOTARE	5
ANNOTATION	6
АННОТАЦИЯ	7
LISTA TABELELOR	8
LISTA FIGURILOR	9
LISTA ABREVIERILOR	11
INTRODUCERE	12
1. SINTEZA BIBLIOGRAFICĂ	18
1.1. Metode moderne de cercetare a diversității vertebratelor terestre	18
1.2. Studiile bioinformatică și barcodarea speciilor de animale în Republica Moldova ..	22
1.3. Diversitatea vertebratelor terestre și potențialul ADN-ului de mediu	23
1.4. Metabarcodurile și designul primerilor	28
1.5. ADN-ul mitocondrial al vertebratelor terestre. Analiza filogenetică	33
1.6. Concluzii la capitolul 1	37
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	38
2.1. Colectarea și prelucrarea primară a materialului biologic în teren	39
2.2. Instrumente și metode bioinformatică	42
2.2.1. Designul și testarea <i>in silico</i> a primerilor pentru metabarcodare	42
2.2.2. Fragmentarea RFLP <i>in silico</i> a alelelor genei porcine <i>MC1R</i>	49
2.2.3. Analiza filogenetică în baza secvențelor de ADN	50
2.2.4. Modelarea distribuției speciilor cu limbajul R	52
2.2.5. Limbajul R și mediul de dezvoltare <i>Rstudio</i>	53
2.3. Metode de biologie moleculară	54
2.3.1. Extragerea ADN-ului genomic	55
2.3.2. Amplificarea ADN-ului	56
2.3.3. Electroforeza pe gel de agaroză și vizualizarea rezultatelor de amplificare	58
2.3.4. Fragmentarea ampliconilor cu enzime de restricție	59
2.3.5. Secvențierea ADN-ului	60
2.4. Concluzii la capitolul 2	63
3. DESIGNUL PRIMERILOR PENTRU METABARCODARE ȘI GENOTIPAREA CU ENZIME DE RESTRICȚIE	64
3.1. Abordări bioinformatică	64
3.1.1. Determinarea tuturor speciilor de vertebrate terestre din Moldova care au mitogenom secvențiat inclus în baza de date globală <i>RefSeq</i>	64
3.1.2. Compararea <i>in silico</i> a primerilor universal utilizați pentru identificarea vertebratelor	69
3.1.3. Designul și testarea <i>in silico</i> a primerilor	71
3.1.4. Fragmentarea RFLP <i>in silico</i> a alelelor genei porcine <i>MC1R</i>	76
3.2. Testarea și analiza în laborator	78
3.2.1. Izolarea ADN-ului	78

3.2.2. Testarea <i>in vitro</i> a acoperirii taxonomice pentru primerii <i>Met-12S</i>	82
3.2.3. Genotiparea speciei <i>Sus scrofa</i> în baza polimorfismului genei <i>MC1R</i>	84
3.3. Concluzii la capitolul 3	88
4. ANALIZA FILOGENETICĂ ȘI	
MODELAREA DISTRIBUȚIEI SPECIILOR	89
4.1. Analiza filogenetică a secvențelor genei <i>CYTB</i> la speciile de microtine	89
4.2. Modelarea distribuției speciilor cu utilizarea algoritmului <i>Bioclim</i>	106
4.2.1. Modelarea distribuției șarpelui cu patru linii rășăritean (<i>Elaphe sauromates</i>)	106
4.2.2. Modelarea distribuției viperei de stepă (<i>Vipera ursinii</i>)	108
4.2.3. Distribuția morfelor de <i>Vipera berus</i> în funcție de altitudine	110
4.3. Concluzii la capitolul 4	114
CONCLUZII GENERALE	115
RECOMANDĂRI PRACTICE	117
BIBLIOGRAFIE	118
ANEXE	132
Anexa 1. Etapele de design și testare a primerilor <i>Met-12S</i>	132
Anexa 2. Date moleculare din baza de date de referință cu privire la metabarcodarea vertebratelor terestre din RM	134
Anexa 3. Date cu referire la speciile de microtine din Moldova înregistrate în baza de date globală <i>Barcode of Life Data Systems</i>	153
Anexa 4. Acte de implementare	154
Anexa 5. Certificate și diplome	158
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	165
CURRICULUM VITAE AL AUTORULUI	166

ADNOTARE

Sîtnic Victor. „Abordări bioinformatică în cercetarea diversității vertebratelor terestre în Republica Moldova”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2023.

Teza constă din introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 169 titluri, 112 pagini de text de bază, 45 figuri, 18 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 19 lucrări științifice.

Cuvinte cheie: vertebrate terestre, primeri, ADN, diversitate moleculară, metabarcodare, secvențiere, genotipare, filogenie, SDM.

Domeniul de studiu: 165.02. Zoologie

Scopul lucrării: Optimizarea și implementarea metodelor bioinformatică și molecular-biologice în cercetarea diversității unor specii de vertebrate terestre din RM.

Obiectivele: Designul și testarea *in silico* a unei perechi de primeri pentru metabarcodarea anumitor specii de vertebrate terestre din Moldova; testarea *in vitro* a acoperirii taxonomice pentru noii primeri cu utilizarea PCR-ului convențional; testarea unei metode moleculare de diferențiere a hibrizilor și liniilor pure de mistreț în baza alelelor genei *MC1R*; secvențierea și analiza filogenetică a genei *CYTB* la speciile de microtine din RM, înregistrarea secvențelor de barcod molecular în baza de date *BOLD Systems*; modelarea distribuției unor specii rare de vertebrate terestre.

Noutatea și originalitatea științifică. Cercetările efectuate au avut la bază abordări inedite, interdisciplinare care au adus împreună bioinformatica, biologia moleculară și zoologia. Au fost identificate toate speciile de vertebrate terestre din Moldova care au genom mitocondrial în baza de date globală *RefSeq*. În baza mitogenomurilor identificate au fost creați și testați noi primeri pentru metabarcodare care au demonstrat o performanță înaltă în ce privește grupul de specii studiat. Pentru prima dată au fost descifrate mai multe secvențe ale genei citocromului b de la specii de microtine din țara noastră și depozitate pe platforma globală Barcode of Life Database. Secvențierea și analiza filogenetică a stabilit că speciile de microtine studiate fac parte din linia filogenetică estică, iar modelarea distribuției unor specii rare a permis identificarea la sudul țării a unei populații de *Elaphe sauromates* care ultima dată a fost atestată în această regiune cu mai bine de jumătate de secol în urmă.

Problema științifică soluționată. Constă în eficientizarea evaluării și monitorizării speciilor de vertebrate terestre din țara noastră în baza unor metode de cercetare optimizate care s-au aplicat în premieră pentru studierea diversității vertebratelor terestre din Moldova.

Importanța teoretică a tezei. Constă în cercetările interdisciplinare realizate care contribuie la dezvoltarea domeniului biodiversității moleculare din țara noastră. Studiile efectuate se încadrează în tendințele actuale de computerizare a vastelor cantități de date biologice și implicare graduală a tehnologiei informaționale în știința biologică.

Valoarea aplicativă a lucrării. Combinate cu metodele tradiționale, abordările propuse în lucrare vor contribui la îmbunătățirea monitoringului speciilor rare, pe cale de dispariție sau economic importante. Noii primeri obținuți în rezultatul cercetărilor au potențialul de a identifica peste o sută de specii de vertebrate terestre într-un singur experiment utilizând tehnici neinvazive. Studiile de metabarcodare prezintă relevanță economică întrucât pot fi oferite servicii de identificare a speciilor în baza analizei ADN-ului de mediu.

Implementarea rezultatelor științifice. Metodele moleculare descrise pe parcursul studiului sunt utilizate în activitatea de cercetare a laboratorului de Vertebrate Terestre a Institutului de Zoologie. În cadrul laboratorului poate fi realizată testarea de rutină și genotiparea speciei *Sus scrofa* în scopul diferențierii hibrizilor și liniilor pure de mistreț. De asemenea abordările bioinformatică utilizate permit analiza relațiilor filogenetice și modelarea distribuției speciilor fără procurarea unor softuri costisitoare. Nu în ultimul rând metodele descrise în lucrare pot servi în calitate de suport în procesul de cercetare sau de învățământ a instituțiilor cu profil biologic.

ANNOTATION

Sitnic Victor. „Bioinformatics approaches in the research of terrestrial vertebrate diversity in the Republic of Moldova”, PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2023.

The thesis consists of introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 169 titles, 112 pages of basic text, 45 figures, 18 tables. The obtained results are published in 19 scientific works.

Keywords: terrestrial vertebrates, primers, DNA, molecular diversity, metabarcoding, sequencing, genotyping, phylogeny, SDM.

Field of study: 165.02. Zoology

The purpose of the paper: Optimizing and implementing bioinformatic and molecular biological methods for the research of terrestrial vertebrate diversity in the Republic of Moldova.

Objectives: Design and *in silico* testing of a pair of primers for the metabarcoding of some terrestrial vertebrate species from the Republic of Moldova; *in vitro* testing of taxonomic coverage for new primers using conventional PCR; testing a molecular method for differentiating hybrid and pure line wild boars based on *MC1R* gene alleles; sequencing and phylogenetic analysis of *CYTB* gene of *Microtus* specimens from Moldova, registration of molecular barcode sequences in the BOLD Systems database; distribution modeling of rare terrestrial vertebrate species.

Scientific novelty and originality. The research carried out was based on interdisciplinary approaches that brought together bioinformatics, molecular biology and zoology. All terrestrial vertebrate species from Moldova that have mitochondrial genomes in the global *RefSeq* database have been identified. Based on the identified mitogenomes, have been created and tested new metabarcoding primers, which demonstrated high performance in the studied species group. For the first time, several cytochrome b gene sequences of *Microtus* specimens from Moldova were deciphered and stored on the global *BOLD Systems* database. Sequencing and phylogenetic analysis established that studied *Microtus* specimens belong to the eastern phylogenetic lineage while the distribution modeling of some rare species allowed the identification of an *Elaphe sauromates* specimen that was last attested in that region with more than half of century ago.

The solved scientific problem. Consists in improving the assessment and monitoring of terrestrial vertebrate species from our country based on optimized research methods that have been applied for the first time in researching land vertebrates from Moldova.

Theoretical significance of the thesis. Consists in its interdisciplinary approach that contributes to the development of the field of molecular biodiversity in our country. The studies carried out fit into the current trends of computerization of vast amounts of biological data and gradual involvement of information technology in biological science.

The applicative value of the work. Combined with traditional methods, the approaches proposed in the paper will contribute to improving the monitoring of rare, endangered or economically important species. The new obtained primers have the potential to identify over a hundred species of terrestrial vertebrates in a single experiment using non-invasive techniques. Metabarcoding studies have economic relevance as species identification services can be provided based on environmental DNA analysis.

Implementation of scientific results. The molecular methods described during the study are used in the research activity of the Laboratory of Terrestrial Vertebrates, Institute of Zoology. In order to differentiate between hybrid and pure line wild boars in laboratory can be performed routine testing and genotyping of *Sus scrofa* species. Also, the used bioinformatics approaches allow analysis of phylogenetic relationships and performing species distribution modeling without purchasing expensive software. Finally, the methods described in the paper can serve as a support in the research or teaching process of institutions with a biological profile.

АННОТАЦИЯ

Сытник Виктор. «Биоинформатические подходы в исследовании разнообразия наземных позвоночных в Республике Молдова», кандидатская диссертация по биологическим наукам, Кишинев, 2023.

Диссертация состоит из введения, 4 глав, общих выводов и рекомендаций, библиографии из 169 наименований, 112 страниц основного текста, 45 рисунков, 18 таблиц. Полученные результаты указаны в 19 научных публикациях.

Ключевые слова: наземные позвоночные, праймеры, ДНК, молекулярное разнообразие, метабаркодирование, секвенирование, генотипирование, филогенез, SDM.

Область исследования: 165.02. Зоология

Цель диссертации: Оптимизация и внедрение биоинформатических и молекулярно-биологических методов исследования разнообразия некоторых видов наземных позвоночных (НП) в Республике Молдова.

Задачи: Дизайн и тестирование *in silico* пары праймеров для метабаркодирования некоторых видов наземных позвоночных из Молдовы; тестирование *in vitro* таксономического охвата новых праймеров с использованием обычной ПЦР; тестирование молекулярного метода дифференциации гибридов и чистых линий кабана на основе аллелей гена *MC1R*; секвенирование и филогенетический анализ гена *CYTB* у видов полёвок Молдовы, регистрация молекулярных баркодов в базе данных *BOLD Systems*; моделирование распространения редких видов наземных позвоночных.

Научная новизна и оригинальность. Проведенные исследования были основаны на междисциплинарных подходах, объединивших биоинформатику, молекулярную биологию и зоологию. Идентифицированы все виды НП из Молдовы, имеющие митохондриальные геномы в глобальной базе данных *RefSeq*. На основе выявленных митогеномов созданы и протестированы новые праймеры для метабаркодирования, показавшие высокую эффективность в исследуемой группе видов. Впервые были секвенированы гены цитохрома *b* у образцов полёвок из Молдовы и баркоды зарегистрированы на глобальной платформе *BOLD Systems*. Секвенированием и филогенетическим анализом установлено, что изученные экземпляры являются частью восточной филогенетической линии.

Разрешённая научная проблема. Заключается в улучшении мониторинга видов НП в нашей стране на основе оптимизированных методов исследования, которые впервые были применены для изучения разнообразия наземных позвоночных в Молдове.

Теоретическая значимость. Заключается в проводимых междисциплинарных исследованиях, которые способствуют развитию области молекулярного биоразнообразия в нашей стране. Проведенные исследования вписываются в современные тенденции компьютеризации огромных количеств биологических данных и постепенного вовлечения информационных технологий в биологическую науку.

Практическая значимость исследования. В сочетании с традиционными методами подходы, описанные в диссертации, будут способствовать улучшению мониторинга редких, исчезающих или экономически важных видов. У новых праймеров, полученных в результате исследования, есть потенциал идентифицировать более сотни видов НП в одном эксперименте с использованием неинвазивных методов.

Внедрение научных результатов. Молекулярные методы, описанные в диссертации, используются в научно-исследовательской деятельности лаборатории НП Института Зоологии. В лаборатории можно проводить генотипирование вида *Sus scrofa*, чтобы отличить гибриды от чистых линий кабана. Также, описанные методы могут служить методическим пособием в исследовательском или учебном процессе учреждений биологического профиля.

LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1. Documentarea unor specimene de vertebrate terestre incluse în studiu	40
Tabelul 2.2. Materialul biologic și metodele moleculare utilizate	42
Tabelul 2.3. Rezultatul algoritmului <i>ecotaxstat</i> la diferite nivele taxonomice	47
Tabelul 2.4. Rezultatul algoritmului <i>ecotaxspecificity</i> la diferite nivele taxonomice	48
Tabelul 2.5. Componenta volumului de reacție pentru realizarea PCR-ului	57
Tabelul 2.6. Programul de amplificare pentru <i>DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)</i>	57
Tabelul 2.7. Programul de amplificare pentru <i>AmpliTaq Gold 360 Master Mix</i>	58
Tabelul 3.1. Speciile de vertebrate terestre din Republica Moldova care au mitogenom în <i>RefSeq</i>	64
Tabelul 3.2. Acoperirea taxonomică pentru primerii <i>Met-12S</i>	75
Tabelul 3.3. Rezoluția taxonomică pentru primerii <i>Met-12S</i>	75
Tabelul 3.4. Specii care nu pot fi amplificate <i>in silico</i>	75
Tabelul 3.5. Lista speciilor de la care a fost izolat ADN-ul genomic	78
Tabelul 3.6. Concentrația și puritatea ADN-ului izolat de la specimene de <i>Sus scrofa</i>	81
Tabelul 3.7. Sumar statistic al datelor cu referire la ADN-ul extras din probele de <i>Sus scrofa</i>	82
Tabelul 3.8. Specii cu mitogenom în <i>RefSeq</i> testate <i>in vitro</i> pentru acoperirea taxonomică	83
Tabelul 4.1. Localitățile din Moldova în care au fost capturate microtinele incluse în studiu	89
Tabelul 4.2. Caracteristica filogeniei din Fig. 4.7	105
Tabelul 4.3. Coordonatele geografice ale populațiilor de <i>Vipera berus</i> din Moldova	112

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1. Relația pradă-prădător	19
Fig. 1.2. Structura unui metabarcod	29
Fig. 1.3. Mecanisme de blocare a amplificării ADN-ului non-target	30
Fig. 1.4. Calcularea indicilor Bc (acoperire taxonomică) și Bs (rezoluție taxonomică)	31
Fig. 2.1. Mostre de țesut fixate în alcool etilic de 96%	39
Fig. 2.2. Perechi de primeri care amplifică aceeași regiune variabilă	44
Fig. 2.3. Structuri ce trebuie evitate în timpul designului primerilor	44
Fig. 2.4. Evaluarea gradului de conservare a primerilor	45
Fig. 2.5. Caracteristicile sistemului de metabarcodare <i>Met-12S</i>	46
Fig. 2.6. Utilizarea <i>RStudio</i> pentru reprezentarea grafică a frecvenței lungimii metabarcodurilor	47
Fig. 2.7. Alinierea alelelor genei <i>MC1R</i>	50
Fig. 2.8. Dispozitivul <i>Bento Lab</i> din cadrul Centrului de Cercetare a Faunei Terestre, Institutul de Zoologie	54
Fig. 2.9. Etapele de izolare a ADN-ului după protocolul <i>GeneJET Genomic DNA Purification Kit</i>	55
Fig. 2.10. Etapele de izolare a ADN-ului după protocolul <i>Dipstick DNA Extraction</i>	56
Fig. 2.11. Vizualizarea gelului la dispozitivul <i>Bento Lab</i>	59
Fig. 3.1. Logourile de secvențe obținute pentru perechea de primeri <i>Kitano-16S</i>	70
Fig. 3.2. Logourile de secvențe obținute pentru perechea de primeri <i>12S-V5</i>	70
Fig. 3.3. Numărul de nepotriviri pentru perechile de primeri <i>Kitano-16S</i> și <i>12S-V5</i>	71
Fig. 3.4. Valoarea <i>dG</i> a primerilor nou creați	72
Fig. 3.5. Logourile de secvențe obținute pentru perechea <i>12S-V5</i>	73
Fig. 3.6. Logourile de secvențe obținute pentru perechea <i>Met-12S</i>	73
Fig. 3.7. Numărul de nepotriviri (stânga) și lungimea metabarcodurilor (dreapta) pentru perechea de primeri <i>Met-12S</i>	74
Fig. 3.8. Numărul de nepotriviri (stânga) și lungimea metabarcodurilor (dreapta) pentru perechea de primeri <i>12S-V5</i>	74
Fig. 3.9. Electroforegrama obținută în urma simulării digestiei secvențelor alelice <i>MC1R</i>	77
Fig. 3.10. Distribuția datelor cu referire la concentrație (stânga) și frecvența purității ADN-ului izolat (dreapta) de la cele 26 specii de vertebrate terestre	79
Fig. 3.11. Distribuția datelor cu referire la concentrație (stânga) și frecvența purității ADN-ului izolat (dreapta) din probele de <i>Sus scrofa</i>	80
Fig. 3.12. Electroforegrama ampliconilor obținuți cu noii primeri	83
Fig. 3.13. Trăsături fenotipice de culoare a pielii la specia <i>Sus scrofa</i> cu diferite alele <i>MC1R</i>	85
Fig. 3.14. Electroforegrama genotipurilor identificate	86

Fig. 3.15. Benzile electroforetice obținute la liniile pure de mistreț (E^+) în urma digestiei ampliconilor <i>MC1R</i> cu enzimele de restricție BspHI și BstUI	87
Fig. 4.1. Locațiile geografice de colectare a probelor	90
Fig. 4.2. Distanța genetică între 31 secvențe ale genei <i>CYTB</i> la specia <i>M. arvalis</i>	100
Fig. 4.3. Arborele filogenetic obținut din secvențe ale genei <i>CYTB</i> la specia <i>M. arvalis</i>	101
Fig. 4.4. Corelația dintre distanța prezentată în arborele filogenetic și distanța originală	102
Fig. 4.5. Distanța genetică între 86 secvențe ale genei <i>CYTB</i> la specia <i>M. levis</i>	103
Fig. 4.6. Arborele filogenetic obținut din secvențe ale genei <i>CYTB</i> la specia <i>M. levis</i>	104
Fig. 4.7. Arborele filogenetic construit în baza secvențelor obținute de la microtine din R. Moldova	105
Fig. 4.8. Modelarea distribuției speciei <i>Elaphe sauromates</i> pe teritoriul Republicii Moldova	107
Fig. 4.9. Specimen de șarpe cu patru linii răsăritean identificat la sudul țării	108
Fig. 4.10. Distribuția viperei de stepă în România în anul 2008	109
Fig. 4.11. Modelarea distribuției speciei <i>Vipera ursinii</i>	109
Fig. 4.12. Semnalarea prezenței <i>V. ursinii</i> în Ținutul Buzăului (stânga), locația geoparcului Ținutul Buzăului (mijloc), harta cu modelarea distribuției (dreapta)	110
Fig. 4.13. <i>Vipera berus</i> melanică (stânga), brun-roșietică (mijloc) și cenușie (dreapta)	111
Fig. 4.14. Boxplotul corelației dintre variația de culoare predominantă în populații și altitudinea habitatului	111
Fig. 4.15. Distribuția morfelor de <i>Vipera berus</i> în funcție de altitudine	112

LISTA ABREVIERILOR

ADN – acid dezoxiribonucleic
ADNmt – ADN mitochondrial
ARN – acid ribonucleic
ATP – adenzin trifosfat
BOLD Systems - Barcode of Life Data Systems
(bază de date globală dedicată înregistrării și depozitării barcodurilor ADN)
CCC – Coeficient cofenetic de corelație
CITES – Convention on International Trade in Endangered Species
(Convenția privind comerțul internațional cu specii pe cale de dispariție)
COI/COX1 – Cytochrome c oxidase I (Citocrom oxidaza c, subunitatea I)
CR – Specie critic periclitată
CYTB – Cytochrome b (Citocromul b)
dNTP – deoxinucleotid trifosfat
ddNTP – dideoxinucleotid trifosfat
eADN – environmental DNA (ADN de mediu)
EMBL – European Molecular Biology Laboratory
(Laboratorul European de Biologie Moleculară)
IDE – Integrated Development Environment (Mediu Integrat de Dezvoltare)
IUCN – International Union for Conservation of Nature
(Uniunea Internațională pentru Conservarea Naturii)
MC1R – Melanocortin 1 Receptor (Receptorul de Melanocortină 1)
NCBI – National Center for Biotechnology Information
(Centrul Național de Informare în Biotehnologie)
NGS – Next Generation Sequencing (Secvențiere de Generația Următoare)
NJ – Neighbor Joining (algoritm de creare a arborilor filogenetici)
PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacție de Polimerizare în Lanț)
RefSeq – Reference Sequences (Secvențe de referință)
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
(Polimorfismul Lungimii Fragmentelor de Restricție)
SBS – Sequencing by Synthesis (Secvențiere prin Sinteză)
SDM – Species Distribution Modelling (Modelarea Distribuției Speciilor)
SNV – Single Nucleotide Variant
T_m – Melting temperature (Temperatură de topire)
UV – Spectru ultraviolet
VT – Vertebrate terestre
VU – Specie vulnerabilă

INTRODUCERE

Încă de la apariția omului vertebratele terestre (VT) au avut un rol esențial pentru existența acestuia. Pe parcursul istoriei, animalele (în special păsările și mamiferele), au oferit speciei umane hrană, îmbrăcăminte, transport, protecție, modele pentru cercetare științifică etc. VT au o mare însemnătate economică și un rol cheie în reglarea proceselor naturale la diferite nivele ale lanțului trofic. Astăzi, când populația planetei a depășit cifra de 8 miliarde, resursele faunei sălbatice sunt consumate mai repede decât oricând, iar elaborarea măsurilor eficiente de conservare impune utilizarea metodelor și instrumentelor moderne de studiere a diversității speciilor. În cursul istoriei cercetarea diversității amfibienilor, reptilelor, păsărilor și mamiferelor a urmărit evaluarea comportamentelor, habitatelor, ritmurilor circadiene, migrației, aspectului exterior, structurii interne, toate acestea contribuind la descrierea și sistematizarea vertebratelor terestre în grupurile taxonomice cunoscute astăzi. În mare parte clasificarea și identificarea animalelor s-a efectuat în baza metodelor tradiționale prin observații în câmp și măsurători biometrice. Progresul tehnologic a atras după sine utilizarea metodelor moderne în cercetarea diversității faunistice. Acestea au o eficiență înaltă, pot fi parțial automatizate și vin să le completeze pe cele clasice facilitând studierea aspectelor moleculare, distribuției și dinamicii populațiilor de animale. Printre metodele moderne care se aplică în cercetarea diversității VT sunt: prelevarea și analiza ADN-ului (*DNA sampling*), modelarea distribuției speciilor (*Species distribution modelling – SDM*), captarea imaginilor (*Camera trapping*), monitorizarea acustică (*Acousting monitoring*), teledetecția (*Remote sensing*), s.a. În lucrarea de față ne-am propus să abordăm tehnici de cercetare a diversității vertebratelor terestre care implică analiza ADN-ului speciilor și modelarea distribuției acestora. SDM și cercetarea ADN-ului sunt instrumente de studiere a biodiversității care se pot completa reciproc. Spre exemplu se pot preleva probe de ADN din locațiile geografice în care există o probabilitate înaltă de a întâlni o anumită specie și invers - locațiile geografice în care a fost detectat ADN-ul unei specii pot fi utilizate în calitate de date de intrare pentru modelarea distribuției. Există mai multe studii recente care sugerează că combinarea acestor două instrumente de cercetare a diversității faunistice are un mare potențial atât pentru monitorizarea speciilor rare și invazive, cât și pentru evaluarea succesului reintroducerii speciilor [26, 83, 103]. Ambele metode presupun utilizarea softurilor și instrumentelor informatice, iar prelevarea și analiza ADN-ului poate fi efectuată în combinație cu aplicarea tehnicilor de biologie moleculară.

Bioinformatica ține de aplicarea instrumentelor informatice de calcul și analiză pentru captarea, stocarea, procesarea, clasificarea și interpretarea datelor biologice. Utilizarea

bioinformaticii și a tehnicilor moleculare pentru identificarea taxonomică a genurilor și speciilor precum și pentru determinarea genotipurilor în interiorul speciilor devine o practică de rutină în studierea biodiversității și ține atât de aplicarea soluțiilor simple, low-cost (PCR, RFLP-PCR), cât și de punerea în practică a protocoalelor de secvențiere care presupun costuri mai mari. Spre exemplu, un studiu recent realizat în Danemarca, a permis identificarea a 49 specii de vertebrate (30 - mamifere, 13 - păsări, 4 - pești, 1 - amfibieni și 1 - reptile) în baza secvențierii ADN-ului de mediu (eADN) obținut din aer [75], iar altă cercetare similară a demonstrat că extragerea și secvențierea eADN-ului din probe de sol se dovedește a fi o practică eficientă de monitorizare a diversității mamiferelor mici [72]. Cât privește opțiunile mai puțin costisitoare, poate fi oferit drept exemplu un studiu realizat în Statele Unite ce a avut drept scop identificarea mai multor specii de mamifere în baza analizei RFLP-PCR a probelor de materii fecale [11].

Începând cu anii 2008-2009 în lume încep să fie aplicate pe larg tehnici de metabarcodare a macroorganismelor în scopul cercetării diversității acestora, totuși, în pofida avântului apărut în comunitățile științifice unele aspecte cu referire la performanța markerilor moleculari generau dificultăți. Astfel, în anul 2010, Francesco Ficetola și colaboratorii propun o metodă de evaluare a calității și performanței barcodurilor cu utilizarea unei metode bioinformaticice ce prevede realizarea reacției de PCR *in silico* asupra secvențelor din bazele de date [39]. În cadrul cercetărilor sale, acesta a comparat acoperirea taxonomică și rezoluția anumitor regiuni de ADN deja propuse pentru barcodarea vertebratelor. Un an mai târziu, Tiayyba Riaz a propus un algoritm bioinformatic care permite identificarea metabarcodurilor noi și a primerilor asociați în baza unui grup de secvențe de interes [104]. În continuare, noile metode au permis o reducere considerabilă a timpului, efortului și costului dedicat cercetărilor ADN-ului de mediu datorită posibilității de a realiza designul și validarea bioinformatică a markerilor și primerilor asociați.

Cât privește tehnicile SDM, acestea au început să se dezvolte la mijlocul anilor 80, astăzi fiind pe larg utilizate atât în ecosistemele terestre cât și în cele acvatice. Algoritmii SDM estimează relația dintre condițiile de mediu și locația cunoscută a speciilor în felul acesta efectuând predicții cu referire la distribuția spațială în afara zonei de eșantionare. Modelarea distribuției speciilor în comun cu aplicarea metodelor de observare în teren și a tehnicilor moleculare oferă o modalitate fiabilă și eficientă de evaluare a biodiversității. În lucrarea de față au fost abordate mai multe probleme existente în cercetarea diversității speciilor de vertebrate terestre din Republica Moldova și utilizate instrumente informatice și molecular-biologice pentru rezolvarea acestora.

Scopul lucrării: Optimizarea și implementarea metodelor bioinformaticice și molecular-biologice în cercetarea diversității unor specii de vertebrate terestre din Republica Moldova.

Obiective:

1. Designul și testarea *in silico* a unei perechi de primeri pentru metabarcodarea anumitor specii de vertebrate terestre din RM.
2. Testarea *in vitro* a acoperirii taxonomice pentru noii primeri cu utilizarea PCR-ului convențional.
3. Testarea unei metode moleculare de diferențiere a hibrizilor și liniilor pure de mistreț în baza alelelor genei *MC1R*.
4. Secvențierea și analiza filogenetică a genei *CYTB* la speciile de microtine din RM, înregistrarea secvențelor de barcod molecular în baza de date *BOLD Systems*.
5. Modelarea distribuției unor specii rare de vertebrate terestre din RM.

Metodologie. Metodele utilizate în activitatea de cercetare au fost diferențiate în:

Metode bioinformatică. În scopul realizării designului și testării *in silico* a primerilor pentru metabarcodare au fost utilizați algoritmi *ecoPrimers* [104], *ecoPCR* [39] și *OBITools* [14]. Evaluarea gradului de conservare a primerilor, analiza filogenetică și modelarea distribuției speciilor au fost realizate cu ajutorul limbajului de programare R [100].

Metode de colectare și prelucrare primară a materialului biologic în teren. Probele de țesut au fost prelevate de la animale moarte identificate sporadic (în cazul păsărilor și mamiferelor mari și de la animale capturate în capcane (în cazul mamiferelor mici). Speciile de amfibieni și reptile au fost capturate manual. Tipurile de țesut prelevat au variat în funcție de specie și starea animalelor (de la piele și mușchi până la organe interne). După prelevare probele au fost fixate în alcool etilic de 96% și păstrate la -20 °C până la extragerea ADN-ului.

Metode de biologie moleculară. Probele prelevate au fost supuse analizelor de laborator care au constat în extragerea ADN-ului, efectuarea reacției de PCR convențional, digestia cu enzime de restricție și electroforeza pe gel de agaroză. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost utilizat instrumentul mobil *Bento Lab* [155] pentru extragerea, amplificarea și vizualizarea ADN-ului. Secvențierea genei *CYTB* la microtine a fost realizată la Institutul de Ecologie și Evoluție a Universității din Berna, Elveția.

Noutatea și originalitatea științifică. Cercetările efectuate au avut la bază abordări inedite, interdisciplinare care au adus împreună bioinformatica, biologia moleculară și zoologia. Au fost identificate toate speciile de vertebrate terestre din Moldova care au genom mitocondrial în baza de date globală *RefSeq* [91]. În baza mitogenomurilor identificate au fost creați și testați noi primeri pentru metabarcodare care au demonstrat o performanță înaltă în ce privește grupul de specii studiat. În premieră au fost descifrate mai multe secvențe ale genei citocromului b de la specii de microtine din țara noastră și depozitate pe platforma globală Barcode of Life Database.

Secvențierea și analiza filogenetică a stabilit că speciile de microtine studiate fac parte din linia filogenetică estică, iar modelarea distribuției unor specii rare a permis identificarea la sudul țării a unei populații de *Elaphe sauromates* care ultima dată a fost atestată în această regiune cu mai bine de jumătate de secol în urmă.

Importanța teoretică a lucrării constă în cercetările interdisciplinare realizate care contribuie la dezvoltarea domeniului biodiversității moleculare din țara noastră. Studiile efectuate se încadrează în tendințele actuale de computerizare a vastelor cantități de date biologice și implicare graduală a tehnologiei informaționale în știința biologică. Rezultatele obținute facilitează atât studiile viitoare de metabarcodare și barcodare a speciilor de vertebrate terestre din Moldova, cât și utilizarea în activitatea de cercetare a diferitor metode moleculare și bioinformatic. Studiul se încadrează în prioritățile de cercetare naționale și internaționale cu privire la monitorizarea diversității faunistice sprijinind elaborarea campaniilor de conservare și management ecologic.

Valoarea aplicativă a lucrării. Relevanța practică a tezei implică atât suportul metodologic pentru aplicarea tehnicilor moleculare și algoritmilor informatici în cercetarea biodiversității, cât și obținerea unor rezultate concrete precum crearea de noi primeri, secvențierea și genotiparea unor specii economic importante, crearea hărților cu modelarea distribuției, identificarea populațiilor noi în baza SDM, s.a. Combinate cu metodele tradiționale, abordările propuse în lucrare vor contribui la îmbunătățirea monitoringului speciilor rare, pe cale de dispariție sau economic importante. Noii primeri obținuți în rezultatul cercetărilor au potențialul de a identifica peste o sută de specii de vertebrate terestre într-un singur experiment utilizând tehnici neinvazive. Studiile de metabarcodare prezintă relevanță economică întrucât există tot mai multe companii care oferă servicii de identificare a speciilor în baza analizei ADN-ului de mediu. Respectarea reglementărilor și convențiilor cu privire la diversitatea faunistică presupune ca agenții economici, organizațiile industriale și corpurile guvernamentale să evalueze impactul activității lor asupra biodiversității.

Implementarea rezultatelor științifice. Metodele moleculare implementate pe parcursul studiului sunt utilizate în activitatea de cercetare a laboratorului de Vertebrate Terestre a Institutului de Zoologie. În cadrul laboratorului poate fi realizată testarea de rutină și genotiparea speciei *Sus scrofa* în scopul diferențierii hibrizilor și liniilor pure de mistreț. De asemenea tehnicile bioinformatic optimizate permit analiza filogenetică a populațiilor și modelarea distribuției speciilor fără procurarea unor softuri costisitoare. Nu în ultimul rând metodele și tehnicile de cercetare descrise în lucrare pot servi în calitate de suport în procesul de cercetare sau de învățământ a instituțiilor cu profil biologic (Anexa 4).

Problema științifică soluționată constă în eficientizarea evaluării și monitorizării speciilor de vertebrate terestre din țara noastră în baza unor metode de cercetare optimizate care s-au aplicat în premieră pentru studierea diversității vertebratelor terestre din Moldova.

Sumarul capitolelor. Lucrarea include cuprins, adnotare în limbile română, engleză și rusă, lista figurilor, tabelelor și abrevierilor, introducere, 4 capitole, concluzii, recomandări, 169 surse bibliografice, anexe, declarație cu privire la asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

În **Introducere** sunt argumentate actualitatea și importanța temei abordate, au fost formulate scopul și obiectivele tezei, prezentate elementele de noutate și originalitate științifică. De asemenea au fost menționate importanța teoretică și aplicativă a cercetărilor precum și implementarea rezultatelor obținute.

Capitolul 1. Sinteza bibliografică, prezintă unele metode moderne de studiere a diversității vertebratelor terestre, analiza literaturii de referință precum și istoricul cercetărilor din domeniu în Moldova și la nivel internațional. Este argumentată necesitatea aplicării în tandem a unor metode precum modelarea distribuției speciilor și analiza ADN-ului acestora. Sunt specificate regiunile ADN-ului mitocondrial al vertebratelor terestre care prezintă interes pentru studii moleculare, secvențiere și analiză filogenetică. Se descrie pe larg potențialul ADN-ului de mediu în calitate de instrument de studiere a biodiversității și modalitățile de creare și testare a primerilor pentru metabarcodare. Sunt menționate dificultățile apărute în procesul de identificare a metabarcodurilor și strategiile de cercetare utilizate. De asemenea este reflectat fenomenul de hibridizare la vertebratele terestre și analizate tehnicile de identificare a unor hibrizi. Capitolul se încheie cu concluzii.

Capitolul 2. Materiale și metode de cercetare, este consacrat descrierii metodelor și materialelor utilizate în studiu. În capitol sunt prezentate modalitățile de colectare și prelucrare primară a materialului biologic în teren, metodele de lucru în laboratorul de biologie moleculară și liniile de cod necesare pentru analiza bioinformatică. A fost efectuată o descriere amplă a procesului de lucru cu dispozitivul *Bento Lab* utilizat în premieră în țara noastră. Capitolul se încheie cu concluzii.

Capitolul 3. Designul primerilor pentru metabarcodare și genotiparea cu enzime de restricție, reflectă detaliat rezultatele obținute cu privire la designul și testarea primerilor. Perechea creată de primeri denumită provizoriu *Met-12S* a fost testată *in silico* pentru acoperirea taxonomică (taxonomic coverage) și specificitate și *in vitro* pentru acoperirea taxonomică. În comparație cu primerii universali existenți, noii primeri au demonstrat performanțe superioare pentru grupul studiat: 174 specii de vertebrate terestre din Moldova care au genom mitocondrial în *RefSeq*. Testarea în laborator a fost efectuată în baza ADN-ului izolat de la 16 specii de

mamifere, 4 specii de păsări și câte 3 specii de reptile și amfibieni, iar amplificarea prin PCR tradițional a confirmat dimensiunea metabarcodurilor identificate bioinformatic. În ce privește genotiparea speciei *Sus scrofa* au fost prezentate rezultate obținute în urma fragmentării cu enzime de restricție atât *in silico*, cât și *in vitro* ceea ce a permis optimizarea și implementarea în practica de cercetare a unei metode moleculare ce permite diferențierea între liniile pure și hibrizii de mistreț. Capitolul se încheie cu concluzii.

Capitolul 4. Analiza filogenetică și modelarea distribuției speciilor. Conține rezultate obținute în urma secvențierii și analizei filogenetice a genei citocromului b de la specii de microtine din Republica Moldova. Distanța genetică între secvențe a fost determinată atât în plan interpopulațional, cât și interspecific. În baza filogeniei elaborate a fost demonstrat că populațiile de *Microtus arvalis* din Republica Moldova fac parte din linia filogenetică estică a subspeciei *M. arvalis arvalis*. Modelarea distribuției unor specii rare a permis crearea hărților cu distribuția potențială și identificarea la sudul țării a unei populații de șarpe cu patru linii răsăritean (*Elaphe sauromates*) care ultima dată a fost atestată în această regiune cu mai bine de jumătate de secol în urmă. De asemenea la vipera comună (*Vipera berus*) a fost descrisă corelația dintre variațiile de culoare care predomină în populații și altitudinea habitatului. Capitolul se încheie cu concluzii.

Concluziile generale și Recomandările practice sunt formulate în compartimente separate și reflectă importanța rezultatelor obținute atât în plan practic, cât și teoretic.

Bibliografia include 169 surse citate în teză.

Cuvinte-cheie: vertebrate terestre, primeri, ADN, diversitate moleculară, metabarcodare, secvențiere, genotipare, filogenie, SDM.

1. SINTEZA BIBLIOGRAFICĂ

1.1. Metode moderne de cercetare a diversității vertebratelor terestre

Diversitatea vertebratelor terestre reprezintă o arie vastă de studiu în domeniul biologiei care ne permite să înțelegem și să evaluăm speciile de animale vertebrate adaptate la viața în ecosistemele terestre. Există mai multe metode de a colecta probe și a observa date cu referire la speciile de VT. Cele mai clasice sunt observațiile în câmp (metoda transectelor, metoda pătraterelor etc.) și măsurătorile biometrice. Metodele tradiționale sunt adesea laborioase și uneori insuficiente pentru monitorizarea datelor cu referire la specii. În prezent există alternative noi (prelevarea probelor de ADN [126], modelarea [122], camera trapping-ul (captarea imaginilor) [72],) ce au o eficiență înaltă, pot fi parțial automatizate și vin să completeze potențialul actual de studiere a biodiversității.

Prelevarea și analiza probelor de ADN (DNA sampling) – poate fi efectuată într-un mod invaziv când animalele sunt prinse cu scopul de a li se recolta probe și noninvaziv – probele sunt colectate din mediul în care habitează organismele studiate (ADN de mediu). Metodele de monitorizare a diversității speciilor prin analiza ADN-ului de mediu sunt în plină dezvoltare și în viitor vor permite analize de metabarcodare ample cu evaluarea biodiversității ecosistemelor întregi. Datele pot fi colectate prin utilizarea a diferite tipuri de probe precum materii fecale, sol, pene, ouă, fire de păr etc.

Captarea imaginilor prin intermediul camerelor (Camera trapping) – camerele sunt utilizate în special pentru a studia animale relativ mari (păsări și mamifere) cu scopul detectării speciilor rare și estimării abundenței și dimensiunii populațiilor. În prezent există și tendințe de utilizare a camerelor pentru monitorizarea grupurilor de specii mici (în special a mamiferelor mici).

Monitorizarea acustică (Acousting monitoring) – presupune evaluarea faunei sălbatice cu utilizarea înregistratoarelor de sunet și a senzorilor acustici. Acestea sunt desfășurate în teren pentru ore, zile, sau săptămâni cu scopul de a înregistra date acustice după un anumit program. Înregistrările mai apoi se procesează pentru detectarea sunetelor speciilor de interes. Senzorii acustici sunt mici, neobservabili, non-invazivi și din ce în ce mai accesibili din punct de vedere al costului. Exemple cunoscute de monitorizare acustică sunt monitorizarea liliecilor și a mamiferelor marine.

Teledetecția (Remote sensing) – permite obținerea de informații despre specii fără a intra în contact fizic cu obiectul studiat. În contrast, alte tehnici de studiere a biodiversității necesită observarea sau colectarea probelor la fața locului (*in situ*). Termenul de teledetecție se referă în

general la utilizarea sateliților sau aeronavelor în scopul de a detecta și clasifica diferite obiecte de pe Pământ. Animalele studiate pot fi numărate manual, semi-automat sau automat cu utilizarea senzorilor și softurilor speciale. Rezultatele obținute prin aplicarea teledetecției depind de tehnologia utilizată, tipul imaginilor, specia studiată precum și de dimensiunea arealului cercetat.

Modelarea – utilizează algoritmi informatici care permit obținerea informațiilor relevante din date oportunistice. Pot viza aspecte spațiale sau temporale în cercetarea biodiversității, permit analiza la nivel de comunități sau țin de studierea speciilor individuale. Spre exemplu *Modelarea populațiilor (Population modelling)* permite evaluarea dinamicii populațiilor sub acțiunea diferitor condiții de mediu. Un exemplu cunoscut de modelare a populațiilor în studiul diversității vertebratelor terestre este modelarea relației pradă-prădător (modelul Lotka-Volterra), Fig. 1.1.

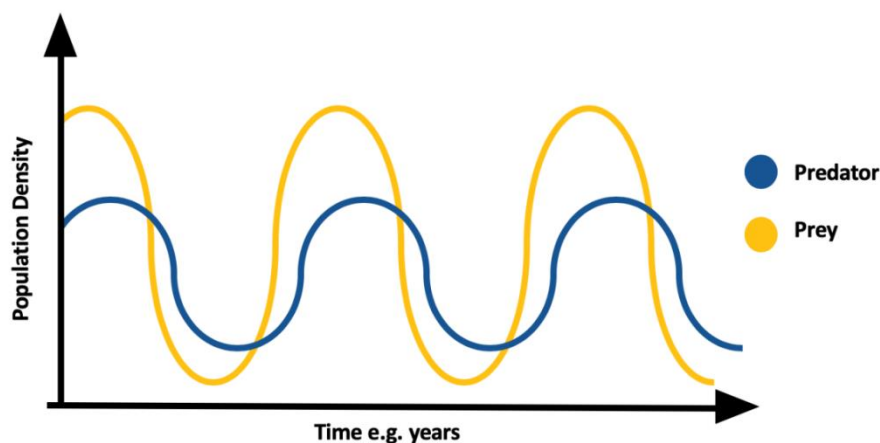


Fig. 1.1. Relația pradă-prădător [161]

Modelarea distribuției speciilor (SDM – Species distribution modelling) este un alt tip de modelare și are la bază corelarea coordonatelor geografice asociate prezenței cunoscute a speciilor cu valorile variabilelor de mediu [107]. Măsura în care un astfel de model va reflecta situația reală a distribuției speciilor depinde de un șir de factori precum: date de intrare corecte, algoritmul utilizat, tipul reliefului și a vegetației, dispersia biologică, interacțiunile biotice ș.a. Modelarea distribuției speciilor are multiple aplicații și beneficii. Aceasta poate ajuta la identificarea zonelor critice pentru conservare, la evaluarea impactului schimbărilor climatice asupra distribuției speciilor, la identificarea habitatelor potențiale pentru reintroducerea sau relocarea speciilor și la dezvoltarea planurilor de gestionare a speciilor invazive. De asemenea, modelele pot fi folosite în identificarea hotspot-urilor de biodiversitate și în evaluarea stării speciilor. Totuși, este important să fie menționat că SDM are anumite limitări și incertitudini

acestea putând fi rezultatul calității datelor de intrare, a variabilității în timp și spațiu a factorilor mediului, precum și a limitărilor tehnice și metodologice ale modelelor utilizate. De aceea, este important să se interpreteze rezultatele modelării distribuției speciilor cu precauție și să se țină cont de incertitudini. Este recomandat să se utilizeze mai multe tehnici și surse de date pentru a obține rezultate mai robuste și pentru a evalua variabilitatea rezultatelor. De asemenea, este esențial să se actualizeze modelele în mod regulat, pe măsură ce se adună noi date și se îmbunătățesc metodele de modelare. Cu toate că există incertitudini, utilizarea acestei metode în combinație cu date de teren și expertiză științifică ne poate oferi informații importante și perspective valoroase pentru conservarea speciilor și a ecosistemelor în care trăiesc. Tehnicile SDM sunt pe larg utilizate în cercetarea ecosistemelor terestre cunoscând o dezvoltare rapidă în special în ultimele două decenii [1, 37], iar obiectivul de bază al acestora este de a genera noi hărți de distribuție a speciilor de interes. Pe parcursul timpului au fost dezvoltati diverși algoritmi SDM precum Bioclim, GLM (Generalized Linear Model), MaxEnt, RF (Random Forest), BRT (Boosted Regression Tree), CL (CLIMEX) și alții toți având la bază procese diferite de generare a hărților de distribuție. Unele tehnici de modelare necesită date de intrare care să includă coordonate ale prezenței și absenței speciei (ex. GLM) în timp ce altele doar datele cu referire la prezență (MaxEnt, Bioclim) [1, 56, 95]. Alegerea algoritmului aplicat în cercetare depinde de datele de intrare disponibile și de scopul studiului [1, 37]. Bioclim este primul pachet SDM utilizat pe scară largă pentru generarea hărților de distribuție și reprezintă un model clasic bioclimatic (*Climate Envelope Model* – analizează variabilele climatice asociate habitatului unei anumite specii) [56]. Deși conform unor cercetări acesta a generat rezultate mai slabe în comparație cu alți algoritmi [36], un studiu efectuat în 2016 de către F. Shabani și colab. sugerează că Bioclim a demonstrat performanțe similare cu GLM, MaxEnt și CL, dar superioare algoritmilor BRT și RF [113]. Fiind ușor de aplicat și permițând modelarea distribuției speciilor cu un număr redus de locații cunoscute [22, 118], algoritmul Bioclim continuă a fi utilizat și în prezent [112].

În Republica Moldova datele cu referire la aplicarea tehnicilor de modelare a distribuției speciilor sunt limitate, prima lucrare în care a fost utilizat modelul Bioclim fiind prezentată în 2014 la un simpozion internațional care a avut loc în Chișinău [153]. Cercetările efectuate de autor au avut ca scop modelarea distribuției unor specii de nevertebrate din genul *Spodoptera* pe teritoriul României și a Republicii Moldova. Ulterior algoritmul Bioclim a fost aplicat pentru studierea unor specii rare de reptile din țara noastră precum șarpele cu patru linii răsăritean (*Elaphe sauromates*) și vipera de stepă (*Vipera ursinii*) [122, 152].

Acestea fiind spuse există mai multe motive care scot în evidență necesitatea utilizării metodelor menționate în cercetarea diversității vertebratelor terestre:

- ✓ Precizie și acuratețe. Metodele moderne permit obținerea de informații precise cu privire la biodiversitate. Spre exemplu, utilizarea tehnologiilor de secvențiere poate oferi informații genetice în baza cărora se poate realiza identificarea cu exactitate a speciilor și înțelegerea relațiilor filogenetice dintre ele.
- ✓ Eficiență și economie de timp. Permit colectarea și analiza rapidă a unui număr mare de eșantioane. De exemplu, utilizarea tehnicilor de metabarcodare permit identificarea rapidă a speciilor dintr-un amestec de ADN din surse diferite. Acest lucru economisește timp și resurse, comparativ cu metodele clasice care necesită identificarea tradițională a speciilor.
- ✓ Detectarea speciilor rare și invazive. Prin analiza ADN-ului de mediu, putem identifica speciile prezente într-un anumit habitat, inclusiv cele care sunt dificil de observat sau care nu pot fi identificate cu ușurință prin metode vizuale. Acest lucru este deosebit de important în monitorizarea speciilor invazive care pot avea un impact negativ asupra ecosistemelor locale.
- ✓ Detectarea și monitorizarea vectorilor bolilor infecțioase. Utilizarea tehnicilor de secvențiere și de diagnostic molecular permit identificarea atât a speciilor care transmit diverse boli, cât și a patogenilor asociați cu acestea. În consecință implementarea măsurilor de control și prevenire, contribuie atât la protejarea sănătății omului, cât și la conservarea unor ecosisteme sănătoase.
- ✓ Evaluarea detaliată a biodiversității. Abordările moderne contribuie la evaluarea diversității speciilor într-un mod mai cuprinzător și detaliat. Utilizarea tehnicilor moleculare, monitorizarea acustică, înregistrarea video și alte tehnologii ne permit să identificăm și să catalogăm speciile prezente într-un anumit habitat, inclusiv cele rare sau dificil de observat. Aceste informații sunt cruciale pentru evaluarea stării de conservare a speciilor și pentru dezvoltarea măsurilor adecvate de protecție.
- ✓ Conștientizarea și educația publicului. Utilizarea metodelor moderne în studierea diversității vertebratelor terestre poate contribui la conștientizarea și educația publicului în privința importanței conservării acestor specii și a habitatelor lor. Tehnicile avansate pot aduce informații captivante și ușor de înțeles pentru publicul larg. Prin utilizarea vizualizărilor tridimensionale, a simulărilor computerizate și a altor instrumente interactive putem transmite cunoștințe complexe într-un mod accesibil și atractiv. Aceste

informații pot fi utilizate pentru a genera interes și empatie față de VT și habitatul lor și pot stimula acțiuni concrete de conservare și protecție.

- ✓ Contribuția la conservare. Toate metodele menționate pot contribui semnificativ la eforturile de conservare a speciilor de VT și a habitatelor lor. Informațiile obținute prin aplicarea acestora pot fi utilizate pentru identificarea zonelor critice pentru conservare, dezvoltarea strategiilor de gestionare a speciilor și luarea deciziilor informate în planificarea conservării.

În studiul nostru ne-am propus să abordăm anumite metode moderne de cercetare a diversității vertebratelor terestre și anume analiza ADN-ului speciilor și modelarea distribuției acestora. SDM și cercetarea ADN-ului de mediu sunt instrumente de studiere a diversității speciilor care se pot completa reciproc. Spre exemplu se pot preleva probe de ADN din locațiile geografice în care există o probabilitate înaltă de a întâlni o anumită specie și invers - locațiile geografice în care a fost detectat ADN-ul unei specii pot fi utilizate în calitate de date de intrare pentru modelarea distribuției. Ambele metode presupun utilizarea softurilor și instrumentelor informatice, iar prelevarea și analiza ADN-ului poate fi efectuată în combinație cu aplicarea tehnicilor de biologie moleculară. Există mai multe studii recente care sugerează că combinarea acestor două instrumente de cercetare a diversității faunistice are un mare potențial atât pentru monitorizarea speciilor rare și invazive, cât și pentru evaluarea succesului reintroducerii speciilor [26, 83, 103]. În prezenta lucrare au fost abordate mai multe probleme existente în cercetarea diversității speciilor de vertebrate terestre din Republica Moldova și utilizate instrumente informatice și molecular-biologice pentru rezolvarea acestora. Aplicarea tehnologiilor în studierea acestor specii are un potențial enorm de a aduce schimbări semnificative în domeniul conservării. Prin promovarea cunoașterii și conștientizării, putem mobiliza resursele și acțiunile necesare pentru a proteja și conserva vertebratele terestre și habitatul lor, contribuind astfel la menținerea biodiversității și a echilibrului ecologic în țara noastră și în întreaga lume.

1.2. Studiile bioinformatică și barcodarea speciilor de animale în Republica Moldova

În Moldova primele cercetări cu privire la barcodarea nevertebratelor și a unor specii de pești au fost inițiate de către cercetătorii Ion Toderaș, Galina Bușmachi, Tatiana Șuleșco, Anna Moldovan și alții [82, 96, 128, 138]. Pe parcursul ultimei decade în baza de date globală *BOLD Systems* au fost înregistrate peste 400 barcoduri ale mai multor specii de plante și animale din Republica Moldova [101]. Majoritatea acestor înregistrări sunt reprezentate de specii de nevertebrate, performanță realizată datorită contribuției pe parcursul anilor a mai multor

cercetători [82, 96, 128]. Situația e diferită în ce privește înregistrarea markerilor moleculari ai speciilor de vertebrate terestre din Moldova până în anul 2022 în baza de date *BOLD Systems* [101] fiind înregistrate barcodurile citocrom oxidazei I a doar două specii: *Spermophilus citellus* [38] și *Triturus cristatus* [125]. La începutul anului 2023 datorită colaborării dintre cercetătorii Institutului de Zoologie al Universității de Stat din Moldova și Universității din Berna (Elveția), pe platforma Barcode of Life a fost înregistrat un proiect care urmărește depozitarea barcodurilor și metabarcodurilor moleculare ale vertebratelor terestre din Republica Moldova [116]. Până în prezent în cadrul proiectului au fost depozitate 13 barcoduri ale citocromului b care corespund speciilor *Microtus arvalis* și *Microtus levis/rossiaemeridionalis* (Anexa 3). În ce privește abordările bioinformatică care urmăresc cercetarea vertebratelor, acestea au fost inițiate în anul 2008 de către Viorel Munteanu, Alexei Levițchi și Maria Duca și au constatat în studierea factorilor de transcripție în procesul evoluției vertebratelor [84]. Aplicarea tehnicilor bioinformatică și molecular biologice pentru crearea primerilor la plante au fost descrise de către Daniela Galea-Abdușa, Rodica Martea (2014) [77] și alții [15, 81] iar primele studii *in silico* și *in vitro* cu referire la primerii sistemelor de metabarcodare a vertebratelor terestre au fost realizate începând cu anul 2021 [114, 115, 120]. Cercetări de importanță internațională care urmăresc dezvoltarea metodelor bioinformatică și a bazelor de date pentru analiza imunității adaptive la speciile de vertebrate sunt realizate de moldoveanul Serghei Mangul în Statele Unite la Universitatea din California de Sud [76]. Cât privește studiile metagenomice efectuate în Moldova acestea sunt puține și țin în special de cercetarea microbiomului uman [127] și a microbiomului solului [8], cercetarea în scopul monitorizării diversității faunistice fiind încă în stadiu incipient. Dezvoltarea bazelor de date de referință care să cuprindă speciile de vertebrate terestre din fauna actuală cu mitogenom în *RefSeq*, în comun cu crearea condițiilor de laborator, va permite aplicarea protocoalelor de secvențiere și utilizarea ADN-ului de mediu în calitate de instrument de monitorizare a faunei locale. Dezvoltarea sistemelor de metabarcodare a faunei terestre prezente în țara noastră va face posibilă detectarea a zeci și sute de specii într-un singur experiment.

1.3. Diversitatea vertebratelor terestre și potențialul ADN-ului de mediu

Studierea mecanismelor care întrețin diversitatea abundentă a vieții pe Pământ a fost și rămâne unul din scopurile de bază ale cercetărilor biologice. Biodiversitatea este extrem de importantă pentru supraviețuirea omului și este cea mai prețioasă și fragilă resursă de pe pământ. Aceasta implică multitudinea de date despre organizarea și diversitatea vieții de la scale mici la nivelul genelor și cromozomilor până la scale mari, la nivelul organismelor și ecosistemelor. În

prezent pierderea biodiversității este o problemă majoră pe întreg globul, iar principalele cauze ale acesteia sunt activitățile umane și schimbările climatice ce induc modificări ale habitatelor, apariția speciilor invazive, alterarea integrității genetice și a potențialului adaptiv al speciilor. Acțiunile distructive ale omului asupra habitatelor VT pot produce fenomenul de *Breeding Overlaps* (suprapunerea zonei de habitat a diferitor specii sau subspecii), ceea ce poate facilita transferul materialului genetic a unei specii în rezerva de gene a alteia. Experiența cercetătorilor sugerează că există mai multe specii de vertebrate terestre care se pot încrucișa și genera hibrizi cu potențial adaptiv scăzut, și care nu se încadrează în principiul de izolare reproductivă delimitat de specie. Hibridizarea poate fi definită ca încrucișarea indivizilor din două populații sau grupuri de populații distincte și în unele cazuri reprezintă o amenințare reală asupra diversității genetice a populațiilor reducând rata reproductivă și de supraviețuire a indivizilor. Fiind catalizat de factorul antropogen acest fenomen poate duce în timp chiar la dispariția speciilor. De asemenea integritatea genelor diferitor animale sălbatice poate fi afectată atunci când acestea produc hibrizi în urma încrucișării cu animale domestice. Animalele domestice au fost selectate artificial în funcție de stilul de viață al omului și atunci când își răspândesc genele în natură, pot influența o întreagă rețea de interacțiuni ecologice generând efecte dificil de previzionat [99]. Actualmente, în Republica Moldova, există diferite populații de vertebrate terestre care suportă fenomene de hibridizare sau care prezintă statut sistematic incert. Deoarece identificarea acestora doar în baza trăsăturilor morfologice este adesea imposibilă, diferențierea hibrizilor de liniile pure necesită aplicarea metodelor moleculare de genotipare și utilizarea diferitor markeri moleculari. Evaluarea molecular-biologică a fenomenului de hibridizare la VT este esențială pentru luarea măsurilor eficiente de bioconservare și implică atât studierea genomului mitocondrial, cât și a celui nuclear. Aceasta poate contribui la reducerea riscurilor sus-menționate și la dezvoltarea unor programe adecvate de management a populațiilor.

Starea actuală a vertebratelor terestre în Republica Moldova scoate în evidență unele provocări și amenințări care afectează populațiile de specii terestre. Republica Moldova este caracterizată printr-un habitat variat, care include păduri, mlaștini, stepe și câmpii agricole, oferind adăpost și hrană pentru o varietate de vertebrate terestre. Conform anumitor surse, în țara noastră sunt înregistrate 337 de specii dintre care 237 specii de păsări [101], 72 specii de mamifere (com. pers. Victoria Nisteanu), 14 specii de amfibieni și 14 specii de reptile (com. pers. Vladimir Țurcanu). Pierderea și fragmentarea habitatului din cauza extinderii agriculturii, a urbanizării și a infrastructurii rutiere afectează disponibilitatea resurselor alimentare și a zonelor de reproducere pentru aceste specii. Schimbările climatice pot avea, de asemenea, un impact negativ asupra speciilor terestre, prin modificarea distribuției și a disponibilității resurselor. Alte

amenințări includ vânătoarea ilegală, braconajul și poluarea. Aceste activități umane pot duce la reducerea populațiilor de vertebrate terestre și la diminuarea diversității biologice în ansamblu. De asemenea, există și riscul introducerii speciilor invazive care pot afecta echilibrul ecologic și pot concura cu speciile native pentru resursele disponibile (ex. speciile *Trachemis scripta* și *Emys orbicularis*). Pentru a proteja vertebratele terestre și pentru a conserva biodiversitatea în Republica Moldova, sunt luate diverse măsuri de conservare și gestionare a habitatelor naturale. Înființarea și administrarea ariilor protejate, cum ar fi parcurile naționale și rezervațiile naturale, contribuie la conservarea speciilor și a habitatelor lor. Este crucial să se dezvolte și să se implementeze politici de conservare a habitatelor naturale și să se promoveze practici agricole sustenabile, care să reducă impactul asupra speciilor terestre. În același timp, educația și conștientizarea publicului despre importanța biodiversității și necesitatea protejării speciilor sunt esențiale pentru a promova coexistența armonioasă între oameni și fauna sălbatică. De asemenea, este necesară desfășurarea proiectelor de cercetare și monitorizare a speciilor, cercetarea științifică continuând să joace un rol crucial în înțelegerea ecologiei speciilor terestre. Monitorizarea populațiilor, analiza la nivel genetic și studiile de habitat sunt instrumente importante în evaluarea stării speciilor și în dezvoltarea strategiilor de conservare eficiente.

Vertebratele terestre reprezintă o componentă importantă a biodiversității globale și conform International Union for Conservation of Nature (IUCN) cel puțin 15% dintre acestea sunt pe cale de dispariție [71]. Conform anumitor studii, în ultimii cinci sute de ani, rata extincției speciilor de vertebrate terestre în lume este de mai mult de o specie pe an [17, 71, 102], acest lucru impunând necesitatea unor măsuri urgente și eficiente de conservare. Monitorizarea diversității VT folosind doar metode tradiționale este în general laborioasă și dificilă, astfel în prezent există tendințe tot mai pronunțate de a utiliza tehnicile de analiză a ADN-ului de mediu în scopul cercetării diversității acestora. Spre exemplu, un studiu recent realizat în Danemarca a permis identificarea a 49 specii de vertebrate (30 - mamifere, 13 - păsări, 4 - pești, 1 - amfibieni și 1 - reptile) în baza moleculelor de eADN captate din aer [75]. Pentru amplificarea metabarcodurilor au fost utilizați primerii universali 12S-V5 [104] specifici vertebratelor și primerii 16Smam [133] concepuți pentru a analiza ADN-ul mamiferelor. O altă cercetare similară a demonstrat că extragerea și secvențierea eADN-ului din probe de sol se dovedește a fi o practică eficientă de monitorizare a diversității mamiferelor mici [72]. ADN-ul de mediu poate fi utilizat atât pentru detectarea unei singure specii (metodă aplicată în special pentru monitorizarea speciilor rare sau invazive), cât și pentru identificarea mai multor taxoni simultan. Metabarcodarea are un potențial enorm pentru biomonitoringul diferitor tipuri de ecosisteme, anumite studii încercând deja să standardizeze procesul de lucru pentru evaluarea diversității

speciilor acvatice [142]. În ecosistemele terestre metabarcodarea speciilor este mai anevoioasă însă cercetările în această direcție de asemenea contribuie la dezvoltarea protocoalelor experimentale și aplicarea lor în deciziile cu privire la mediu. Cercetarea eADN-ului vertebratelor terestre prezintă un potențial vast și cuprinde multiple aspecte:

Monitorizarea non-invazivă. Colectarea probelor este non-invazivă și poate fi realizată fără a deranja direct speciile țintă. Acest lucru este particular avantajos pentru studiul speciilor eluzive sau sensibile, deoarece elimină necesitatea observării directe sau capturării acestora, fapt ce poate fi stresant sau perturbator pentru animal.

Aplicații în conservare și gestionare. Oferă informații valoroase pentru planificarea conservării și strategiilor de gestionare a ecosistemelor și contribuie direct la identificarea zonelor cu biodiversitate ridicată, prioritizarea zonelor protejate și evaluarea eficienței intervențiilor de conservare și restaurare a habitatelor.

Interacțiunea între specii și dinamica trofică. Dezvăluie interacțiunile dintre diferite specii precum și rolul speciilor în rețelele ecologice. Prin identificarea semnelor moleculare provenite de la surse alimentare specifice se pot determina relațiile trofice și dinamica lanțului trofic.

Detectarea timpurie a speciilor invazive. Identificarea timpurie a speciilor invazive permite efectuarea intervențiilor rapide și aplicarea acțiunilor de gestionare. Astfel, cercetătorii pot determina amenințările potențiale și pot răspunde înainte ca acestea să provoace daune ireversibile.

Evaluarea impactului activităților umane. Detectarea schimbărilor în comunitățile faunistice poate oferi indicii cu privire la perturbările ecosistemelor cauzate de defrișări, urbanizare sau alte activități umane.

Diagnosticarea și monitorizarea bolilor. Contribuie la detectarea vectorilor bolilor infecțioase și a paraziților care afectează populațiile de vertebrate terestre permițând astfel prevenirea și îndepărtarea factorilor de risc pentru sănătatea omului și animalelor.

Determinarea speciilor criptice sau noi. Oferă posibilitatea de a diferenția speciile criptice sau de a descoperi specii noi. ADN-ul eliberat în mediul înconjurător poate dezvălui prezența unor specii necunoscute anterior sau care au fost greu de detectat prin metode tradiționale. Aceasta poate contribui la înțelegerea biodiversității și la identificarea zonelor de interes pentru cercetări ulterioare.

Monitorizarea diversității în timp real. Colectarea regulată a probelor dintr-un anumit habitat permite evaluarea dinamicii populațiilor și a schimbărilor în compoziția comunității faunistice.

Un exemplu interesant de aplicare a experimentelor de metabarcodare în ecosistemele terestre este limitarea așa numitelor fenomene *Birdstrike Hazards* din preajma aeroporturilor [24]. Implementarea practică a abordărilor menționate necesită utilizarea algoritmilor bioinformatici pentru designul primerilor, identificarea metabarcodurilor și crearea bazelor de date de referință ce permit atribuirea taxonomică a metabarcodurilor studiate. La fel de importantă este standardizarea tehnicilor experimentale de lucru în laboratorul de biologie moleculară. Dezvoltarea și integrarea acestor aspecte în campaniile de monitorizare a speciilor va permite eficientizarea evaluării diversității vertebratelor terestre [24, 59, 130].

Descoperirea și utilizarea eADN-ului în cursul ultimelor decenii a reprezentat o adevărată revoluție în domeniul științei biologice schimbând fundamental modul în care explorăm lumea vie din jurul nostru. Istoria cercetărilor ADN-ului de mediu a început în anul 1987 odată cu elaborarea unor rapoarte despre protocolul de extragere a acestuia din sedimente [90]. Trei ani mai târziu a fost publicat primul studiu cu referire la metabarcodare [46] acesta urmărind analiza diversității genei ARN-ului ribozomal 16S la procariote [130]. Ulterior metagenomica a devenit o rutină în cercetările microbiologice iar în anul 2003 a apărut prima lucrare în care a fost descrisă metabarcodarea macroorganismelor aceasta sugerând că este posibilă recuperarea ADN-ului fosil al megafaunei (mamuți, bizoni, cai) din permafrost și a ADN-ului unor specii de păsări dispărute (*Dinornithiformes*), din sedimentele peșterilor [145]. Un alt studiu semnificativ care a urmărit utilizarea ADN-ului de mediu pentru metabarcodarea vertebratelor terestre a fost efectuat în anul 2008 de către Ficetola și colaboratorii săi [40]. Aceștia au demonstrat că ADN-ul eliberat în mediul înconjurător de către amfibieni poate fi detectat și identificat prin intermediul tehnicilor de secvențiere. Ulterior, în anul 2010, Francesco Ficetola și colaboratorii propun o metodă de evaluare a calității și performanței barcodurilor cu utilizarea unei metode bioinformaticice ce prevede realizarea reacției de PCR *in silico* asupra secvențelor din bazele de date. În cadrul cercetărilor sale, acesta a comparat acoperirea taxonomică și rezoluția anumitor regiuni de ADN deja propuse pentru barcodarea vertebratelor [39]. Un an mai târziu, Tiayyba Riaz a propus un algoritm bioinformatic care permite identificarea metabarcodurilor noi și a primerilor asociați în baza unui grup de secvențe de interes [104]. În continuare, noile metode au permis o reducere considerabilă a timpului, efortului și costului dedicat cercetărilor ADN-ului de mediu datorită posibilității de a realiza designul și validarea bioinformatică a markerilor și primerilor asociați. Algoritmii bioinformatici au permis identificarea biomarkerilor [119] în limita condițiilor impuse cum ar fi dimensiunea redusă a metabarcodurilor și asigurarea parametrilor optimi pentru o bună desfășurare a reacției de PCR. În rezultat au apărut mai multe publicații care aveau la bază analiza eADN-ului macroorganismelor și se refereau atât la

detectarea unei singure specii [29, 48, 58], cât și la identificarea taxonilor multipli [137, 142]. În anii care au urmat, cercetătorii din întreaga lume au extins studiile de metabarcodare la toate grupurile de vertebrate terestre, demonstrând că acestea pot fi utilizate pentru investigarea și identificarea speciilor de mamifere [27], păsări [85], reptile [89] și amfibieni [129]. Astfel, tehnicile de metabarcodare au fost aplicate pentru evaluarea biodiversității în diferite tipuri de habitate terestre, inclusiv păduri [97], zone umede [74], deșerturi [35] și ecosisteme alpine [130]. Extragerea și analiza ADN-ului de mediu a oferit rezultate promițătoare în detectarea și monitorizarea speciilor rare, endemice sau amenințate, cum ar fi lupul [75], ursul polar [33] sau unele specii de șerpi [78]. Pe lângă identificarea speciilor, eADN-ul prezintă interes și pentru a studia alte aspecte care vizează vertebratele terestre, cum ar fi dieta [79], paraziții [9] sau chiar unele tulpini ale virusurilor [2]. Toate aceste studii au contribuit la dezvoltarea protocoalelor experimentale care vizează monitorizarea diversității faunistice totuși, încă există diverse provocări și limite asociate cu metabarcodarea animalelor adaptate la viața pe uscat. Una din principalele dificultăți este reprezentată de calitatea și stabilitatea eADN-ului. Acesta poate suferi modificări sub acțiunea unor factori precum lumina solară, temperatura ridicată sau enzimele prezente în mediu și care afectează integritatea și cantitatea de ADN disponibilă pentru analiză. Prin urmare, pentru a minimiza riscul de degradare este necesară colectarea corectă a probelor și gestionarea adecvată a mostrelor și a condițiilor de stocare. O altă provocare o reprezintă detectarea și identificarea speciilor din amestecul complex de ADN prezent în probe. Deoarece ADN-ul de mediu provine nu doar de la speciile investigate, ci și de la alte organisme prezente în ecosistem, analiza trebuie să fie capabilă să distingă între ADN-ul speciei de interes și ADN-ul non-target. Aceasta necesită utilizarea tehnicilor avansate de secvențiere și a unor algoritmi performanți de analiză a datelor. Pe lângă aceste aspecte tehnice unele specii pot elibera ADN în cantități mici sau pot prezenta dificultăți de detectare datorită diferitor factori ambientali sau biologici, iar procesarea unor astfel de mostre nu este la fel de simplă precum prelucrarea probelor proaspete de țesut. În consecință, nu există un protocol standard recomandat pentru extragerea tuturor tipurilor de eADN iar ajustarea protocoalelor de lucru se efectuează în funcție de specificul cercetărilor și a grupului de specii care urmează a fi studiat. De asemenea, selectarea markerilor genetici potriviți pentru grupuri de specii și dezvoltarea bazelor de date de referință rămân a fi o prioritate de bază pentru studiile de metabarcodare.

1.4. Metabarcodurile și designul primerilor

Barcodeurile sunt markeri genetici standardizați care servesc pentru identificarea taxonomică a speciilor [19, 52]. Proprietățile acestora sunt optimizate anume pentru acest scop și

nu întrunesc neapărat cerințele pentru identificarea mai multor specii simultan adesea în baza unui ADN de calitate joasă. Metabarcodurile sunt secvențe scurte de ADN sau ARN care pot fi utilizate pentru identificarea simultană a zeci sau chiar sute de specii. Astfel, pentru a evita potențialele confuzii este necesar de a face diferență între barcodurile clasice și metabarcoduri. Un metabarcod este format dintr-un fragment variabil, flancat de două structuri conservate care servesc în calitate de ancore pentru legarea primerilor (Fig. 1.2).

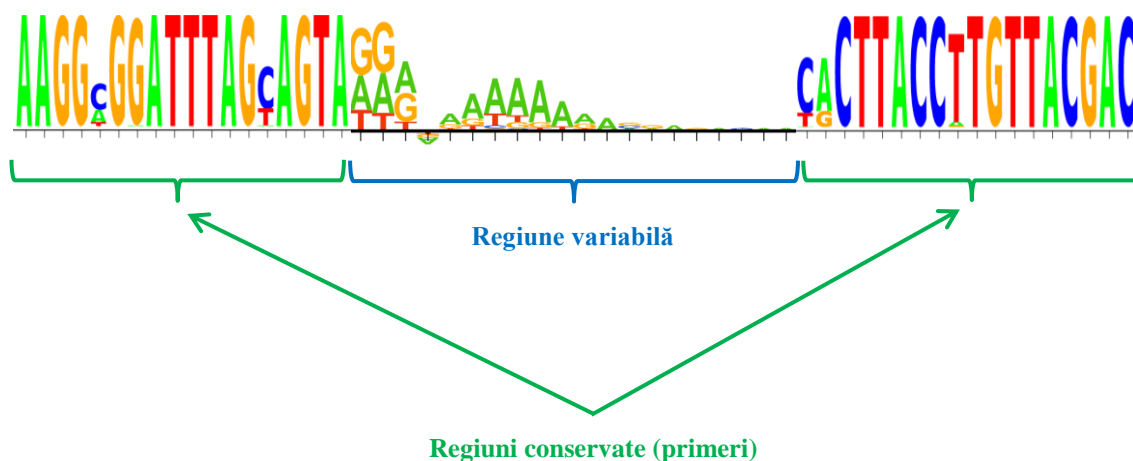


Fig. 1.2. Structura unui metabarcod [159]

Regiunile conservate sunt necesare pentru realizarea reacției de amplificare, iar cea variabilă - pentru a permite identificarea și diferențierea între taxoni. Acest proces se realizează prin compararea secvențelor obținute în urma secvențierii metabarcodurilor cu secvențele din bazele de date de referință, iar atribuirea statutului taxonomic are loc în baza gradului de similaritate sau divergență a acestora. Deși suntem încă departe de a putea efectua metabarcodarea ADN-ului tuturor speciilor existente, efortul și inițiativele de creare a sistemelor de metabarcodare/ bazelor de date regionale, împreună cu scăderea semnificativă a costurilor de secvențiere vor permite în viitor realizarea acestei sarcini deloc ușoare. Dezvoltarea și actualizarea bazelor de date de referință a devenit un proces continuu și dinamic. Pe măsură ce noi secvențe sunt generate și sunt obținute noi informații taxonomice, bazele de date de referință sunt create, actualizate și îmbunătățite pentru a reflecta aceste descoperiri. Acest proces implică colaborarea între comunitatea științifică, instituții de cercetare și organizații, care contribuie la colectarea și diseminarea datelor genomice și taxonomice. Secvențele utilizate pentru crearea bazelor de date de referință pot fi selectate astfel încât să corespundă aceluiași locus genomic sau în cazul cercetării ADN-ului procariot se pot utiliza chiar genomuri întregi. Odată cu dezvoltarea

tehnologiilor și îmbunătățirea algoritmilor de procesare *big data* ar putea deveni posibilă chiar crearea sistemelor de metabarcodare cu utilizarea de genomuri eucariote întregi [130].

Designul primerilor reprezintă un aspect crucial al procesului de metabarcodare, având un impact semnificativ asupra eficienței și acurateței identificării speciilor. Este necesar ca primerii să fie specifici pentru regiunea genomică dorită și să permită amplificarea selectivă a ADN-ului țintă, minimizând amplificarea nedorită a altor secvențe. Alegerea greșită a primerilor poate duce la apariția diferitor ambiguități și la rezultate inexacte în procesul de cercetare a diversității faunistice. Totuși, în cazul în care nu este posibilă crearea primerilor ce discriminează între speciile target și cele non-target, pot fi utilizate oligonucleotide sau primeri de blocare care se leagă de secvențele nespecifice și împiedică amplificarea acestora prin diferite mecanisme (Fig. 1.3).

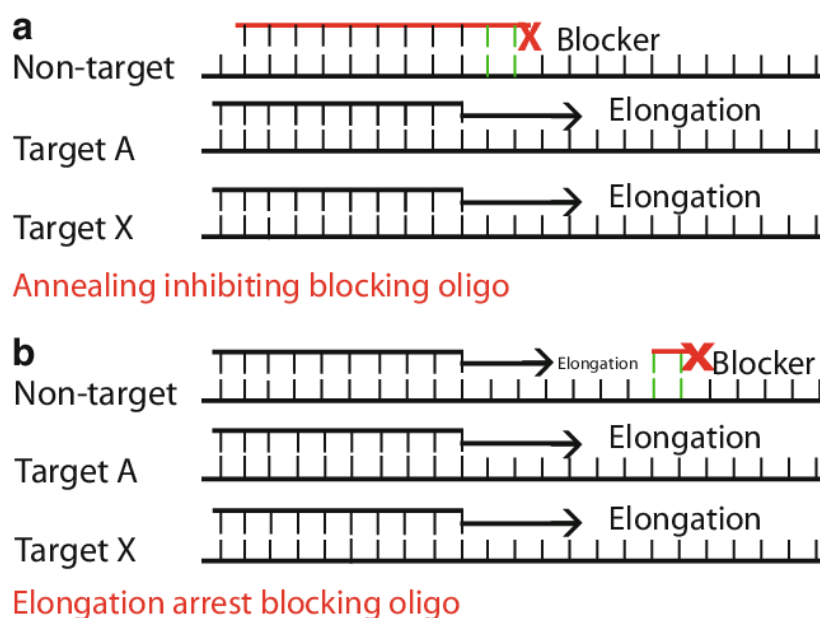


Fig. 1.3. Mecanisme de blocare a amplificării ADN-ului non-target [143]

(a – blocare la etapa de aliniere; b – blocare la etapa de elongare)

Principala caracteristică a primerilor de blocare este complementaritatea cu secvențele nespecifice și modul în care aceștia interferează cu reacțiile de amplificare. Astfel, în timpul ciclurilor de denaturare și reasociere a catenelor de ADN în cadrul reacției de PCR, primerii de blocare se leagă mai rapid și mai strâns de secvențele nespecifice, împiedicându-le să participe la reacția de amplificare.

Există mai mulți algoritmi și instrumente bioinformatică dezvoltate special pentru a facilita obținerea primerilor potriviți, fiecare având caracteristicile, avantajele și dezavantajele sale. Un algoritm specializat în proiectarea primerilor pentru studii de metabarcodare este

ecoPrimers [104]. Acesta permite designul primerilor specifici în baza analizei unor seturi mari de date, oferind posibilitatea identificării markerilor moleculari potriviți pentru studii de metabarcodare. Algoritmul *ecoPrimers* a fost dezvoltat ca o abordare flexibilă, care permite cercetătorilor să ajusteze diferiți parametri, cum ar fi lungimea primerilor, dimensiunea metabarcodurilor, numărul de nepotriviri per primer și alte aspecte în funcție de cerințele specifice ale proiectului de cercetare. Pentru a evalua performanța unui sistem de metabarcodare și a primerilor asociați sunt utilizați doi indici importanți (Fig. 1.4):

1. **Bc** sau indicele de acoperire (*Coverage Index*) – corespunde raportului dintre numărul taxonilor amplificați și numărul total de taxoni din baza de date de referință [39].
2. **Bs** sau indicele de specificitate (*Specificity Index*) – este definit ca raportul dintre numărul taxonilor corect identificați și numărul taxonilor amplificați [39].

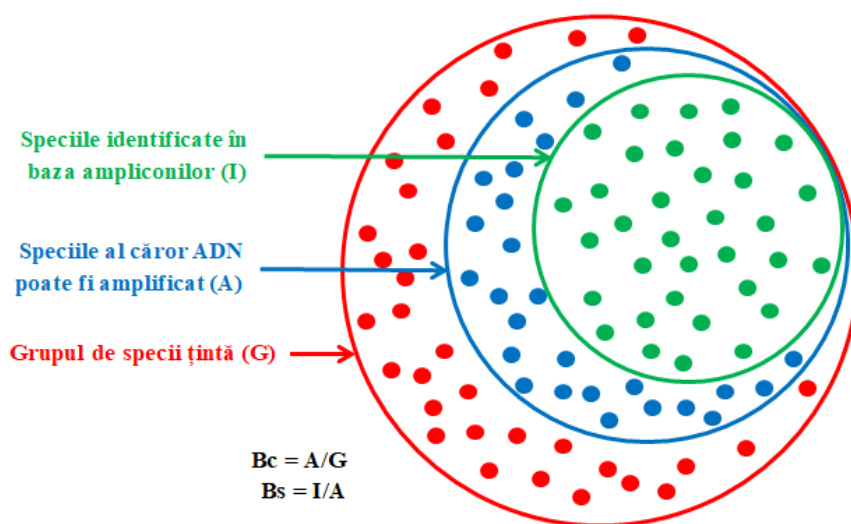


Fig. 1.4. Calcularea indicilor Bc (acoperirea taxonomică) și Bs (rezoluția taxonomică)

Bc și *Bs* pot fi determinate atât *in silico* cât și *in vitro* și oferă informații cruciale cu privire la calitatea secvențelor și la capacitatea primerilor de a identifica corect organisme sau taxoni specifici. Acoperirea taxonomică indică gradul de captură a diversității reale a taxonilor studiați și reflectă cât de bine este reprezentată această diversitate în secvențele amplificate. Cu cât acest parametru este mai mare, cu atât se obține o imagine mai completă a grupului de specii investigat. Pe de altă parte rezoluția taxonomică ține de precizia, fiabilitatea și nivelul taxonomic până la care pot fi identificate organismele. O valoare scăzută a acesteia indică prezența unor erori de atribuire și ambiguități în identificarea taxonilor inferiori. Există mai multe strategii și

abordări care pot fi aplicate pentru a spori performanța acestor parametri în studiile de metabarcodare. Unele dintre acestea includ:

Identificarea și selectarea unor secvențe de calitate. Secvențele pot fi identificate în bazele de date publice și înainte de selectarea acestora este necesară stabilirea clară a obiectivelor cercetării. O platformă cu secvențe de calitate recomandate pentru designul și validarea bioinformatică a primerilor o reprezintă banca de gene *RefSeq* [91]. Secvențele din acest repository sunt supuse unui proces riguros de curățare, verificare și adnotare. Fiind o bază de date oficială și recunoscută, *RefSeq* respectă standardele și formatele actuale facilitând interoperabilitatea și compatibilitatea cu alte platforme și instrumente bioinformatic. Extragerea secvențelor relevante se poate face în format FASTA sau GenBank în funcție de scopul și cerințele studiului.

Validarea și evaluarea in silico a calității primerilor. Evaluarea bioinformatică a performanței primerilor utilizați în procesul de amplificare a ADN-ului de mediu poate reduce semnificativ costurile unui experiment de metabarcodare permițând selectarea celei mai optime perechi de primeri pentru o bună desfășurare a studiului. Există diverse instrumente și tehnici de simulare computațională a reacției de PCR ce permit determinarea parametrilor de calitate și identificarea potențialelor probleme, cum ar fi amplificarea nespecifică sau interferențele cu regiuni genomice non-target. Un instrument bioinformatic valoros care este utilizat de către cercetători pentru simularea reacției de amplificare a ADN-ului este algoritmul *ecoPCR* [39]. *ecoPCR* asigură evaluarea riguroasă a performanței primerilor și selectarea corectă a acestora fapt ce permite obținerea unor rezultate de amplificare și secvențiere de înaltă calitate.

Optimizarea protocoalelor experimentale. Factorii experimentali, cum ar fi parametrii de amplificare și condițiile de secvențiere, pot influența acoperirea și rezoluția taxonomică. Optimizarea acestor parametri contribuie la o mai bună reprezentare a diversității faunistice cercetate, la creșterea preciziei și la reducerea erorilor experimentale.

Dezvoltarea și actualizarea sistemelor de metabarcodare de referință. Existența unor baze de date de referință actualizate și cuprinzătoare și care vizează diverse grupuri de specii este esențială pentru o clasificare corectă a secvențelor de metabarcod.

Integrarea datelor moleculare cu alte tipuri de date. Combinarea datelor molecular biologice cu unele informații ecologice, cum ar fi datele despre abundență sau distribuție a speciilor, poate oferi o perspectivă mai cuprinzătoare și detaliată asupra unui experiment.

Un aspect important în proiectarea experimentelor de metabarcodare este lungimea metabarcodului care poate varia în funcție de regiunea genomică utilizată, de obiectivele studiului și de gradul de fragmentare a ADN-ului analizat. În general, aceasta poate varia de la

câteva zeci de baze până la câteva sute de baze nucleotidice. O dimensiune optimă este determinată de mai mulți factori, precum nivelul de rezoluție taxonomică dorit, variabilitatea secvențelor în regiunea respectivă, disponibilitatea bazelor de date de referință și metoda de secvențiere utilizată. Pentru o rezoluție taxonomică mai înaltă, pot fi preferați markerii mai lungi, deoarece aceștia conțin mai multă informație genetică despre taxonii cercetați și pot ajuta la diferențierea mai precisă între specii. Cu toate acestea, metabarcodurile cu dimensiuni mai mari pot prezenta risc crescut de amplificări nespecifice și prezintă o probabilitate mai mare de degradare și fragmentare (spre exemplu în cazul probelor de ADN din materiile fecale). Pe de altă parte, markerii mai scurți pot fi preferați în situațiile în care se dorește o acoperire taxonomică mai largă sau când regiunea genomică studiată prezintă o variabilitate mare. Dimensiunea redusă a secvențelor de referință micșorează riscul formării dimerilor de primeri, scade probabilitatea amplificărilor nespecifice și crește șansa de a amplifica cu succes secvențele degradate cum sunt cele din probele de mediu. În practică, ținându-se cont de gradul înalt de fragmentare a eADN-ului, se utilizează metabarcoduri scurte de aproximativ 100-200 perechi de baze (acestea asigură o amplificare eficientă în ciuda posibilelor degradări și modificări la nivelul materialului genetic) care însă pot furniza suficiente informații pentru a permite diferențierea între taxoni [130].

În ce privește regiunile genomice abordate, acestea pot viza atât markeri mitocondriali, cât și nucleari, în funcție de necesitățile studiului și de speciile investigate. Genele mitocondriale sunt adesea utilizate în experimente de metabarcodare întrucât pot prezenta un grad înalt de conservare în cadrul unui grup taxonomic și variază semnificativ între grupuri prin aceasta facilitând identificarea și clasificarea speciilor. De asemenea, acestea pot fi utilizate la o gamă largă de organisme întrucât în bazele de date publice există multe specii care au genomul mitocondrial secvențiat în întregime.

1.5. ADN-ul mitocondrial al vertebratelor terestre. Analiza filogenetică

ADN-ul mitocondrial (ADNmt) este un component esențial al celulelor vertebratelor terestre și joacă un rol important în studierea diversității genetice și a evoluției acestor organisme. Acesta se găsește în mitocondriile celulelor și este moștenit în principal de la sexul femel la majoritatea speciilor de VT. Moștenirea ADNmt pe linie maternală se datorează faptului că mitocondriile spermatozoizilor sunt în general excluse în timpul fecundării fiind localizate în regiunea cozii. Din punct de vedere structural ADNmt este o moleculă circulară destul de conservată în cadrul grupurilor de vertebrate, dar pot exista variații mici în ceea ce privește lungimea și secvența acestuia. Informațiile genetice care se conțin în ADN-ul mitocondrial au un

rol semnificativ în studierea diversității vertebratelor terestre. Aceste informații sunt esențiale pentru înțelegerea modului în care speciile evoluează, se diversifică și se adaptează la mediu.

Mitocondriile vertebratelor terestre conțin 3 tipuri importante de regiuni de ADN mitocondrial (ADNmt) care pot fi utilizate în calitate de markeri moleculari. Acestea sunt:

1. genele responsabile de sinteza ARN-ului ribozomal;
2. genele codificatoare de proteine;
3. regiunile de control (ADNmt necodificator).

Genele responsabile de sinteza ARN-ului ribozomal sunt de două tipuri – 12S și 16S. Acestea codifică secvențe de ARN ribozomal, astfel jucând un rol important în procesul de biosinteză a proteinelor. La vertebratele terestre genele 12S și 16S sunt utilizate pe scară largă în cercetările evolutive, filogenetice și de biodiversitate [7]. De asemenea, acestea pot oferi indicii asupra evoluției convergente sau divergente între linii filogenetice și pot contribui la înțelegerea proceselor de speciație. Variabilitatea interspecifică 12S poate fi utilizată pentru a estima divergența genetică între specii precum și pentru identificarea acestora. Un exemplu cunoscut de cercetare a genei ARN-ului ribozomal 12S cu scopul identificării speciilor de vertebrate este lucrarea lui Riaz și colab. din 2011 publicată în revista *Nucleic Acid Research* [104]. Într-un alt studiu în baza haplotipurilor 12S au fost determinate efectele izolării geografice asupra diversității genetice a speciei periclitată *Testudo graeca* [6]. Gena 16S prezintă o rată mai lentă de evoluție fiind mai conservată în timp și poate servi pentru studierea familiilor și genurilor. Totuși, este important de a se menționa că gradul de conservare poate fi diferit între diferite regiuni genice, unele prezentând o conservare mai mare, pe când altele demonstrând o variabilitate mai înaltă. De asemenea, nivelul de conservare poate varia între diferiți taxoni și linii evolutive.

Genele mitocondriale codificatoare de proteine. Sunt responsabile pentru producția de proteine mitocondriale esențiale, cum ar fi componentele lanțului respirator mitocondrial și alți factori necesari pentru sinteza proteinelor mitocondriale. O caracteristică distinctivă a genelor mitocondriale codificatoare de proteine este faptul că ele prezintă unele particularități în comparație cu genele codificatoare de proteine din genomul nuclear fiind mult mai scurte și în mare parte codificând doar o singură proteină. Mutațiile și disfuncțiile acestor gene pot avea consecințe grave asupra funcționării mitocondriilor și pot afecta producția de energie în celule. Secvențele de ADN mitocondrial codificator de proteine, cum ar fi citocromul b (CYTB) și citocrom-oxidaza I (Cytochrome Oxidase I sau COI), sunt adesea selectate ca ținte pentru barcodarea speciilor. Acestea prezintă anumite caracteristici și avantaje pentru acest scop demonstrând o eficacitate înaltă la un spectru larg de organisme, inclusiv animale, plante și

fungi, iar faptul că prezintă o lungime convenabilă pentru amplificare și secvențiere le fac eficiente din punct de vedere practic. De asemenea, deoarece mitocondriile sunt prezente în mai multe copii per celulă, iar fiecare mitocondrie conține mai multe copii ale genomului mitocondrial, sporesc șansele de extracție și amplificare reușită a acestor gene, în special atunci când se lucrează cu mostre de calitate scăzută sau concentrație joasă de ADN. Există variate studii care au urmărit barcodarea CYTB și COI la vertebratele terestre. Spre exemplu în scopul cercetării diversității genetice și facilitării măsurilor de conservare a gazelei tibetane (*Procapra picticaudata*), au fost utilizate secvențe ale CYTB [149], iar pentru documentarea diversității moleculare a unor exemplare de muzeu ale ciocănitoarei cu cioc de fildeș (*Campephilus principalis*) a fost realizată barcodarea citocrom-oxidazei I [42]. O altă genă mitocondrială codificatoare de proteine și care prezintă importanță în calitate de marker molecular a vertebratelor terestre este subunitatea 5 a dehidrogenazei NADH. Aceasta a fost utilizată pentru analiza filogenetică a felinelor și a permis diferențierea cu succes a opt grupuri monofiletice separate [60]. Deși markerii menționați, în special CYTB și COI, corespund necesităților pentru barcodarea speciilor, aceștia ar putea să nu fie cea mai potrivită alegere când vine vorba de metabarcodare. Spre exemplu, anumite studii la animale au demonstrat că gena COI are o eficacitate limitată în secvențierea mai multor specii simultan, putând favoriza amplificarea unor taxoni în detrimentul altora [28]. Acest lucru se poate întâmpla din cauza dimensiunii reduse a metabarcodurilor în comparație cu cea a barcodurilor, variabilității secvențelor de legare a primerilor și dificultății de concepere a unui set de primeri care să acopere și să amplifice în același timp întregul grup de specii investigate. Toate acestea pot distorsiona compoziția reală a diversității faunistice și pot conduce la sub- sau supra-reprezentarea anumitor specii.

Regiunea mitocondrială de control (Control Region - CR). Reprezintă o secvență de ADN distinctă a genomului mitocondrial și este compusă din mai multe sub-regiuni, printre care se numără D-loop-ul, regiunea de replicare a ADN-ului și regiunea de inițiere a transcripției. D-loop-ul este cea mai studiată și mai variabilă parte a regiunii de control mitocondrial fiind cunoscută și sub denumirea de regiune mitocondrială hipervariabilă (Hypervariable Region - HVR). Aceasta este non-codantă, are rol în reglarea activității mitocondriale și prezintă un nivel de variație mare în comparație cu ADN-ul codificator (fapt datorat presiunilor funcționale reduse). Incluzând elemente de legare a factorilor de transcripție mitocondrială și a proteinelor implicate în replicare permite interacțiunea dintre diferite molecule asigurând o desfășurare corectă a proceselor de transcripție și replicare. În comparație cu genele ARN-ului ribozomal sau genele codificatoare de proteine, secvența D-loop se caracterizează printr-o rată ridicată a inserțiilor, delețiilor sau substituțiilor. Având o dimensiune de aproximativ 1 kb aceasta poate fi

ușor amplificată, secvențiată și evaluată bioinformatic în scopul studierii raselor sau variațiilor intraspecifice [30, 150]. De asemenea, regiunea mitocondrială de control poate fi utilă în investigații criminalistice și arheogenetice contribuind la rezolvarea unor probleme complexe legate de identificarea indivizilor și reconstrucția istoriei populațiilor.

ADN-ul mitocondrial este considerat al doilea sistem genetic informațional al celulelor eucariote și în anumiți loci are o variabilitate care corelează cu procesele evolutive. Aceste caracteristici fac din genomul mitocondrial o resursă valoroasă inclusiv pentru înțelegerea filogeniei și diversității genetice a speciilor. Analiza filogenetică a secvențelor de ADN mitocondrial permite estimarea relațiilor evolutive și a distanțelor genetice între diferite grupuri de organisme precum populațiile, speciile, genurile etc. Anterior, analiza filogeniilor se baza pe comparația morfologică a diferitor fosile, iar datele despre acestea erau limitate. În prezent studiile filogenetice implică în mare parte utilizarea secvențelor moleculare, acestea oferind o perspectivă de cercetare a biodiversității printr-o modalitate obiectivă de a compara unicitatea și diversitatea diferitor taxoni [88]. Pentru analiza filogenetică a speciilor de vertebrate terestre, se utilizează în principal secvențe de ADN, cum ar fi secvențe ale genelor mitocondriale sau nucleare. Aceste secvențe, obținute prin tehnici de secvențiere permit identificarea variațiilor genetice între diferite categorii taxonomice și construirea arborilor filogenetici. Aceștia oferă o reprezentare grafică a filogeniei indicând gradul de similaritate, înrudire evolutivă, divergența sau distanța genetică între specii. De asemenea, în baza analizelor filogenetice se pot identifica evenimente importante din punct de vedere evolutiv, cum ar fi fenomenele de speciație, apariția unor caractere specifice și răspândirea acestora în cadrul grupului de specii studiat. Pe lângă înțelegerea evoluției, cercetările filogeniei speciilor de vertebrate terestre au implicații semnificative în domeniul conservării. Acestea ar putea facilita identificarea speciilor vulnerabile sau endemice și stabilirea priorităților în eforturile de conservare. De asemenea, ar contribui la evaluarea impactului schimbărilor de mediu și amenințărilor antropice asupra diversității și la dezvoltarea strategiilor de conservare bazate pe evoluția și relațiile filogenetice ale speciilor.

1.6. Concluzii la capitolul 1

1. Metodele moderne de cercetare a diversității vertebratelor terestre au o eficiență înaltă și vin să le completeze pe cele tradiționale facilitând studierea aspectelor moleculare și distribuției speciilor.
2. SDM și cercetarea ADN-ului sunt instrumente de studiere a biodiversității care se pot completa reciproc. Există mai multe studii recente care sugerează că combinarea acestor abordări prezintă un mare potențial pentru studierea diversității faunistice.
3. Utilizarea bioinformaticii și a tehnicilor moleculare pentru identificare taxonomică devine o practică de rutină în cercetarea diversității speciilor și ține atât de aplicarea soluțiilor simple, low-cost (PCR, RFLP-PCR) cât și de punerea în practică a protocoalelor de secvențiere care presupun costuri mai mari.
4. În anul 2010, Francesco Ficetola și colaboratorii propun o metodă de evaluare a calității și performanței barcodurilor cu utilizarea unei metode bioinformaticice ce prevede realizarea reacției de PCR *in silico* asupra secvențelor din bazele de date. În cadrul cercetărilor sale, acesta a comparat acoperirea taxonomică și rezoluția anumitor regiuni de ADN deja propuse pentru barcodarea vertebratelor. Un an mai târziu, Tiayyba Riaz a propus un algoritm bioinformatic care permite identificarea metabarcodurilor noi și a primerilor asociați în baza unui grup de secvențe de interes. În continuare, noile metode au permis o reducere considerabilă a timpului, efortului și costului dedicat cercetărilor ADN-ului de mediu datorită posibilității de a realiza designul și validarea bioinformatică a markerilor și primerilor asociați.
5. Pe parcursul ultimilor 15-20 ani în baza de date globală *BOLD Systems* au fost depozitate peste 400 barcoduri moleculare a 85 specii de plante și animale din Republica Moldova. Din totalul acestor înregistrări până în anul 2022 s-au înregistrat barcodurile citocrom oxidazei I a doar două specii de vertebrate terestre: *Spermophilus citellus* și *Triturus cristatus*.
6. Bioclim este primul și cel mai vechi algoritm SDM utilizat pe scară largă pentru generarea hărților de distribuție. Fiind ușor de aplicat și permițând modelarea distribuției speciilor cu un număr redus de locații cunoscute, acesta continuă a fi utilizat și în prezent. În Republica Moldova datele cu referire la aplicarea tehnicilor SDM sunt limitate prima lucrare în care a fost utilizat modelul Bioclim fiind prezentată în 2014.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Pentru realizarea cercetărilor propuse au fost efectuate activități în teren, aplicate instrumente bioinformatică și utilizate tehnici de biologie moleculară. În cele ce urmează sunt prezentate materialele și metodele abordate pentru realizarea prezentei lucrări.

Metode de observare, colectare și prelucrare primară a materialului biologic în teren. Probele de țesut au fost prelevate de la animale moarte identificate sporadic sau vâdate (în cazul păsărilor și mamiferelor mari) și de la animale capturate în capcane (în cazul mamiferelor mici). Speciile de amfibieni și reptile au fost capturate manual. Tipurile de țesut prelevat au variat în funcție de specie și starea animalelor (de la piele și mușchi până la organe interne). După prelevare probele au fost fixate în alcool etilic de 96% și păstrate la -20 °C până la extragerea ADN-ului. Acestea au servit în calitate de eșantioane pentru extragerea ADN-ului și au fost păstrate în congelator până la efectuarea analizelor de laborator.

Instrumente și metode bioinformatică. În scopul realizării designului și testării *in silico* a primerilor pentru metabarcodare au fost utilizate softurile *ecoPrimers* [104], *ecoPCR* [39] și *OBITools* [14]. Acestea sunt utilizate pentru analiza datelor genomice în studiile de metabarcodare și sunt distribuite ca software open source. Algoritmul *ecoPrimers* poate fi utilizat pentru identificarea noilor markeri și a primerilor asociați, în timp ce *ecoPCR* permite testarea acestora prin realizarea PCR-ului *in silico* asupra unei baze de date de secvențe (asociate cu speciile din grupul țintă). Împreună, aceste programe permit designul și validarea *in silico* a primerilor de interes. Pentru descrierea suplimentară a proprietăților primerilor obținuți a fost utilizat instrumentul online de analiză a secvențelor oligonucleotidice *PrimerROC* [61]. Evaluarea gradului de conservare a primerilor și reprezentarea grafică au fost efectuate cu ajutorul limbajului R [100] și a librăriilor *ROBITaxonomy* [4], *ROBITools* [5] și *ROBIBarcodes* [3]. Baza de date cu mitogenomurile de referință a fost creată cu utilizarea platformei NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [110] și conține 174 genomuri mitocondriale (un genom per specie). Aceasta a fost generată în urma verificării individuale în baza de date globală RefSeq a 337 specii de vertebrate terestre din fauna Republicii Moldova. Analiza filogenetică și modelarea distribuției speciilor au fost realizate cu utilizarea limbajului R.

Metode de biologie moleculară. Probele prelevate au fost supuse analizelor de laborator care au constat în extragerea ADN-ului, efectuarea reacției de PCR convențional, digestia cu enzime de restricție și electroforeza pe gel de agaroză. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost utilizat instrumentul mobil *Bento Lab* pentru extragerea, amplificarea și vizualizarea ADN-ului.

2.1. Colectarea și prelucrarea primară a materialului biologic în teren

Colectarea și păstrarea corespunzătoare a țesuturilor speciilor de vertebrate este fundamentală pentru extragerea reușită a ADN-ului nuclear și mitocondrial întrucât post-mortem sau după prelevarea probei materialul biologic degradează rapid. De asemenea, este esențială documentarea istoricului individual al fiecărui specimen fiind importante sexul, vârsta, regiunea geografică, starea animalului în momentul prelevării probei etc. Procedura de colectare în sine va depinde de specia studiată, buget, transportul disponibil, starea specimenului sursă (viu sau mort) precum și de timpul care trece până la stocarea corespunzătoare a probei. Unele animale pot fi vectori de transmitere a diferitor zoonoze precum leptospiroza sau rabia, de aceea este necesară respectarea măsurilor de securitate biologică. Prelevarea probelor de la mamifere și păsări vii ca regulă este relativ ușoară, foliculii de păr și calamusul penelor furnizând de obicei suficiente celule pentru obținerea unor cantități utile de ADN [50, 94, 126]. În ce privește amfibienii și reptilele, acestora le lipsește un astfel de țesut ușor accesibil, iar colectarea probelor poate implica abordări invazive, cum ar fi colectarea de sânge, îndepărtarea degetelor sau tăierea bucăților din coadă. O alternativă non-invazivă în ce privește prelevarea mostrelor de la amfibieni și reptile ar fi tamponul bucal sau utilizarea bucăților de piele rezultate în urma procesului de năpârlire. În cadrul cercetărilor efectuate tipurile de probe prelevate au variat în funcție de specie și starea animalelor (de la tampon bucal și calamusul penelor până la piele, mușchi și organe interne). Acestea au fost colectate de la animale vii, animale moarte identificate sporadic sau vâdate (în cazul păsărilor și mamiferelor mari) și de la animale prinse în capcane (în cazul mamiferelor mici). Speciile de amfibieni și reptile au fost capturate manual (Tabelul 2.1). După colectarea probelor, animalele vii au fost eliberate în habitatul în care au fost identificate iar mostrele de țesut – fixate în alcool etilic de 96% (Fig. 2.1) și păstrate la -20 °C până la extragerea ADN-ului.



Fig. 2.1. Mostre de țesut fixate în alcool etilic de 96%

În Tabelul 2.1 sunt prezentate unele specimene incluse în cercetare precum și detalii cu referire la prelevarea probelor.

Tabelul 2.1. Documentarea unor specimene de vertebrate terestre incluse în studiu

Imagini foto	Documentare specimen
	<p><i>Broască roșie de munte (Rana temporaria)</i>. Identificată în Rezervația Naturală Plaiul Fagului în luna noiembrie, anul 2022. Este o specie vulnerabilă (VU) inclusă în Cartea Roșie a Republicii Moldova, în Anexa II a Convenției de la Berna și în Directiva Habitare. Au fost colectate probe de tampon bucal și tampon de piele.</p>
	<p>Amfibian devorat de un răpitor în Rezervația Naturală Pădurea Domnească. Identificare probabilă în baza morfologiei resturilor - <i>Broască râioasă brună (Bufo bufo)</i>, specie vulnerabilă (VU) inclusă în Cartea Roșie și în Anexa II a convenției de la Berna . Au fost prelevate probe de piele.</p>
	<p><i>Șopârlă cenușie (Lacerta agilis)</i>. Capturată în localitatea Stăuceni, municipiul Chișinău în iulie, 2022. În calitate de probă a fost utilizată o porțiune de coadă lăsată de animal.</p>
	<p><i>Șarpele cu patru linii răsăritean (Elaphe sauromates)</i>. A fost descoperit mort în luna noiembrie, 2022, la marginea traseului de lângă lacul Sărata Nouă. Specie critic periclitată (CR), inclusă în Lista Roșie IUCN, Anexa IV a Directivei Habitare, Anexa II a Convenției de la Berna, Cartea Roșie a Europei și Cartea Roșie a Republicii Moldova. Au fost prelevate probe de piele și mușchi.</p>

	<p><i>Șorecar comun (Buteo buteo)</i> identificat mort pe marginea traseului în preajma localității Bucovăț. A fost luat animalul în întregime iar după prelevarea probelor de piele pentru analize molecular biologice a fost transmis în laboratorul de parazitologie pentru studii ulterioare. Noiembrie, 2022.</p>
	<p><i>Ciocănitoare pestriță mare (Dendrocopos major)</i>. A fost identificată moartă lângă localitatea Stăuceni într-o zonă cu vegetație arboricolă. Pentru extragerea ADN-ului au fost îndepărtate falangele de la un picior. Septembrie, 2022.</p>
	<p><i>Sorex araneus (Chițcan comun)</i>. Specimen descoperit mort într-un câmp din suburbia Chișinăului. Octombrie, 2021.</p>
	<p><i>Nevăstuică (Mustela nivalis)</i>. A fost găsită moartă în regiunea sectorului de vile din localitatea Stăuceni. Probabil a fost ucisă de un animal domestic sau de un răpitor din fauna sălbatică. Caz rar pentru un astfel de animal agil. Au fost prelevate probe de piele și mușchi. Decembrie, 2022.</p>
	<p><i>Bursuc (Meles meles)</i>. Identificat lângă traseu la marginea localității Stăuceni, posibil accidentat de un automobil. Pentru izolarea ADN-ului au fost prelevate probe de piele. Iunie, 2022.</p>

Un sumar al probelor utilizate în cercetare și a metodelor molecular-biologice aplicate pentru realizarea obiectivelor propuse este prezentat în Tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Materialul biologic și metodele moleculare utilizate

Obiectiv	Metoda aplicată și locul în care au avut loc cercetările	Specii cercetate	Număr de probe	Tipul probelor
Testarea <i>in vitro</i> a acoperirii taxonomice a primerilor pentru metabarcodare	PCR convențional, electroforeza ADN-ului pe gel de agaroză, Institutul de Zoologie al USM, Moldova	26 specii de vertebrate terestre	26	Calamus, exuviu, falange, ficat, piele, tampon bucal și de piele, țesut muscular, țesut pulmonar, ureche, vârf de coadă
Genotiparea mistrețului în baza genei MC1R	RFLP-PCR, electroforeza ADN-ului pe gel de agaroză, Institutul de Zoologie al USM, Moldova	<i>Sus scrofa</i>	19	Țesut muscular, piele
Secvențierea genei <i>CYTB</i> la microtine	Secvențiere Sanger, Institutul de Ecologie și Evoluție a Universității din Berna, Elveția	<i>Microtus arvalis</i> , <i>Microtus levis</i>	13	Ficat, coadă

Colectarea mostrelor a fost efectuată cu respectarea tuturor măsurilor de securitate biologică și a procedurilor sus-menționate.

2.2. Instrumente și metode bioinformatic

2.2.1. Designul și testarea *in silico* a primerilor pentru metabarcodare

Pentru designul și testarea *in silico* a primerilor sistemelor de metabarcodare sunt necesare softurile *ecoPrimers* [104] și *ecoPCR* [39], iar pentru manipularea, formatarea și filtrarea secvențelor – programul *OBITools* [14]. Toate trei softuri sunt asociate sistemului de operare *Unix* [47] iar pentru a rula, *ecoPrimers* și *ecoPCR* necesită un set de secvențe de referință și o bază de date care să cuprindă grupul de specii studiate. Adăugător, în scopul determinării gradului de conservare a primerilor, simulării fragmentării cu enzime de restricție și vizualizării rezultatelor a fost utilizat limbajul de programare R [100].

Obținerea setului de secvențe și procesarea primară a datelor. Seturile de secvențe care reprezintă mitogenomuri *RefSeq* ale 127 specii de păsări, 38 specii de mamifere, 5 specii de amfibieni și 4 specii de reptile, precum și baza de date taxonomică au fost descărcate de pe platforma NCBI [110] în noiembrie 2021. În baza de date taxonomică fiecare taxon este asociat unei valori unice care reprezintă un număr întreg și se numește *taxid*. Un *taxid* identifică exact un anumit taxon, totuși, nefiind universal sau permanent. El este valabil pentru o anumită bază de date precum și pentru o anumită versiune a acestei baze de date (ex. *NCBI* - Release 246:

October 15 2021). De la o versiune la alta anumite *taxid-uri* pot fi adăugate, modificate sau șterse. Neluarea în calcul a acestor aspecte poate determina apariția erorilor în procesul de lucru. O bază de date taxonomică formatată pentru *OBITools* constă din cel puțin 3 fișiere: *Taxonomy.ndx*, *Taxonomy.rdx* și *Taxonomy.tdx* [130]. Seturile de secvențe sub formă de fișiere *GenBank* (.gb) [23] au fost convertite în format *ecoPCR*, format necesar pentru lansarea algoritmului *ecoPrimers*.

```
(OBI-env) vs@Victor:~$ obiconvert -t baza de date taxonomică --ecopcrdb-output=setul de secvențe în format ecoPCR --genbank --skip-on-error fișierul cu mitogenomurile de referință (*.gb)
Reading taxonomy dump file...
```

Designul in silico al primerilor. Pentru crearea primerilor se utilizează baza de date în format *ecoPCR* și se lansează programul *ecoPrimers*. Denumirea fișierului se specifică în dreptul argumentului *-d*.

```
(OBI-env) vs@Victor:/mnt/d/ecoPCR_Teza/ecoPrimers/src$ .ecoPrimers -d fișierul în format ecoPCR -e 2 -l 80 -L 150 -3 2 -c -q 0.5 -U > fișierul de ieșire
```

Parametrii obligatorii care trebuie indicați la acest pas sunt minimul și maximul lungimii metabarcodului (fără primeri). Acestea se specifică prin opțiunile *-l* (minim) și *-L* (maxim) în cazul de față 80 și 150. Pentru ceilalți parametri pot fi lăsate valorile de bază (*default values*) [160], dar pentru o ajustare eficientă a procesului de creare a primerilor acestea ar trebui modificate. În cercetarea de față a fost admisă o nepotrivire de maxim 2 nucleotide (argumentul *-e*), iar pentru a asigura o bună calitate a procesului de amplificare nu au fost admise nepotriviri pentru ultimele 2 nucleotide dinspre flancul 3' a fiecărui primer (opțiunea *-3*). Nepotrivirile în aceste regiuni ar putea împiedica alinierea primerilor și ar afecta puternic eficiența procesului de amplificare. Argumentul *-c* ia în considerare faptul că secvențele din baza de date sunt circulare (ADN mitocondrial), iar *-U* nu permite potrivirile multiple pentru o singură secvență. Alt parametru opțional ar fi specificarea valorii *taxid* a unității taxonomice pentru care se creează primerii (opțiunea *-r*). În cazul în care se dorește evitarea amplificării unei anumite unități taxonomice se definește *taxid*-ul acesteia în dreptul argumentului *-i*. Această opțiune poate fi utilă atunci când există riscul amplificării ADN-ului unor organisme *non-target* [130].

Analiza fișierului de ieșire al programului ecoPrimers. Prima parte a fișierului de ieșire *ecoPrimers* indică parametrii utilizați pentru designul primerilor, iar a doua parte include un

tabel cu perechile de primeri identificate pentru parametrii setați și caracteristicile sistemului de metabarcodare corespunzător. Este necesar ca valorile Bc și Bs (coloanele 16 și 18) să fie cât mai mari, iar lungimea maximă și medie a metabarcodurilor (coloanele 20 și 21) – cât mai mici. Atât timp cât parametrii setați întrunesc condițiile pentru un sistem de metabarcodare, *ecoPrimers* va identifica toți potențialii primeri asociați regiunilor conservate care flanchează o regiune variabilă. Astfel, programul va propune mai multe variante de metabarcoduri toate asociate aceluiași sistem de metabarcodare. Spre exemplu între perechile de primeri 5,6,7,8 și 9 din Fig. 2.2 există diferențe minore întrucât aceștia amplifică aceeași regiune variabilă.

5	AGGCGGATTTAGCAGTAA	CCTTGTTACGACTTACCT	53.9	26.0	51.6	32.6
6	AAGGCGGATTTAGCAGTA	CACTTACCTTGTTACGAC	53.9	26.0	51.0	32.8
7	AAGGCGGATTTAGCAGTA	TACACTTACCTTGTTACG	53.9	26.0	49.4	30.7
8	AAGGCGGATTTAGCAGTA	GTACACTTACCTTGTTAC	53.9	26.0	47.8	28.5
9	AGGCGGATTTAGCAGTAA	CACTTACCTTGTTACGAC	53.9	26.0	51.0	32.8

Fig. 2.2. Perechi de primeri care amplifică aceeași regiune variabilă

De aici vor rezulta și valori apropiate ale indicilor Bc/Bs și a lungimii metabarcodurilor. Uneori poate fi avantajos de a îmbunătăți perechile de primeri obținute cu scopul de a modifica temperatura de topire (T_m) a acestora sau de a avea 1-2 nucleotide de citozină/guanină la flancul 3' (acest lucru ar favoriza o legare mai eficientă a primerilor întrucât C și G formează 3 legături de hidrogen cu nucleotida complementară). Un alt aspect important pentru a asigura o bună specificitate a primerilor ar fi și evitarea timinei în poziția 3' [68, 130]. De asemenea optimizarea primerilor se poate face pentru a evita formarea structurilor secundare nedorite de tipul self/cross dimerilor sau a structurilor *hairpin* (Fig. 2.3).



Fig. 2.3. Structuri ce trebuie evitate în timpul designului primerilor [162]

Astfel, adăugarea sau excluderea uneia sau a câtorva nucleotide (3' sau 5') în anumite cazuri poate crește eficiența și specificitatea primerilor. Într-un final, pentru amplificarea ADN-ului celor 174 specii de vertebrate terestre din Moldova (cu mitogenom în *RefSeq*) a fost selectată o pereche de primeri care reprezintă un bun compromis în ce privește indicii Bc/Bs , lungimea metabarcodului, temperatura de topire și susceptibilitatea de a forma structuri secundare. Aceștia țintesc o regiune a genei mitocondriale ARNr 12S.

Odată creați, primerii au fost evaluați pentru rezoluția taxonomică care caracterizează noul sistem de metabarcodare la diferite nivele taxonomice. Acest lucru a fost efectuat cu utilizarea tehnicii PCR *in silico* și a softului *ecoPCR*. Lansarea *ecoPCR* se poate face asupra setului de secvențe utilizate pentru designul primerilor (*vert_db*) sau asupra unui set mai mare de secvențe având în calitate de parametri obligatori cele două secvențe de primeri nou create – *forward* și *reverse*.

```
(OBI-env) vs@Victor:/mnt/d/ecoPCR_Teza/174specii/db$ ecoPCR -d vert_db -e 2 -l 80 -L 150 -c AAGGCGGATTAGCAGT#A# CACTTACCTTGTTACGA#C# > fișierul ecoPCR de ieșire
```

Reading 2426082 taxa...

Evaluarea gradului de conservare a primerilor și a lungimii metabarcodurilor. Pentru a evalua gradul de conservare a primerilor specifici pentru un anumit grup taxonomic țintă pot fi construite reprezentări grafice numite logouri de secvențe (sequence logos). Acestea sunt formate din litere ce reprezintă abrevierile dezoxiribonucleotidelor, iar înălțimea literelor este un indiciu al gradului de conservare în diferite poziții (înălțimea literelor este direct proporțională cu frecvența nucleotidelor din pozițiile asociate [111]). Astfel, logourile secvențelor sunt reprezentări grafice care reflectă într-un mod eficient conservarea primerilor pentru un anumit grup taxonomic și pot fi realizate cu ajutorul limbajului de programare R și a librărilor *ROBITaxonomy*, *ROBITools* și *ROBIBarcodes* (Fig. 2.4).

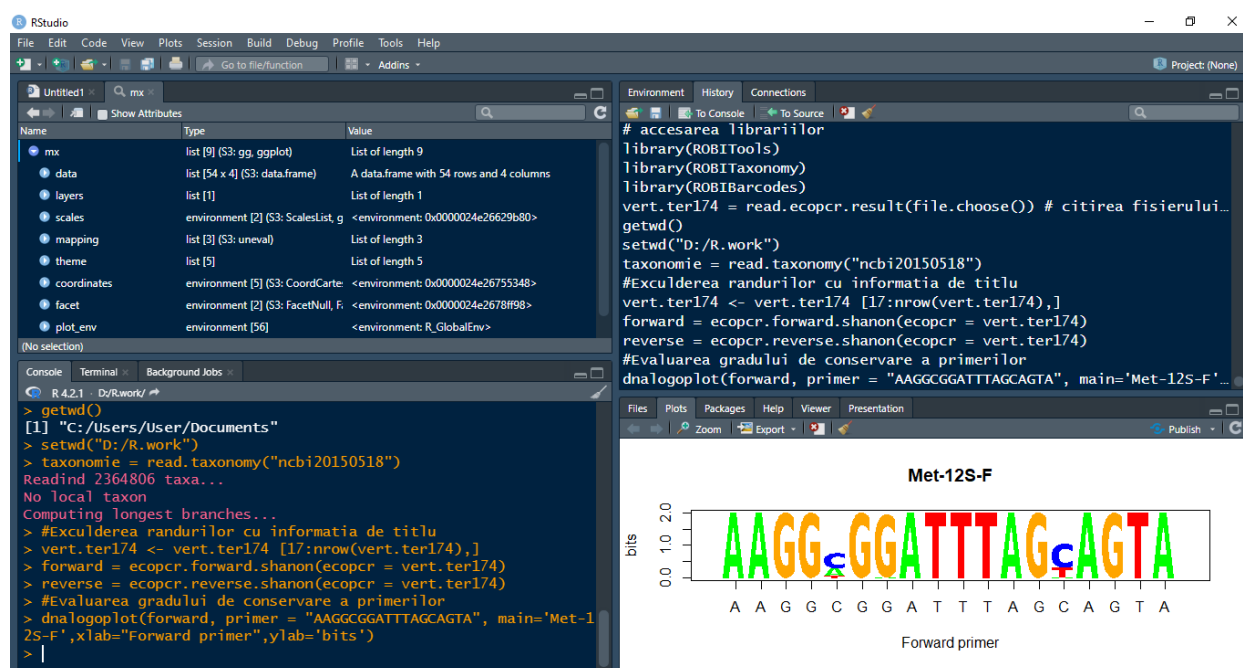


Fig. 2.4. Evaluarea gradului de conservare a primerilor (mediul Rstudio)

În Fig. 2.5 a și b sunt prezentate logourile primerilor *forward* și *reverse* a sistemului de metabarcodare *Met-12S* (sunt admise 2 nepotriviri per primer și 2 nucleotide fixe în poziția 3'). Astfel, se observă un nivel înalt de conservare a primerilor prezentați cu maxim 2 nepotriviri per primer și cu o lipsă totală a nepotrivirilor pentru majoritatea ampliconilor (speciilor, întrucât a fost selectat câte un singur amplicon per specie). Două nepotriviri reprezintă o valoare rezonabilă care poate asigura o amplificare calitativă a eADN-ului speciilor cercetate, iar mai mult de trei nepotriviri pentru oricare dintre primeri determină o amplificare inefficientă. În Fig. 2.5. c și d se observă distribuția numărului de nepotriviri cu setarea de 2 nepotriviri per primer și frecvența lungimii metabarcodurilor din baza de date de referință.

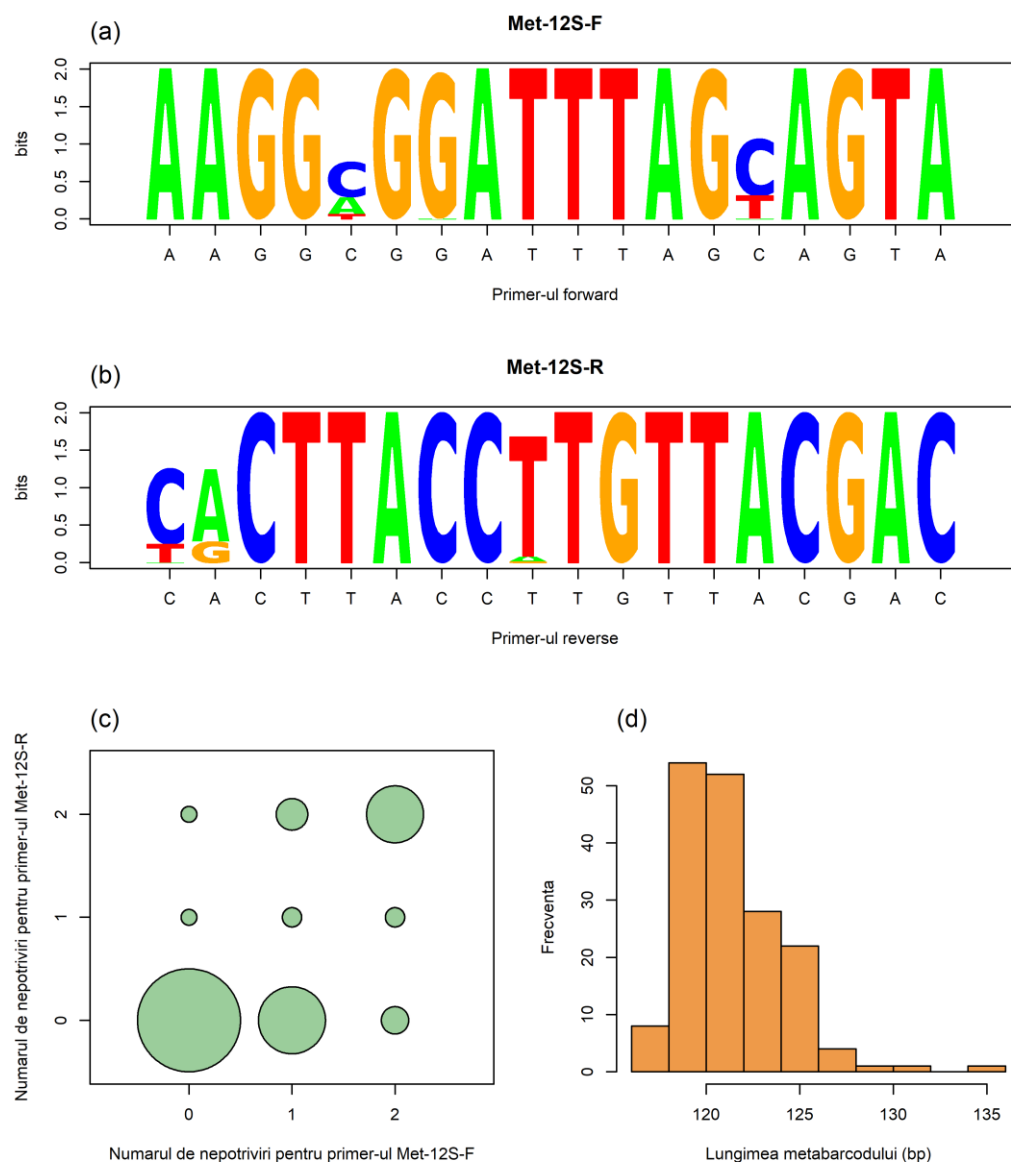


Fig. 2.5. Caracteristicile sistemului de metabarcodare *Met-12S*
a, b - logouri de secvențe obținute pentru perechea de primeri *Met-12S*;
c - numărul de nepotriviri per primer;
d - frecvența lungimii metabarcodului fără primeri

În ce privește histograma cu frecvența lungimii metabarcodurilor, aceasta a fost obținută în *RSudio* [167] cu utilizarea funcției *hist()* (Fig. 2.6).

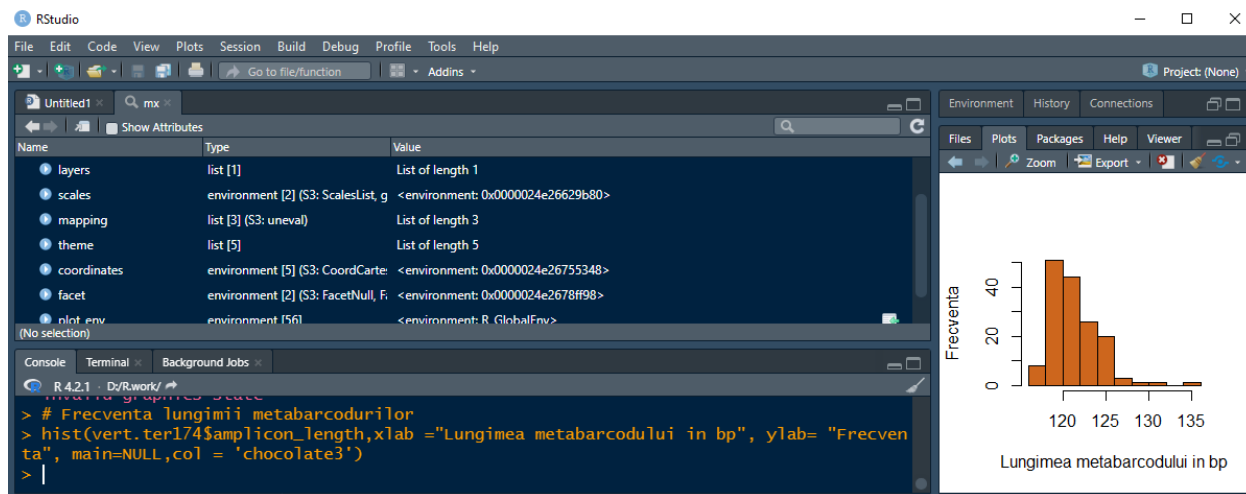


Fig. 2.6. Utilizarea *RStudio* pentru reprezentarea grafică a frecvenței lungimii metabarcodurilor [167]

Acoperirea taxonomică și indicele Bc. În scopul determinării proporției taxonilor din setul de date ce sunt amplificați corespunzător parametrilor specificați (indicele Bc) este necesară trecerea la sistemul de operare *Unix* și utilizarea algoritmului *ecotaxstat*.

```
(OBI-env) vs@Victor:/mnt/d/ecoPCR_Teza/174specii/db$ ecotaxstat -d vert_db -r 7742
fișierul ecoPCR
Reading binary taxonomy database...
```

Executarea comenzii se face cu utilizarea setului de secvențe (*vert_db*) și a fișierului *ecoPCR*. Un exemplu de rezultat pentru *ecotaxstat* este prezentat în Tabelul 2.3.

Tabelul 2.3. Rezultatul (cu anumite modificări) algoritmului *ecotaxstat* la diferite nivele taxonomice

rank	ecopcr	db	procent (Bc index * 100)
regn	1	1	100
încrengătură	1	1	100
clasă	2	2	100
ordin	9	9	100
familie	32	34	94.11
gen	89	94	94.68
specie	135	149	90.60

Valorile *db* reprezintă numărul total de unități taxonomice din baza de date la diferite nivele, iar *ecopcr* numărul de unități taxonomice amplificate. Ultima coloană prezintă valoarea acoperirii taxonomice (în procente) pentru fiecare categorie taxonomică.

Rezoluția taxonomică și indicele Bs. Pentru a determina rezoluția sistemului de metabarcodare la diferite nivele taxonomice poate fi utilizat algoritmul *ecotaxspecificity* al programului *OBITools*. Acesta consideră că două secvențe care au mai puțin de 5 diferențe aparțin aceluiași barcod. Pentru lansare se recomandă restricționarea setului de secvențe examinate astfel încât acestea să aibă maxim 2-3 nepotriviri pentru fiecare primer.

```
(OBI-env) vs@Victor:/mnt/d/ecoPCR_Teza/174specii/db$ ecotaxspecificity -e 2 -d vert_db
fișierul ecoPCR
Reading binary taxonomy database...
[INFO : Taxon alias file found]
Taxonomical tree read
ok
```

Rezultatul lansării *ecotaxspecificity* pentru diferite nivele taxonomice este prezentat în Tabelul 2.4.

Tabelul 2.4. Rezultatul (cu anumite modificări) algoritmului *ecotaxspecificity* la diferite nivele taxonomice

rank	taxon_ok	taxon_total	procent (Bs index * 100)
regn	1	1	100
încrengătură	1	1	100
clasă	2	2	100
ordin	9	9	100
familie	31	32	96.87
gen	86	89	96.62
specie	113	135	83.70

Taxon_total reprezintă numărul de taxoni care urmează a fi determinați, iar *Taxon_ok* – numărul de taxoni care pot fi identificați în baza secvențelor de metabarcod. Conform algoritmului *ecotaxspecificity*, sistemul de metabarcodare asociat datelor din tabel demonstrează o performanță destul de bună întrucât poate diferenția în peste 83% din taxonii inferiori precum specia și genul și în 100 % din ordine. În cadrul cercetărilor efectuate a fost evaluată în plan

comparativ acoperirea și rezoluția taxonomică a două perechi de primeri universali utilizați pentru identificarea vertebratelor: *Kitano-16S* [66] și *12S-V5* [107]. Perechea cu valori mai mari ale indicilor *Bc* și *Bs* a fost ulterior comparată cu primerii *Met-12S*.

Este necesar de a menționa că în bazele de date publice se găsesc multiple erori de secvențiere precum și alte ambiguități, iar pentru a obține o bună estimare a puterii de rezoluție și a acoperirii sistemului de metabarcodare se impune selectarea secvențelor cu care se lucrează (exemplu secvențe din baza de date *RefSeq*) [130].

2.2.2. Fragmentarea *RFLP in silico* a alelelor genei porcine *MC1R*

La specia *Sus scrofa*, gena *MC1R* are 963 perechi de baze iar alela de tip sălbatic (E+) se întâlnește în formă homozigotă la mistreții de linie pură. Alte alele diferă prin modificări în următoarele poziții [34, 65, 117]:

1. c.370G>A – rasele marele alb, Hampshire și Pietrain (EPD2);
2. c.283G>A, c.305T>C și c.363T>C – marele negru și Meishan (ED1);
3. c.491C>T și c.727G>A – rasa Duroc (e).

Secvența *MC1R* de tip sălbatic a fost extrasă de pe platforma NCBI [110] în format FASTA, iar alinierea alelelor a fost efectuată în limbajul R [100] cu utilizarea librăriilor *DECIPHER* [147] și *Biostrings* [92].

```
> # accesarea librăriilor
library(DECIPHER)
library(Biostrings)
mc1r=readDNASTringSet(file.choose()) # citirea fișierului FASTA cu secvențele de interes
mc1r
A DNASTringSet instance of length 4
width seq
..... dimensiunea și denumirea secvențelor .....
data(BLOSUM80) # se introduc datele cu referire la matricea de substituție
MC1R=AlignSeqs(mc1r,substitutionMatrix=BLOSUM80) # alinierea secvențelor
rezultat=BrowseSeqs(MC1R,highlight = 0)
```

Rezultatul alinierii se salvează sub formă de fișier *HTML*. În Fig. 2.7 este prezentată alinierea alelelor *MC1R* cu marcarea pozițiilor variabile.

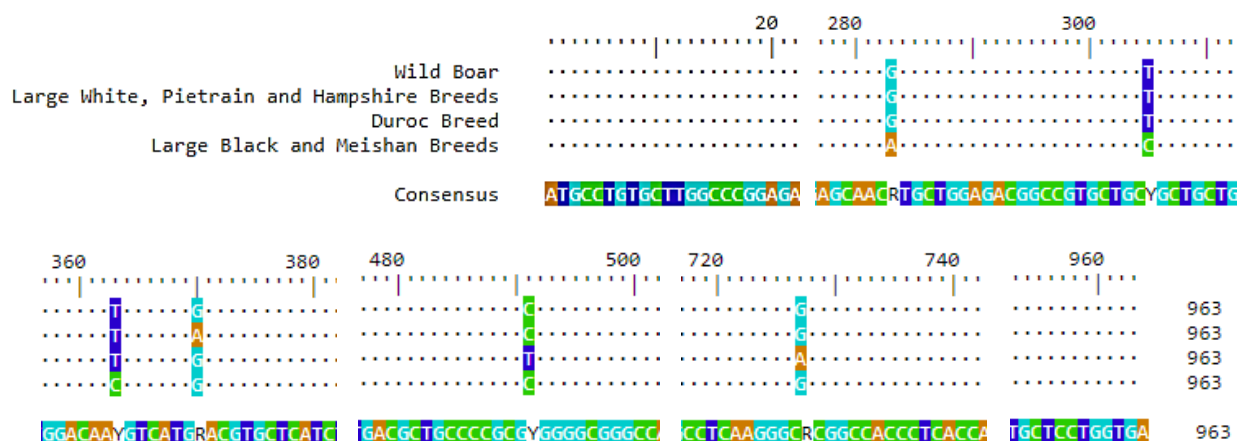


Fig. 2.7. Alinierea alelelor genei *MC1R*

Simularea digestiei cu enzime de restricție și vizualizarea fragmentelor au fost realizate în Rstudio cu utilizarea librăriei *seqRFLP* [98]. Acest pachet include diverse funcții pentru lucrul cu secvențele de ADN și în special pentru simularea tehnicii RFLP în baza enzimelor de restricție selectate și a secvențelor nucleotidice de interes.

2.2.3. Analiza filogenetică în baza secvențelor de ADN

Analiza filogenetică și construcția arborilor filogenetici în baza datelor moleculare necesită parcurgerea a mai multor etape precum: identificarea, obținerea și alinierea secvențelor; generarea distanțelor genetice; elaborarea filogeniei și estimarea calității arborelui filogenetic etc. În cercetările efectuate au fost utilizate secvențe de ADN obținute de la specimene de microtine din Republica Moldova, precum și secvențe identificate în GenBank [23, 110]. Analiza bioinformatică a fost efectuată cu aplicarea metodei NJ (Neighbor Joining) [108] și a modelului TN93 (Tamura și Nei, 1993) [131]. De asemenea a fost utilizat limbajul R [100] și următoarele librării: *ape* [93], *adegenet* [62], *msa* [13], *ips* [53], *ggtree* [148], *ggplot2* [144], *fields* [32]. În total au fost analizate 117 secvențe tip FASTA. Fluxul de lucru a fost adaptat în urma studierii mai multor surse [136, 139] și este prezentat mai jos.

> # accesarea librărilor

```
library(adegenet)
library(ape)
library(ggtree)
library(ggplot2)
library(ips)
library(msa)
library(fields)
```

```

> seq <- readDNAStringSet(file.choose()) # citirea fișierului FASTA cu secvențele de interes
al <- msa(seq)
bin <- as.DNABin(al) # format DNABin
dist <- dist.dna(bin, model = "TN93") # generarea distanțelor conform modelului TN93
df <- as.data.frame(as.matrix(dist)) # construirea matricii distanțelor
df <- df[, ncol(df):1]
png("Microtus_plot.png", units="in", width=10, height=10, res=800)
image.plot(x=1:86, y=1:86, df, col=rev(heat.colors(100)), xaxt="n", yaxt="n", xlab="",
ylab="", legend.width=.4, legend.shrink=1, legend.lab="Distanța genetică",
horizontal=TRUE)
axis(side = 3, at = 1:86, lab = rownames(dna), las = 3, cex.axis = 0.5)
axis(side = 2, at = 86:1, lab = rownames(dna), las = 2, cex.axis = 0.5)
dev.off()

# construirea arborelui filogenetic
arbore <- nj(bin)
gga <- ggtree (arbore, cex = 0.8, aes (color=branch.length)) + scale_color_continuous
(high='lightskyblue1', low='coral4') + geom_tiplab (align=TRUE, size=2)
+ geom_treescale
(y = - 5, color = "coral4", fontsize = 4)
plot <- msaplot (gga, bin, offset = 0.009, width=1, height = 0.5)

# estimarea calității filogeniei și calcularea indicelui cofenetic de corelație
x <- as.vector (dist)
y <- as.vector(as.dist(cophenetic(arbore)))
plot (x, y, xlab = "Distanța originală", ylab = "Distanța în arborele filogenetic", pch = 20,
col = transp ("black", 0.1), cex = 3)
abline(lm(y ~ x), col = "red")
cor(x, y)^2
[1] 0.9902641

```

În scopul estimării calității filogeniei se recomandă efectuarea testului de corelație cofenetică. Acesta se face de obicei între setul de date cu distanța genetică originală și cel cu distanța genetică generată din arbore (o matrice cofenetică). Cele două matrici sunt apoi examinate folosind testul *Mantel* [31]. Astfel, corelația dintre matricea cofenetică și matricea originală

estimează cât de bine reprezintă arborele filogenetic datele distanței genetice. Dacă corelația este mare, atunci arborele reprezintă bine datele originale, iar în cazul în care corelația este scăzută, atunci arborele nu reprezintă fidel distanța genetică și este necesară construcția altuia. În jurnalul *Systematic Zoology*, cercetătorul *James Rohlf* a sugerat că un coeficient cofenetic de corelație (CCC) de peste 0,9 estimează o potrivire foarte bună, unul între 0,8 și 0,9 – o potrivire bună, între 0,7 și 0,8 – potrivire slabă și pentru CCC < 0,7 – o calitate a filogeniei foarte slabă [106, 49].

2.2.4. Modelarea distribuției speciilor cu limbajul R

Pentru modelarea distribuției speciilor a fost utilizat algoritmul Bioclim și următoarele librării R [100]: *raster* [54], *rgdal* [12], *dismo* [55], *XML*[134] și *maps*[10]. De asemenea de pe platforma online *WorldClim* au fost descărcate datele cu referire la variabilele bioclimatice [41]. Acestea reprezintă valorile lunare pentru temperatura minimă, medie și maximă, precipitații, radiația solară, viteza vântului, presiunea vaporilor de apă și precipitațiile totale. În total au fost utilizate 19 variabile bioclimatice cifrate după cum urmează: BIO1, BIO2, BIO3, ..., BIO19. Mai jos este prezentat fluxul de lucru în mediul R [63]:

```
> # accesarea librărilor
library(raster)
library(rgdal)
library(dismo)
library(XML)
library(maps)

# setarea directorului de lucru
setwd (choose.dir ("C:/Users/User/Desktop/Bioclim"))

rasters <- list.files (pattern=".tif") # crearea unei liste de fișiere cu extensiunea ".tif"

# combinarea rasterelor într-un singur fișier
stackrasters <- raster (rasters[1])
for (x in rasters) {stackrasters <- stack (stackrasters,raster(x))}

# decuparea rasterelor în limita coordonatelor geografice a Republicii Moldova
dec <- extent (26.5,30.5,45,49)
md <- crop (stackrasters, dec)

# citirea fișierului cu distribuția cunoscută a speciei cercetate
distr <- read.delim(file.choose())
```



```

> # vizualizarea distribuției cunoscute
plot (distr$lon, distr$lat, xlim = c (26.5,30.5), ylim = c (45, 49), col = "red", pch = 19,
xlab = "Longitudine", ylab = "Latitudine")
map (add=TRUE)
coord <- data.frame (distr$lon, distr$lat)
# modelarea distribuției
bio.mod <- bioclim (md, coord)
harta <- predict (bio.mod, md)
plot (harta, xlab="Longitudine", ylab="Latitudine")
map (add=TRUE)

```

În calitate de date de intrare pentru modelarea distribuției șarpelui cu patru linii răsăritean și a viperei de stepă au fost utilizate coordonatele asociate prezenței cunoscute a acestor specii. Determinarea altitudinii (metri) în baza coordonatelor geografice a fost realizată cu utilizarea pachetului *raster* [54], iar coeficientul de corelație – calculat cu aplicarea funcției *biserial.cor()* din librăria *ltm* [105].

2.2.5. Limbajul R și mediul de dezvoltare RStudio

Limbajul R este o platformă gratuită de facilități software pentru manipularea, analiza și reprezentarea grafică a datelor [100] fiind considerat de mulți cercetători un instrument fundamental pentru cercetările biologice. Mediul de programare R a fost propus în 1993 de către Ross Ihaka și Robert Gentleman și a început să devină popular în domeniul biologiei datorită proiectului Bioconductor care furnizează diverse pachete de analiză a datelor biologice [44, 57]. Proiectul își propune să faciliteze cercetarea interdisciplinară, dezvoltarea rapidă a software-ului științific și colaborarea între utilizatori. În prezent R se află în primele 10 cele mai populare limbaje de programare din lume, iar comunitatea sa a produs zeci de mii de extensii și librării [45]. De asemenea acesta este unul dintre cele mai utilizate limbaje de programare în bioinformatică permițând manipularea unor seturi foarte mari de date. Seturile de date create și manipulate în R sunt cunoscute sub denumirea de *obiecte* și pot fi de tip *vector*, *matrix*, *factor*, *dataframe*, s.a., iar funcțiile de bază oferite permit vizualizarea conținutului, structurii și dimensiunii oricărui obiect. Colecția de obiecte existente în timpul procesului de lucru se numește *spațiu de lucru* (*workspace*) iar obiectele create în timpul unei sesiuni R pot fi stocate permanent într-un fișier pentru sesiuni viitoare. Scopul de bază al manipulării obiectelor este de a extrage informații utile și cunoștințe (*smart data*) din date brute și oportunistice (*raw data*).

Datele importate pot fi din mai multe surse și de mai multe tipuri: fișiere *TXT*, *CSV*, *VCF*, format *FASTA*, *ecoPCR* și alte formate de date specifice. În ceea ce privește fișierele de tip text, R poate citi direct fișiere clasice, delimitate de caractere într-un obiect de tip *matrix* sau *dataframe*. Una din filozofiile de bază de care se ghidează comunitatea R este de a oferi o funcție pentru fiecare metodă matematică existentă. Conceptual, funcționalitatea limbajului R poate fi împărțită în trei clase care pot rezuma rolul acestuia în bioinformatică și *data science* în general: interacțiunea datelor, analiza, vizualizarea rezultatelor [45]. În afară de consola de bază încorporată, utilizatorii R pot beneficia de diverse IDE-uri (Integrated Development Environments – Medii Integrate de Dezvoltare) în scopul de a analiza, testa și manipula mai eficient datele. Acestea sunt concepute pentru a ajuta și asista utilizatorul în privința scrierii liniilor de cod, vizualizării facile a variabilelor și librăriilor încărcate în memorie, accesării paginilor de ajutor etc. RStudio [167] este unul dintre cele mai populare medii de dezvoltare R fiind lansat ca IDE specific limbajului R însă ulterior evoluând spre un mediu bilingual axat pe R și Python. R menține în prezent și probabil va menține și pe viitor o nișă dominantă în domeniul bioinformaticii furnizând librării și funcții de mare ajutor pentru analiza datelor biologice [45].

2.3. Metode de biologie moleculară

În cadrul cercetărilor efectuate au fost utilizate mai multe instrumente și tehnici experimentale de laborator unele dintre care în premieră pentru țara noastră. Astfel, pentru prima dată în Republica Moldova a fost utilizat instrumentul multifuncțional *Bento Lab* [155] care permite extragerea, amplificarea și vizualizarea ADN-ului (Fig. 2.8).



Fig. 2.8. Dispozitivul *Bento Lab* din cadrul Centrului de Cercetare a Faunei Terestre, Institutul de Zoologie

Acest dispozitiv portabil combină cele mai importante echipamente necesare pentru realizarea unei reacții de PCR și include o microcentrifugă cu viteză variabilă între 3000 și 13500 rpm, un termociclor, casetă pentru electroforeză, bloc de alimentare încorporat și transiluminator.

Deoarece acidul dezoxiribonucleic este o moleculă fundamentală pentru toate sistemele biologice, cercetarea diversității speciilor necesită studii genetice și aplicarea metodelor de biologie moleculară. Dincolo de extragerea, amplificarea și vizualizarea ADN-ului, măsurarea și cuantificarea informației genetice în studiul biodiversității urmărește identificarea indivizilor, speciilor, populațiilor, unităților de conservare precum și detectarea zonelor hibride și a fluxului de gene străine în diferite comunități faunistice.

2.3.1. Extragerea ADN-ului genomic

În scopul purificării ADN-ului au fost utilizate două kituri: *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* [135] de la producătorul *Thermo Fisher Scientific* și *Dipstick DNA Extraction Kit* [158] de la *Bento Lab*. Primul protocol de extracție are la bază tehnologia de purificare pe coloane și permite obținerea unui ADN de calitate înaltă din diferite tipuri de țesuturi precum organe interne, mușchi, piele, coadă, sânge etc. Procedura de izolare decurge în mai multe etape prezentate în Fig. 2.9.

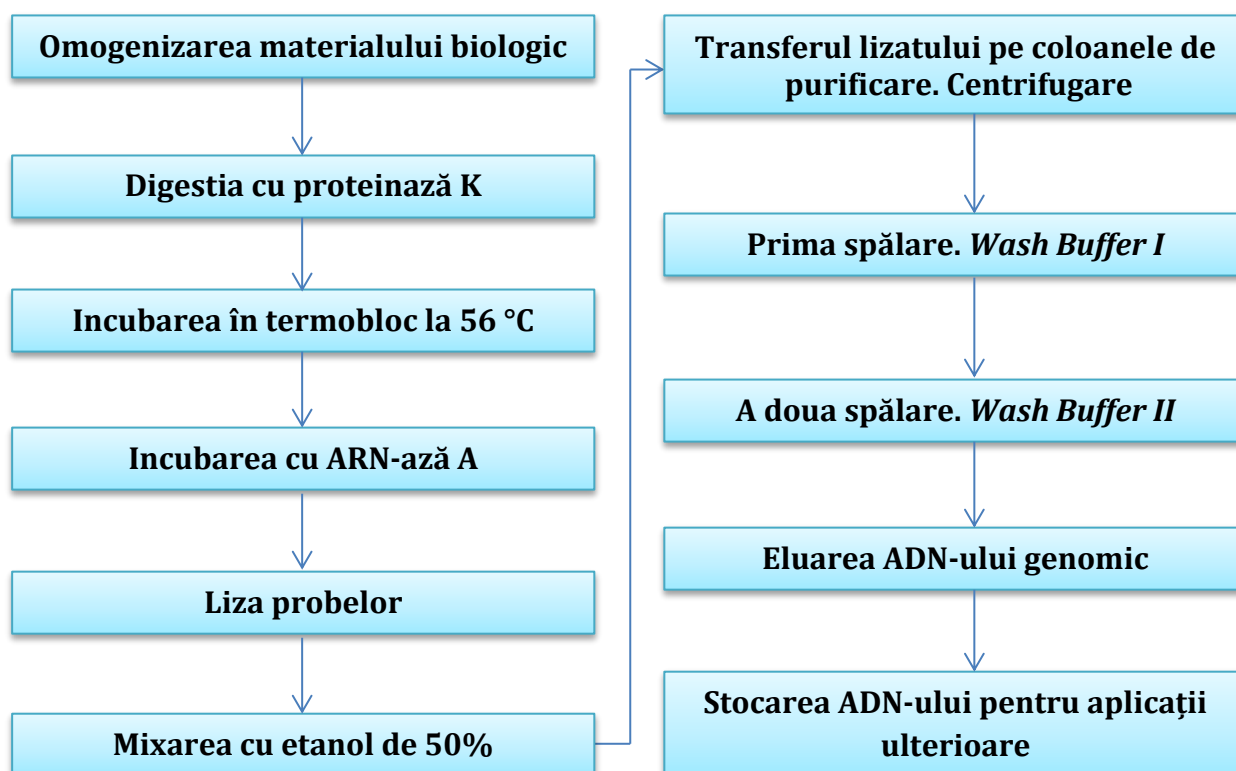


Fig. 2.9. Etapele de izolare a ADN-ului după protocolul *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*

În ce privește protocolul *Dipstick DNA Extraction Kit* punctul forte este extracția rapidă și costul redus. Având un cost redus această metodă poate fi uneori o alternativă metodei de extragere pe coloane. Totuși cantitatea totală de ADN extras este foarte mică și nu poate fi utilizată în aplicațiile care necesită concentrații mari de ADN. Protocolul *Dipstick* nu necesită echipamente precum termobloc, vortex sau centrifugă și a fost publicat în 2017 de către Zou și colab. [151], fiind observat faptul că hârtia din celuloză permite captarea rapidă a ADN-ului precum și spălarea acestuia de inhibitori. Etapele de realizare sunt prezentate în Fig. 2.10.

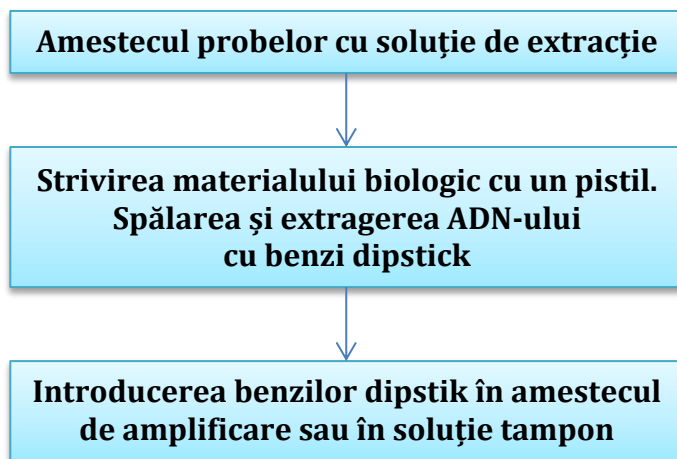


Fig. 2.10. Etapele de izolare a ADN-ului după protocolul *Dipstick DNA Extraction*

Pentru eficientizarea metodei *Dipstick* ar putea fi necesare proceduri suplimentare de liză celulară și de eliminare a impurităților care pot contribui semnificativ la obținerea unui ADN de calitate și la reducerea inhibitorilor de amplificare din amestec. De asemenea, una din principalele provocări asociate acestui protocol este cantitatea limitată de ADN extras dintr-o probă biologică.

2.3.2. Amplificarea ADN-ului

Reacția de polimerizare în lanț a fost realizată la compartimentul pentru PCR al instrumentului *Bento Lab* cu utilizarea următoarelor kit-uri: Thermo Scientific *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* și *AmpliTaq Gold 360 Master Mix*. Ambele sunt amestecuri gata de utilizare ce conțin ADN polimerază, soluție tampon, $MgCl_2$ și patru tipuri de dezoxiribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP și dTTP). Suplimentar, amestecul *DreamTaq* conține două tipuri de coloranți și un reagent de densitate care permit încărcarea directă a ampliconilor pe gel. Coloranții din amestec nu afectează performanța reacției de PCR și sunt compatibili cu operațiuni ulterioare precum secvențierea sau fragmentarea cu enzime de restricție. Cel de culoare albastră migrează în gelul de agaroză de 1% împreună cu fragmentele de ADN de 3-5 kb,

iar cel galben în tandem cu secvențele oligo scurte de 10 pb. Amestecul *AmpliTaq Gold* este destinat pentru un spectru larg de aplicații, se recomandă pentru protocoalele în care este utilizat ADN-ul degradat și poate amplifica fragmente de până la 5 kb. Comparativ, *DreamTaq*, generează ampliconi de până la 6 kb în cazul ADN-ului genomic și 20 kb în cazul ADN-ului viral. Se recomandă de a fi utilizat în tehnici de genotipare, clonare etc. Acest amestec a fost utilizat atât pentru testarea *in vitro* a acoperirii taxonomice a noilor primeri, cât și pentru genotiparea mistrețului. Atât în cazul testării primerilor, cât și pentru genotiparea *Sus scrofa* volumul de reacție a fost optimizat fiind redus la jumătate. Ambele amestecuri, *DreamTaq* și *AmpliTaq Gold*, au fost utilizate pentru evaluarea capacității de amplificare a ADN-ului extras după protocolul *Dipstick DNA Extraction*. Din primerii procurați sub formă de pulbere liofilizată au fost obținute soluții stoc de 100 μM, acestea fiind la rândul lor diluate la 10 μM pentru crearea soluțiilor de lucru. Programele de amplificare și componența volumului de reacție sunt prezentate în tabelele 2.5, 2.6 și 2.7.

Tabelul 2.5. Componența volumului de reacție pentru realizarea PCR-ului

Component	DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	AmpliTaq Gold 360 Master Mix
Master Mix	12,5 μL	12,5 μL
360 GC Enhancer	-	2,5 μL
Forward primer (conc. 10 μM)	0,5 μL	1 μL
Reverse primer (conc. 10 μM)	0,5 μL	1 μL
Probă ADN	3 μL	3 μL
H ₂ O nuclease-free	8,5 μL	5 μL
Volum total	25 μL	25 μL

Tabelul 2.6. Programul de amplificare pentru *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*

Etapa	Temperatura (°C)	Timpul	Numărul de cicluri
Denaturarea inițială	95	3 min	1
Denaturarea	95	30 s	35* 30** 40***
Alinierea primerilor	45* 61**	30 s	
Extensia	72	1 min	
Extensia finală	72	10 min	1

* - Realizarea PCR-ului cu primerii Met-12S

** - Realizarea PCR-ului pentru amplificarea genei MC1R la mistreț a fost realizată cu primerii:

AGTGCCTGGAGGTGTCCATTCCC (forward)

CGTAGATGAGGGGTCCACGATGGA (reverse) [34]

*** - Realizarea PCR-ului cu ADN izolat după protocolul Dipstick DNA Extraction

Tabelul 2.7. Programul de amplificare pentru *AmpliTaq Gold 360 Master Mix*

Etapa	Temperatura (°C)	Timpul	Numărul de cicluri
Denaturarea inițială	95	8 min	1
Denaturarea	95	30 s	40
Alinierea primerilor	61	30 s	
Extensia	72	1 min	
Extensia finală	72	7 min	1

Temperatura de aliniere a primerilor a fost calculată și ajustată în baza temperaturii de topire cu ajutorul calculatorului platformei *New England Biolabs* [86].

2.3.3. Electroforeza pe gel de agaroză și vizualizarea rezultatelor de amplificare

Electroforeza pe gel de agaroză este o formă de electroforeză utilizată pentru separarea fragmentelor de ADN în baza dimensiunii acestora. Astfel, la aplicarea câmpului electric moleculele de ADN având sarcină negativă migrează prin porii gelului de agaroză dinspre capătul încărcat negativ (catod) spre cel încărcat pozitiv (anod), fragmentele mai mici migrând mai repede. Etapele de realizare a electroforezei ADN-ului sunt:

1. Montarea cutiei pentru electroforeză și prepararea gelului

În cercetările efectuate a fost utilizat gel de agaroză de 1% la care după încălzire s-a adăugat 2 μ L (1 μ L la 10 mL) soluție agent de intercalare *GelGreen*. Acesta se leagă de moleculele de ADN și permite vizualizarea benzilor într-un câmp UV. În comparație cu *Etidium Bromidul*, *GelGreen-ul* are o masă moleculară mare care nu-i permite traversarea membranelor celulare. Acest lucru îi oferă avantajul de a fi non-toxic și non-mutagenic însă viteza de migrare prin gel este mai mică (viteza de migrare a ADN-ului va fi de asemenea influențată de concentrația agarozei și rezoluția gelului). Soluția de agaroză cu agent de intercalare se adaugă în cutia pentru electroforeză și se lasă (aprox. 30 min) la temperatura camerei până la întărirea gelului. După solidificare se adaugă buffer 0,5 x TBE astfel încât volumul soluției să acopere toată suprafața gelului.

2. Încărcarea probelor

În cazul utilizării ampliconilor obținuți cu mastermixul *DreamTaq Green PCR (2X)* aceștia se încarcă direct (aprox. 8-10 μL per probă) întrucât deja conțin colorant. Pentru ampliconii rezultați în urma utilizării *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* la 8 μL de probă se adaugă 2 μL colorant (6X DNA Loading Dye) după care probele se încarcă pe gel. În scopul evaluării dimensiunii ampliconilor într-un buzunăraș se adaugă 8-10 μL *GeneRuler 50bp DNA Ladder*. Acesta permite determinarea dimensiunii ADN-ului dublu catenar între 50 și 1000 pb.

3. Conectarea cutiei la sursa de alimentare și lansarea electroforezei

Separarea fragmentelor se efectuează la o tensiune de 50V timp de aprox. 40-50 min după care bufferul se varsă și se vizualizează benzile electroforetice (Fig. 2.11).

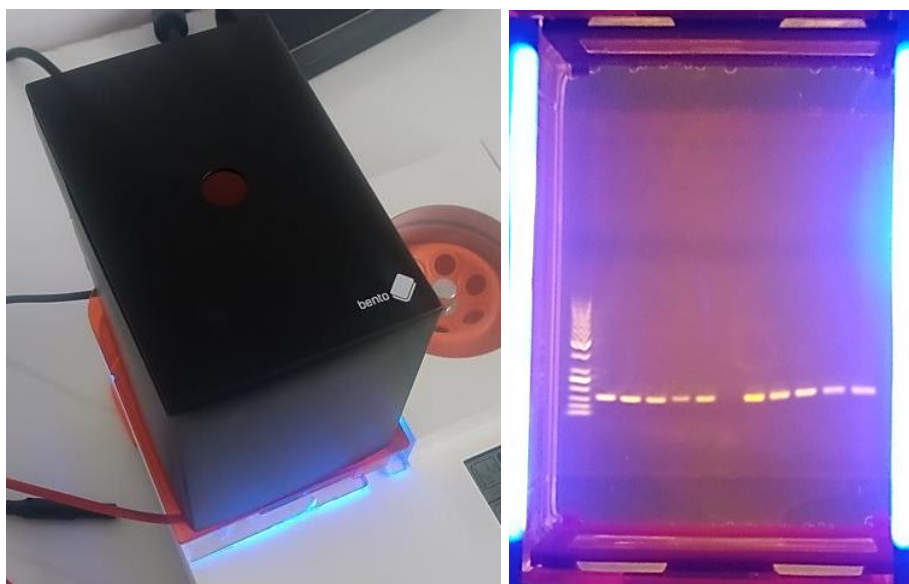


Fig. 2.11. Vizualizarea gelului la dispozitivul *Bento Lab*

Analiza rezultatului electroforezei s-a efectuat în câmp UV, la transiluminatorul *Bento Lab*, cu utilizarea unei hote speciale pentru obținerea imaginilor (Gel Imaging Hood). Aceasta poate fi utilizată inclusiv pentru fotografierea gelului cu telefonul mobil.

2.3.4. Fragmentarea ampliconilor cu enzime de restricție

Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (*Restriction fragment length polymorphism* - RFLP) este o tehnică moleculară care permite distingerea între secvențele de ADN omoloage (secvențe care derivă din aceeași genă ancestrală și au origine evolutivă comună) în scopul identificării indivizilor, populațiilor, speciilor, formelor hibride etc. Pentru digestia alelelor genei *MC1R* la specia *Sus scrofa*, cu enzimele de restricție BspHI și BstUI a fost aplicat următorul protocol de lucru:

1. *Formarea amestecului de reacție.*

- produs PCR – 10 μ L;
- apă *nuclease free* – 18 μ L;
- 10X Buffer O pentru BspHI și 10X Buffer R pentru BstUI – 2 μ L;
- enzimă BspHI (10 U/ μ L) sau BstUI (10 U/ μ L) – 1-2 μ L.

2. *Se amestecă încet, spin down pentru câteva secunde.*

3. *Se incubează la 37°C pentru 1-16 ore.*

Site-uri de digestie:

- BspHI
5'...T⁺CATGA... 3'
3'...AGTAC⁺T... 5'
- BstUI
5'...CG⁺CG... 3'
3'...GC⁺GC... 5'

BspHI poate fi inactivată termic prin incubare la 80°C timp de 20 min, iar BstUI – 65°C timp de 20 min.

2.3.5. Secvențierea ADN-ului

Secvențierea ADN-ului se referă la determinarea succesiunii nucleotidelor în molecula de ADN. Fiind una dintre cele mai mari realizări ale epocii moderne, secvențierea materialului genetic permite studierea organismelor vii prin descifrarea anumitor regiuni genomice sau a întregului genom ceea ce permite găsirea răspunsurilor la multe întrebări de ordin biologic. Secvențierea genei *CYTB* a probelor de microtine din Republica Moldova a fost realizată prin tehnologia Sanger la Institutul de Ecologie și Evoluție a Universității din Berna, Elveția.

Secvențierea Sanger. Denumită și *metoda de secvențiere prin terminarea lanțului (chain termination method)* Sanger este o metodă de secvențiere de *primă generație* propusă de către laureatul premiului Nobel, Frederick Sanger și colegii săi în anul 1977 [109]. Metoda decurge printr-un proces de încorporare selectivă a dideoxinucleotidelor (ddNTP) de către ADN polimerază în timpul replicării *in vitro* a ADN-ului, acestea inducând stoparea sintezei și terminarea lanțului nucleotidic. După denaturare, la ADN-ul monocatenar se aliniază primeri specifici, noua catenă fiind elongată cu utilizarea dNTP-urilor și a unei cantități mici de ddNTP pentru fiecare tip de nucleotid. Secvența se va extinde în baza încorporării dNTP-urilor până la atașarea unui ddNTP. Deoarece atât deoxi- cât și dideoxinucleotidele au șanse egale de a se atașa, sinteza secvențelor se va termina la diferite lungimi. Fiecare ddNTP include un marker fluorescent care este detectat în mod automat de către aparatul de citire a intensității de

fluorescență și transformat în semnal de culoare. Prin convenție adenina declanșează semnal fluorescent verde, timina – roșu, guanina – negru și citozina – albastru. Secvențierea Sanger reprezintă standardul de aur pentru identificarea SNV-urilor și inserțiilor/delețiilor mici fiind o metodă precisă și cost eficientă pentru citirea unor regiuni mici a genomului (ex. secvențierea unei singure gene). De asemenea, aceasta este pe larg utilizată în scopul validării rezultatelor NGS.

Secvențierea de generația următoare prin tehnologia Illumina. Secvențierea de generație următoare (Next Generation Sequencing - NGS) este o tehnologie de secvențiere masiv paralelă, care oferă un randament înalt și o viteză mare de analiză a secvențelor. NGS permite secvențierea a milioane de fragmente de ADN în paralel și este utilizată atât pentru determinarea succesiunii nucleotidelor în întregul genom, cât și în regiuni țintite. Această tehnologie a revoluționat științele biologice, permițând laboratoarelor din întreaga lume să realizeze o mare varietate de aplicații și să studieze aprofundat sistemele biologice la nivel molecular. Secvențierea de generație următoare Illumina utilizează amplificarea clonală și secvențierea prin chimie de sinteză (*sequencing by synthesis*, SBS) identificând simultan nucleotidele, în timp ce le încorporează într-un lanț de acid nucleic. Primul pas în realizarea secvențierii ține de prepararea bibliotecilor genomice și implică procesarea probelor astfel încât să fie compatibile cu secvențiatorul. Bibliotecile de secvențiere de obicei sunt create prin fragmentarea ADN-ului și adăugarea adaptorilor la ambele flancuri. În cazul tehnologiei de secvențiere *Illumina* adaptorii conțin secvențe suplimentare care permit legarea fragmentelor de ADN la celula de flux (*flow cell*). De asemenea în timpul procesului de legare a adaptorilor pot fi adăugate secvențe unice de indexare numite barcoduri care servesc pentru distingerea între probe. Următoarea etapă a procesului de secvențiere ține de încărcarea bibliotecilor în celula de flux și plasarea acestora în secvențiator. În timpul SBS nucleotidele modificate chimic (marcate fluorescent) se leagă de catena matriță de ADN conform principiului complementarității. După legarea fiecărei nucleotide se emite un semnal fluorescent care indică asupra tipului de nucleotidă care a fost adăugată. Analiza, vizualizarea și interpretarea datelor NGS se realizează cu softuri speciale (*Illumina Connected Analytics, MiSeq Reporter, Sequencing Analysis Viewer* etc.) [164].

Tehnologiile NGS au îmbunătățit considerabil capacitatea cercetătorilor de a secvenția barcoduri și metabarcoduri moleculare cu o acuratețe ridicată, cu toate acestea, una dintre limitările acestora este faptul că pot fi aplicate doar în laboratoare performante specializate. Dezvoltarea secvențiatorului MinION de către *Oxford Nanopore Technologies* a materializat rapid conceptul de secvențiere portabilă această tehnologie fiind numită și secvențiere de generația a treia (*Third Generation Sequencing*). Lansarea sa a deschis noi perspective atât în ce

privește dimensiunile compacte și portabilitatea cât și capacitatea de a genera date în timp real [80]. În ultimii ani secvențierea Nanopore a fost aplicată nu doar în laboratoare specializate ci și în cele mai diverse medii precum Stația Spațială Internațională [18] sau chiar largul mării [21]. Secvențierea portabilă în scopul identificării speciilor și cercetării biodiversității rămâne a fi limitată în aplicare întrucât este limitat numărul probelor care pot fi analizate simultan (de obicei mai puțin de 10 probe). Totuși, un studiu recent care a urmărit utilizarea dispozitivului portabil Bento Lab și a tehnologiei Nanopore pentru identificarea *in situ* a speciilor din fauna marină a demonstrat posibilitatea de a secvenția în largul mării 32 probe simultan cu o acuratețe de 99,9% [21]. Metabarcodarea ADN-ului cu secvențiatorul Minion (Tehnologia *Oxford Nanopore*) care are un preț de achiziție scăzut și este relativ simplu în utilizare ar putea permite obținerea datelor moleculare în timpi rapizi și fără nevoia unui laborator sofisticat de biologie moleculară [140].

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Pentru realizarea cercetărilor propuse au fost utilizate atât instrumente bioinformatic, tehnici de biologie moleculară cât și activități în teren.
2. Analiza și procesarea datelor a fost efectuată în terminalul Ubuntu și limbajul R (mediul RStudio). Fluxul de lucru și liniile de cod prezentate în capitol au fost optimizate și adaptate necesităților studiului. Limbajul R a fost utilizat pentru realizarea mai multor obiective ale lucrării precum evaluarea primerilor, digestia *in silico* a secvențelor de ADN, analiza filogenetică și modelarea distribuției speciilor.
3. În scopul testării *in vitro* a acoperirii taxonomice a primerilor pentru metabarcodare, digestiei cu enzime de restricție și secvențierii genei CYTB au fost prelevate diferite probe de material biologic.
4. Probele de țesut au fost prelevate de la animale moarte identificate sporadic sau vâdate (în cazul păsărilor și mamiferelor mari) și de la animale capturate în capcane (în cazul mamiferelor mici). Speciile de amfibieni și reptile au fost capturate manual. Tipurile de țesut prelevat au variat în funcție de specie și starea animalelor (de la piele și mușchi până la organe interne). După prelevare probele de țesut au servit în calitate de material pentru extragerea ADN-ului.
5. Probele prelevate au fost supuse analizelor de laborator care au constatat în extragerea ADN-ului, efectuarea reacției de PCR convențional, digestia cu enzime de restricție și electroforeza pe gel de agaroză. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost utilizat instrumentul mobil *Bento Lab* pentru extragerea, amplificarea și vizualizarea ADN-ului. Secvențierea a fost realizată prin tehnologia *Sanger* la Institutul de Ecologie și Evoluție a Universității din Berna.

3. DESIGNUL PRIMERILOR PENTRU METABARCODARE ȘI GENOTIPAREA CU ENZIME DE RESTRICȚIE

3.1. Abordări bioinformaticice

3.1.1. Determinarea tuturor speciilor de vertebrate terestre din Moldova care au mitogenom secvențiat inclus în baza de date globală RefSeq

Până în prezent au fost identificate 174 specii de vertebrate terestre care fac parte din fauna Republicii Moldova și au mitogenomul inclus în baza de date globală RefSeq (Anexa 1). Acestea cuprind: 127 specii de păsări, 38 specii de mamifere, 5 specii de amfibieni și 4 specii de reptile. Trebuie menționat că în studiu au fost incluse și unele specii de pasaj, cu prezență incertă și apariție accidentală/sporadică precum *Limosa lapponica*, *Stercorarius parasiticus* sau *Larus melanocephalus* [165]. Colecția care cuprinde 174 genomuri mitocondriale de referință a fost creată sub formă de fișier GenBank (*.gb), cu ajutorul platformei NCBI și în urma verificării individuale a tuturor speciilor de vertebrate terestre înregistrate în Republica Moldova (337 la număr). Dintre acestea 237 reprezintă specii de păsări (BirdLife International) [156], 72 – specii de mamifere (com. pers. V. Nistoreanu), 14 – specii de reptile și alte 14 – specii de amfibieni (com. pers. V. Țurcanu). În Tabelul 3.1 sunt prezentați taxonii care au genom mitocondrial secvențiat inclus în baza de date RefSeq, denumirea în limbile română și latină, precum și clasa din care aceștia fac parte.

**Tabelul 3.1. Speciile de vertebrate terestre din
Republica Moldova care au mitogenom în RefSeq**

N/o	Denumirea speciei în latină	Denumirea speciei în română	Clasa
1	<i>Accipiter gentilis</i>	Uliu porumbar	Aves
2	<i>Accipiter nisus</i>	Uliu păsărar	Aves
3	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Lăcar de stuf	Aves
4	<i>Aix galericulata</i>	Rață mandarin	Aves
5	<i>Alauda arvensis</i>	Ciocârlie de câmp	Aves
6	<i>Alcedo atthis</i>	Pescăruș albastru	Aves
7	<i>Anas acuta</i>	Rață sulițar	Aves
8	<i>Anas clypeata</i>	Rață lingurar	Aves
9	<i>Anas crecca</i>	Rață mică	Aves
10	<i>Anas platyrhynchos</i>	Rață mare	Aves
11	<i>Anguis fragilis</i>	Năpârcă	Lepidosauria
12	<i>Anser albifrons</i>	Gârliță mare	Aves
13	<i>Anser anser</i>	Gâscă de vară	Aves
14	<i>Apodemus agrarius</i>	Șoarece vârgat de câmp	Mammalia

15	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Șoarece de pădure	Mammalia
16	<i>Apus apus</i>	Drepnea neagră	Aves
17	<i>Aquila chrysaetos</i>	Acvilă de munte	Aves
18	<i>Aquila heliaca</i>	Acvilă imperială	Aves
19	<i>Ardea cinerea</i>	Stârc cenușiu	Aves
20	<i>Ardea purpurea</i>	Stârc roșu	Aves
21	<i>Arenaria interpres</i>	Pietruș	Aves
22	<i>Asio flammeus</i>	Ciuf de câmp	Aves
23	<i>Asio otus</i>	Ciuf de pădure	Aves
24	<i>Aythya ferina</i>	Rață cu cap castaniu	Aves
25	<i>Aythya fuligula</i>	Rață moțată	Aves
26	<i>Bombina bombina</i>	Izvoarăș cu abdomen roșu	Amphibia
27	<i>Bombina variegata</i>	Izvoarăș cu abdomen galben	Amphibia
28	<i>Bombycilla garrulus</i>	Mătăsar	Aves
29	<i>Botaurus stellaris</i>	Buhai de baltă	Aves
30	<i>Bubo bubo</i>	Bufniță mare	Aves
31	<i>Bubulcus ibis</i>	Stârc de cireadă	Aves
32	<i>Buteo buteo</i>	Șorecar comun	Aves
33	<i>Buteo lagopus</i>	Șorecar încălțat	Aves
34	<i>Calidris pugnax</i>	Bătăuș	Aves
35	<i>Canis lupus</i>	Lup cenușiu	Mammalia
36	<i>Capreolus capreolus</i>	Căprioară	Mammalia
37	<i>Carduelis spinus</i>	Scatiu	Aves
38	<i>Cecropis daurica</i>	Rândunică roșcată	Aves
39	<i>Cervus elaphus</i>	Cerb comun	Mammalia
40	<i>Cervus nippon</i>	Cerb pătat	Mammalia
41	<i>Charadrius alexandrinus</i>	Prundăraș de sărătură	Aves
42	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	Pescăruș râzător	Aves
43	<i>Ciconia ciconia</i>	Barză albă	Aves
44	<i>Ciconia nigra</i>	Barză neagră	Aves
45	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	Cireșar	Aves
46	<i>Columba livia</i>	Porumbel de stâncă	Aves
47	<i>Corvus corax</i>	Corb comun	Aves
48	<i>Corvus cornix</i>	Cioară grivă	Aves
49	<i>Corvus frugilegus</i>	Cioară de semănătură	Aves
50	<i>Cricetulus migratorius</i>	Grivan cenușiu	Mammalia
51	<i>Cricetus cricetus</i>	Hârciog	Mammalia
52	<i>Cygnus columbianus</i>	Lebădă mică	Aves
53	<i>Cygnus cygnus</i>	Lebădă de iarnă	Aves
54	<i>Cygnus olor</i>	Lebădă de vară	Aves

55	<i>Delichon urbicum</i>	Lăstun de casă	Aves
56	<i>Dendrocopos leucotos</i>	Ciocănitoare cu spate alb	Aves
57	<i>Dendrocopos major</i>	Ciocănitoare pestriță mare	Aves
58	<i>Egretta garzetta</i>	Egretă mică	Aves
59	<i>Eremophila alpestris</i>	Ciocârlie urecheată	Aves
60	<i>Falco cherrug</i>	Șoim dunărean	Aves
61	<i>Falco columbarius</i>	Șoim de iarnă	Aves
62	<i>Falco naumanni</i>	Vânturel mic	Aves
63	<i>Falco peregrinus</i>	Șoim călător	Aves
64	<i>Falco subbuteo</i>	Șoimul rândunelelor	Aves
65	<i>Falco tinnunculus</i>	Vânturel roșu	Aves
66	<i>Felis silvestris</i>	Pisică sălbatică	Mammalia
67	<i>Ficedula albicollis</i>	Muscar gulerat	Aves
68	<i>Fringilla coelebs</i>	Cinteză	Aves
69	<i>Fringilla montifringilla</i>	Cinteză de iarnă	Aves
70	<i>Fulica atra</i>	Lișiță	Aves
71	<i>Gallinula chloropus</i>	Găinușă de baltă	Aves
72	<i>Garrulus glandarius</i>	Gaiță	Aves
73	<i>Gavia stellata</i>	Cufundar mic	Aves
74	<i>Gelochelidon nilotica</i>	Pescăriță răzătoare	Aves
75	<i>Grus grus</i>	Cocor	Aves
76	<i>Haematopus ostralegus</i>	Scoicar	Aves
77	<i>Haliaeetus albicilla</i>	Codalb	Aves
78	<i>Himantopus himantopus</i>	Piciorong	Aves
79	<i>Hirundo rustica</i>	Rândunică	Aves
80	<i>Jynx torquilla</i>	Capîntortură	Aves
81	<i>Lacerta agilis</i>	Șopârlă cenușie	Lepidosauria
82	<i>Lacerta viridis</i>	Șopârlă verde	Lepidosauria
83	<i>Lepus europaeus</i>	Iepure de câmp	Mammalia
84	<i>Limosa lapponica</i>	Sitar de mal nordic	Aves
85	<i>Loxia curvirostra</i>	Forfecuță	Aves
86	<i>Mareca penelope</i>	Rață fluierătoare	Aves
87	<i>Mareca strepera</i>	Rață pestriță	Aves
88	<i>Martes foina</i>	Jder de piatră	Mammalia
89	<i>Martes martes</i>	Jder de pădure	Mammalia
90	<i>Meles meles</i>	Bursuc	Mammalia
91	<i>Mergus merganser</i>	Ferestraș mare	Aves
92	<i>Micromys minutus</i>	Șoarece pitic	Mammalia
93	<i>Microtus arvalis</i>	Șoarece de câmp	Mammalia
94	<i>Microtus levis</i>	Șoarece răsăritean de câmp	Mammalia

95	<i>Milvus migrans</i>	Gaie neagră	Aves
96	<i>Motacilla alba</i>	Codobatură albă	Aves
97	<i>Motacilla cinerea</i>	Codobatură de munte	Aves
98	<i>Mus musculus</i>	Șoarece de casă	Mammalia
99	<i>Muscardinus avellanarius</i>	Pârș de alun	Mammalia
100	<i>Mustela erminea</i>	Hermelină	Mammalia
101	<i>Mustela eversmannii</i>	Dihor de stepă	Mammalia
102	<i>Mustela lutreola</i>	Nurcă europeană	Mammalia
103	<i>Mustela nivalis</i>	Nevăstuică	Mammalia
104	<i>Mustela putorius</i>	Dihor de pădure	Mammalia
105	<i>Myotis bechsteinii</i>	Liliac cu urechi late	Mammalia
106	<i>Myotis myotis</i>	Liliac comun	Mammalia
107	<i>Neomys fodiens</i>	Chițcan de apă	Mammalia
108	<i>Netta rufina</i>	Rață cu ciuf	Aves
109	<i>Nucifraga caryocatactes</i>	Alunar	Aves
110	<i>Nyctalus noctula</i>	Liliac de amurg	Mammalia
111	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	Câine enot	Mammalia
112	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Stârc de noapte	Aves
113	<i>Oenanthe isabellina</i>	Pietrar răsăritean	Aves
114	<i>Oenanthe oenanthe</i>	Pietrar sur	Aves
115	<i>Ondatra zibethicus</i>	Bizam	Mammalia
116	<i>Oriolus oriolus</i>	Grangur	Aves
117	<i>Otis tarda</i>	Dropie	Aves
118	<i>Otus scops</i>	Ciuf pitic	Aves
119	<i>Pandion haliaetus</i>	Uligan pescar	Aves
120	<i>Panurus biarmicus</i>	Pițigoi de stof	Aves
121	<i>Parus major</i>	Pițigoi mare	Aves
122	<i>Passer domesticus</i>	Vrabie de casă	Aves
123	<i>Passer montanus</i>	Vrabie de câmp	Aves
124	<i>Pelobates fuscus</i>	Broască săpătoare brună	Amphibia
125	<i>Perdix perdix</i>	Potârniche	Aves
126	<i>Periparus ater</i>	Pițigoi de brădet	Aves
127	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Cormoran mare	Aves
128	<i>Phasianus colchicus</i>	Fazan	Aves
129	<i>Pica pica</i>	Coțofană	Aves
130	<i>Picus canus</i>	Ghionoaie sură	Aves
131	<i>Platalea leucorodia</i>	Lopătar	Aves
132	<i>Plecotus auritus</i>	Liliac urecheat brun	Mammalia
133	<i>Pluvialis squatarola</i>	Ploier argintiu	Aves
134	<i>Podiceps cristatus</i>	Corcodel mare	Aves

135	<i>Poecile palustris</i>	Pițigoi sur	Aves
136	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	Mugurar	Aves
137	<i>Rallus aquaticus</i>	Cristel de baltă	Aves
138	<i>Rana temporaria</i>	Broască roșie de munte	Amphibia
139	<i>Rattus norvegicus</i>	Șobolan cenușiu	Mammalia
140	<i>Recurvirostra avosetta</i>	Cioc întors	Aves
141	<i>Regulus regulus</i>	Aușel cu cap galben	Aves
142	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Liliac mare cu potcoavă	Mammalia
143	<i>Sciurus vulgaris</i>	Veveriță	Mammalia
144	<i>Scolopax rusticola</i>	Sitar de pădure	Aves
145	<i>Sitta europaea</i>	Țiclean	Aves
146	<i>Sorex araneus</i>	Chițcan comun	Mammalia
147	<i>Stercorarius parasiticus</i>	Lup de mare mic	Aves
148	<i>Sterna hirundo</i>	Chiră de baltă	Aves
149	<i>Sternula albifrons</i>	Chiră mică	Aves
150	<i>Streptopelia decaocto</i>	Guguștiuc	Aves
151	<i>Strix uralensis</i>	Huhurez mare	Aves
152	<i>Sturnus vulgaris</i>	Graur	Aves
153	<i>Sus scrofa</i>	Mistreț	Mammalia
154	<i>Sylvia atricapilla</i>	Silvie cu cap negru	Aves
155	<i>Sylvia borin</i>	Silvie de zăvoi	Aves
156	<i>Sylvia curruca</i>	Silvie mică	Aves
157	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Corcodel mic	Aves
158	<i>Tadorna ferruginea</i>	Califar roșu	Aves
159	<i>Tadorna tadorna</i>	Califar alb	Aves
160	<i>Talpa europaea</i>	Cârțiță	Mammalia
161	<i>Tringa erythropus</i>	Fluierar negru	Aves
162	<i>Tringa glareola</i>	Fluierar de mlaștină	Aves
163	<i>Tringa nebularia</i>	Fluierar cu picioare verzi	Aves
164	<i>Tringa ochropus</i>	Fluierar de zăvoi	Aves
165	<i>Tringa stagnatilis</i>	Fluierar de lac	Aves
166	<i>Tringa totanus</i>	Fluierar cu picioare roșii	Aves
167	<i>Triturus cristatus</i>	Triton crestă	Amphibia
168	<i>Turdus merula</i>	Mierlă	Aves
169	<i>Turdus philomelos</i>	Sturz cântător	Aves
170	<i>Upupa epops</i>	Pupăză	Aves
171	<i>Vanellus vanellus</i>	Nagâț	Aves
172	<i>Vespertilio murinus</i>	Liliac bicolor	Mammalia
173	<i>Vipera berus</i>	Viperă comună	Lepidosauria
174	<i>Vulpes vulpes</i>	Vulpe	Mammalia

Baza de date *RefSeq* [91] este o colecție de secvențe de referință organizate, verificate, nonredundante și de o calitate înaltă. Aceasta a fost creată și este actualizată continuu în baza datelor de arhivă transmise și schimbate între *GenBank* [23] din Statele Unite, biblioteca de date *EMBL* [64] din Regatul Unit și banca de date genetice a Japoniei [132]. Căutarea a fost realizată pentru fiecare specie în parte (337 căutări) utilizându-se următoarea formulă „*Denumirea speciei în latină[orgn] mitochondrion genome*”. Filtrarea rezultatelor căutării s-a efectuat pentru baza de date sursă (*RefSeq*) și compartimentul genetic de interes (*mitochondrion*). Colecția de mitogenomuri a fost salvată în format *GenBank (full)* și corespunde la 174 specii, 131 genuri, 62 familii, 26 ordine și 4 clase. Majoritatea speciilor sunt unicul reprezentant al genului lor, iar secvențele utilizate în procesul de lucru au fost adnotate, atribuindu-li-se un anumit *taxid*.

3.1.2. Compararea in silico a primerilor universali utilizați pentru identificarea vertebratelor

Primerii universali se utilizează pentru amplificarea ADN-ului provenit de la un grup de organisme mai mult sau mai puțin apropiate taxonomic și care are secvențe conservate pentru legarea acestor primeri. În scopul testării performanței de a fi utilizați în studii de metabarcodare a fost efectuată testarea *in silico* și compararea gradului de conservare, a 2 perechi de primeri universali utilizați pentru identificarea speciilor de vertebrate. Prima pereche (*Kitano-16S*) a fost propusă în anul 2006 de către *Takashi Kitano* și colaboratorii în calitate de primeri universali pentru identificarea speciilor de vertebrate, în baza secvențierii unei regiuni a ADN-ului mitocondrial care codifică ARN-ul ribozomal 16S [66]. Pentru validarea acestora *Kitano* a inclus în studiul său 9 specii de mamifere, 9 specii de vertebrate non-mamaliene (pești, amfibieni, reptile, păsări) și două specii de nevertebrate [66]. A doua pereche de primeri (*12S-V5*) țintesc regiunea mitocondrială 12S și au fost creați de *Tiayyba Riaz* și colaboratorii în anul 2011 [104]. Aceștia au fost validați cu utilizarea algoritmilor bioinformatici (*ecoPrimers*) și a abordărilor experimentale de laborator [104].

Amplificarea *in silico* a fost realizată pentru 191 mitogenomuri de vertebrate terestre, 174 dintre care sunt parte a faunei Republicii Moldova. Rezultatele au scos în evidență că prima pereche de primeri (*Kitano-16S*) reprezintă un grad de conservare mai mare comparativ cu cea de-a doua (*12S-V5*). În figurile 3.1 și 3.2 sunt prezentate logourile de secvențe (sequence logos) rezultate în urma analizei celor două perechi de primeri.

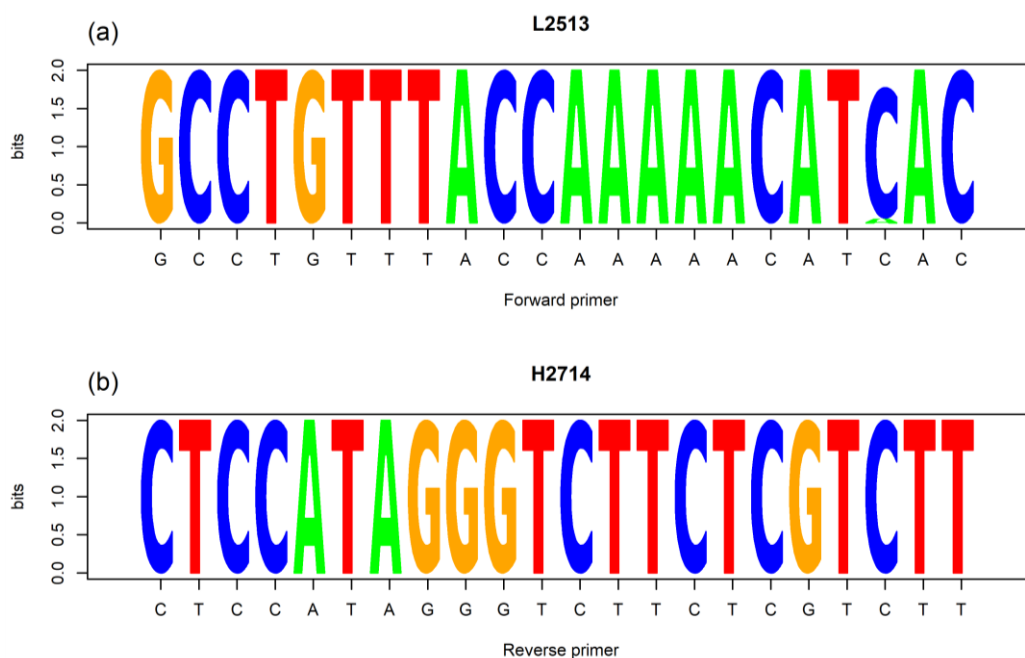


Fig. 3.1. Logourile de secvențe obținute pentru perechea de primeri *Kitano-16S*:
a – forward primer (L2513) și *b* – reverse primer (H2714)

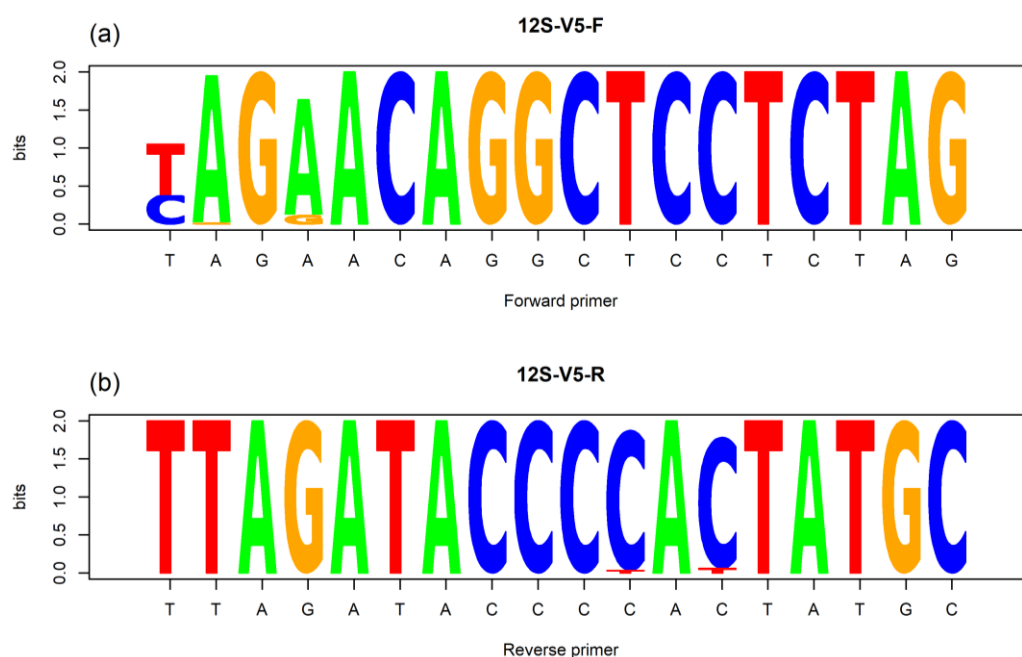


Fig. 3.2. Logourile de secvențe obținute pentru perechea de primeri *12S-V5*:
a – forward primer (12S-V5-F) și *b* – reverse primer (12S-V5-R)

În ce privește acoperirea taxonomică a primerilor studiați perechea *12S-V5* a demonstrat o performanță net superioară cu un indice Bc la nivel de specie de 0,9791 (97,91%) comparativ cu perechea *Kitano-16S* ce a avut un rezultat de 0,2199 (21,99%). Numărul de nepotriviri per primer este prezentat în Fig. 3.3.

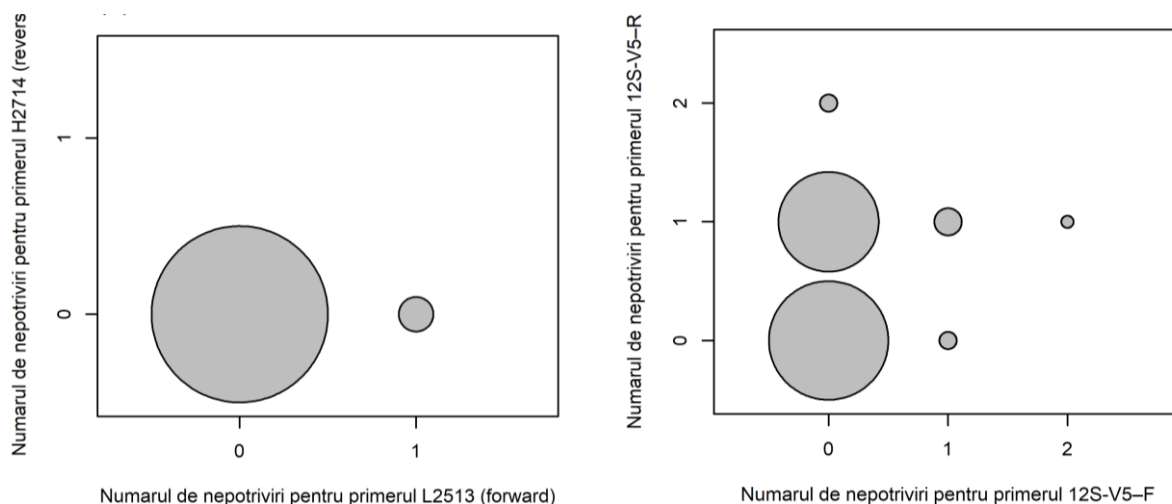


Fig. 3.3. Numărul de nepotriviri pentru perechile de primeri
Kitano-16S (stânga) și 12S-V5 (dreapta)

Din figură se observă că perechea *12S-V5* prezintă un număr maxim de 2 nepotriviri pentru ambii primeri în timp ce *Kitano-16S* un maximum de o singură nepotrivire pentru primerul *forward* cu o lipsă totală a nepotrivirilor pentru majoritatea ampliconilor. Lungimea metabarcodurilor (fără primeri) este între 96 și 106 bp pentru *12S-V5* și de aproximativ 200 bp pentru *Kitano-16S*. Astfel, conform algoritmilor bioinformatici utilizați, metabarcodarea speciilor de vertebrate terestre ar fi mai eficientă cu utilizarea primerilor universali *12S-V5*. Această pereche va fi utilizată în cercetările ulterioare pentru a fi comparată cu potențialii primeri nou creați.

3.1.3. Designul și testarea *in silico* a primerilor

Lansarea algoritmului *ecoPrimers* cu utilizarea celor 174 mitogenomuri *RefSeq* a permis identificarea mai multor perechi de primeri cu o dimensiune de 18 perechi de baze și o lungime a metabarcodurilor (fără primeri) între 80 și 150 bp. Au fost ignorate perechile cu o diferență de temperatură de topire între primerii *forward* și *reverse* mai mare de 3°C, selectându-se o pereche cu valoare dG optimă (-0,83 kcal/mol) și cu o temperatură de topire de 53,9 °C pentru primerul *forward* (AAGGCGGATTAGCAGTA) și 51,0 °C pentru *reverse* (CACTTACCTTGTTACGAC). În termeni simpli, dG, reprezintă cantitatea de energie necesară pentru a distruge complet o structură secundară a ADN-ului, iar temperatura de topire poate fi definită ca temperatura la care are loc denaturarea a jumătate din primerii prezenți în amestec. Cu cât valorile dG sunt mai mici (valori negative), cu atât este mai mare cantitatea de energie necesară pentru separarea catenelor de ADN în cazul formării structurilor secundare (ex. self/hetero dimeri sau structuri hairpin). Dacă într-o reacție de PCR primerii au valori dG foarte

joase, cantitatea de energie necesară pentru distrugerea dimerilor crește iar temperaturile prea ridicate pot perturba reacția. În general sunt acceptabile valorile mai mari de - 9 kcal/mol ideale fiind cele de peste -6 kcal/mol. În cazul de față, conform instrumentului de analiză *PrimerROC* [61], primerii obținuți formează heterodimeri slabi cu o valoare dG foarte bună și nefiind în stare să afecteze buna desfășurare a reacției de PCR (Fig. 3.4).

```
#####
#                                                                    #
#                               Primer Dimer Report                    #
#                                                                    #
#####
>>> - - - - - Forward vs Reverse: -0.83 kcal/mol <<<
- - - - -
5'> AAGGCGGATTTAGCAGTA >3'
      |  ||
      3'< CAGCATTGTTCCATTAC <5'
>>> - - - - - <<<

#####
#                                                                    #
#                               End of Report                        #
#                                                                    #
#####
```

Fig. 3.4. Valoarea dG a primerilor nou creați

Deoarece noua pereche de primeri amplifică o regiune a genei mitocondriale care codifică ARNr 12S și a fost creată pentru cercetări de metabarcodare, aceasta a fost denumită provizoriu *Met-12S* (respectiv *Met-12S-F* pentru primerul *forward* și *Met-12S-R* pentru *reverse*). În continuare, utilizând PCR-ul *in silico*, ne-am propus să determinăm acoperirea taxonomică (Bc), specificitatea (Bs) și gradul de conservare a noilor primeri în comparație cu primerii universali utilizați pentru metabarcodarea vertebratelor: *12S-V5-F* și *12S-V5-R*. Perechea *12S-V5* vizează regiunea mitocondrială ARNr 12S și prezintă o performanță bună în comparație cu alți primeri universali utilizați pentru identificarea speciilor de vertebrate [115]. Amplificarea *in silico* a secvențelor studiate cu primerii *12S-V5* și *Met-12S* a arătat că perechea lui Riaz [104] are un grad mai mare de conservare în comparație cu noii primeri. În figurile 3.5 și 3.6 sunt prezentate logourile de secvențe rezultate în urma analizei celor două perechi.

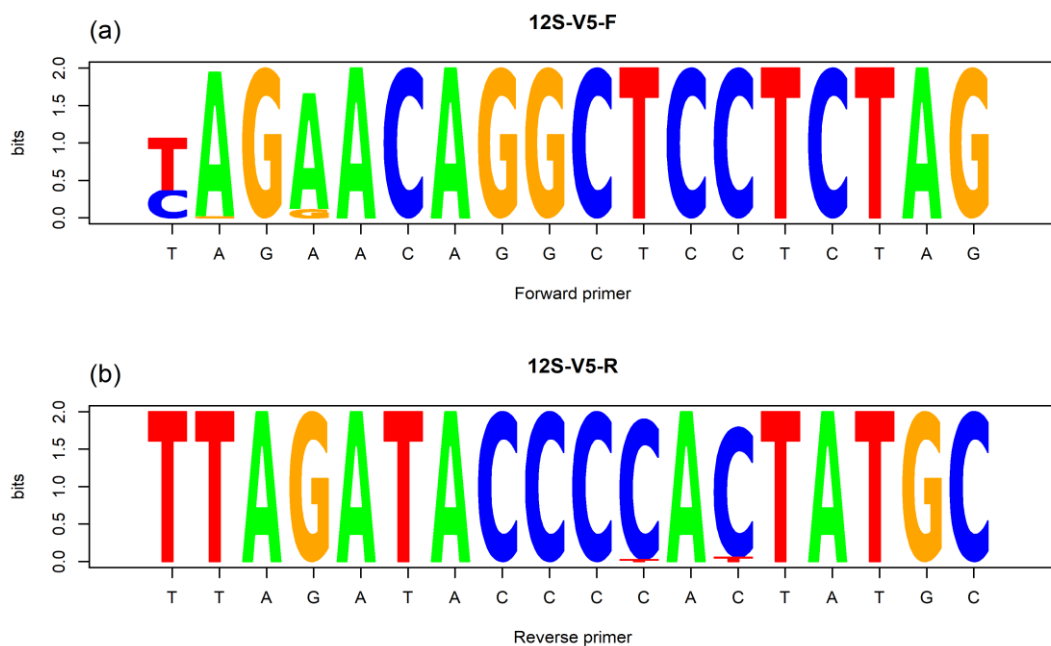


Fig. 3.5. Logourile de secvențe obținute pentru perechea 12S-V5:
a – forward (12S-V5-F) și b – reverse (12S-V5-R)

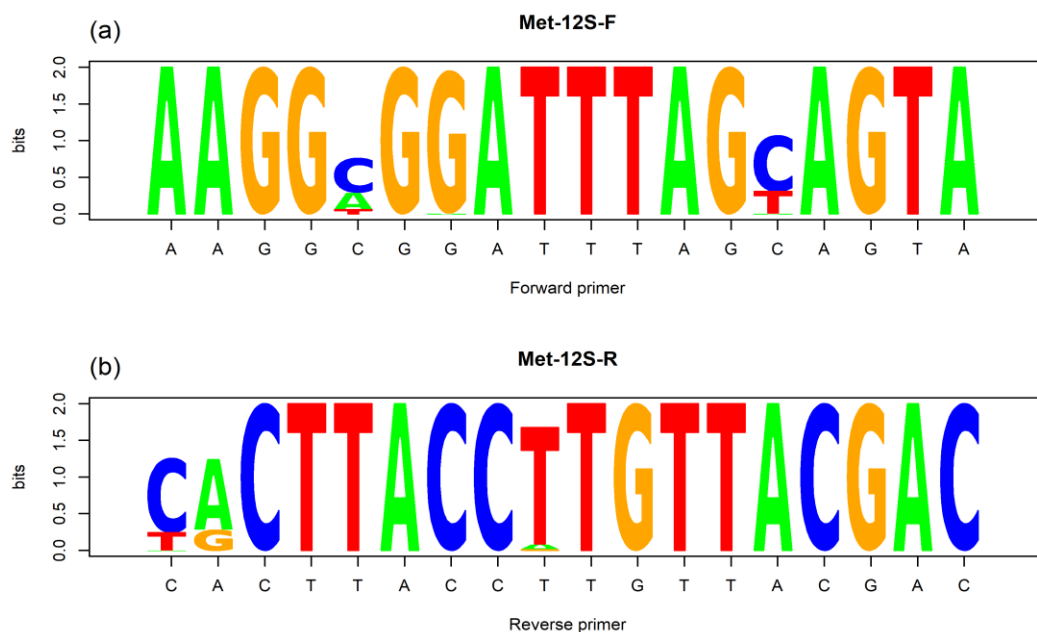


Fig. 3.6. Logourile de secvențe obținute pentru perechea Met-12S:
a – forward (Met-12S-F) și b – reverse (Met-12S-R)

Astfel, se poate observa că la capătul 3' toți primerii au un grad ridicat de conservare. Un grad mai scăzut poate fi observat în prima poziție a regiunii de flancare 5' a 12S-V5-F și, de asemenea, în pozițiile 1, 2 ale capătului 5' al Met-12S-R. Numărul de nepotriviri per primer este prezentat în figurile 3.7 și 3.8.

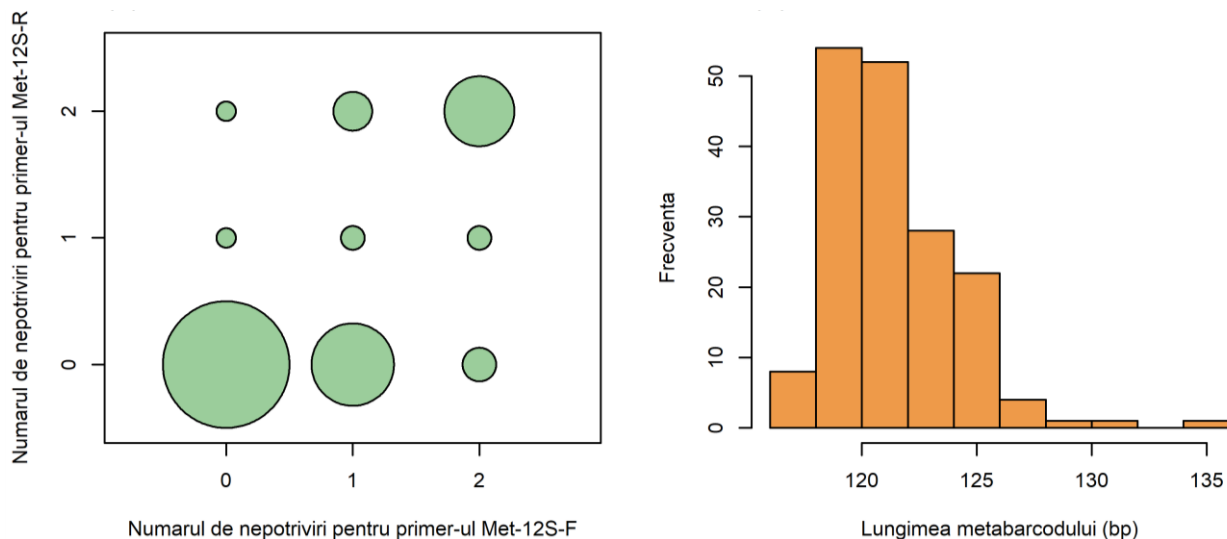


Fig. 3.7. Numărul de nepotriviri (stânga) și lungimea metabarcodurilor (dreapta) pentru perechea de primeri *Met-12S*

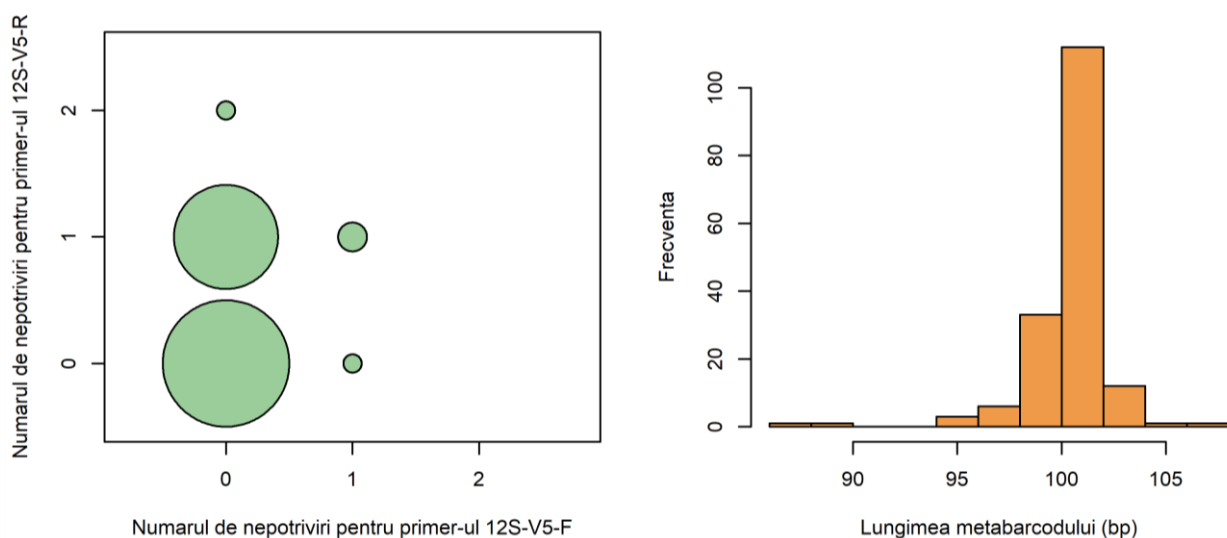


Fig. 3.8. Numărul de nepotriviri (stânga) și lungimea metabarcodurilor (dreapta) pentru perechea de primeri *12S-V5*

Se poate observa că noua pereche prezintă un număr maxim de 2 nepotriviri pentru ambii primeri în timp ce *12S-V5* - maximum o nepotrivire pentru primerul *forward* și două pentru cel *reverse*. Numărul de specii amplificate *in silico* poate fi crescut permițând mai mult de două nepotriviri per primer, totuși acest lucru poate duce la eșuarea reacției de PCR *in vitro*. Performanța primerilor a fost evaluată în baza a doi indici: *Bc* și *Bs*, care au demonstrat o performanță superioară pentru perechea *Met-12S*, aceasta având o acoperire taxonomică la nivel de specie de 98,28% ($0,9828 \times 100$) (Tabelul 3.2) și o specificitate de 86,55% ($0,8655 \times 100$) (Tabelul 3.3). Respectiv, pentru perechea *12S-V5* a rezultat un *Bc* de 0,9770 (97,70%) și *Bs* – 0,5353 (53,53%).

Tabelul 3.2. Acoperirea taxonomică pentru primerii *Met-12S*

rank	ecopcr	db	procent (Bc index * 100)
regn	1	1	100
încrengătură	1	1	100
clasă	4	4	100
ordin	26	26	100
familie	60	61	98.36
gen	129	130	99.23
specie	171	174	98.28

Tabelul 3.3. Rezoluția taxonomică pentru primerii *Met-12S*

rank	taxon_ok	taxon_total	procent (Bs index * 100)
regn	1	1	100
încrengătură	1	1	100
clasă	4	4	100
ordin	26	26	100
familie	58	60	96.67
gen	125	129	96.9
specie	148	171	86.55

Astfel, conform algoritmului bioinformatic, noua pereche de primeri ce corespunde sistemului de metabarcodare *Met-12S* (Anexa 2) prezintă acoperire taxonomică pentru 171 de specii din 174 și identifică corect 148 specii din 171, în timp ce primerii universali *12S-V5* amplifică 170 din 174 și identifică 91 din 170. În Tabelul 3.4 sunt prezentate speciile pentru care primerii studiați nu au acoperire taxonomică.

Tabelul 3.4. Specii care nu pot fi amplificate *in silico*

12S-V5	Met-12S
<i>Grus grus</i> <i>Haliaeetus albicilla</i> <i>Lacerta viridis</i> <i>Vipera berus</i>	<i>Ardea cinerea</i> <i>Lacerta agilis</i> <i>Sciurus vulgaris</i>

În scopul evaluării în privința amplificării non-specifice a nevertebratelor au fost descărcate și amplificate *in silico* genomurile mitocondriale *RefSeq* a 4618 specii de nevertebrate. Astfel, amplificarea nespecifică a reprezentat 0,26 % ceea ce constituie 12 specii din 4618 (4 specii de echinodermate și 8 specii de artropode). Toate cele 12 specii au dimensiunea metabarcodului (fără primeri) între 81 și 84 pb și nu fac parte din fauna Republicii Moldova.

Pentru o performanță bună a sistemului de metabarcodare este necesar ca valorile Bc și Bs să fie cât mai mari, iar pentru a putea analiza ADN cu un grad mare de degradare este recomandat ca lungimea maximă și medie a metabarcodurilor să fie cât mai mică. Deoarece ADN-ul de mediu de obicei este foarte degradat, se recomandă ca metabarcodurile să aibă o lungime mai mică de 150-170 pb. Acest lucru este important în special atunci când pentru monitorizarea diversității speciilor se utilizează probe de materii fecale sau sol. Cum poate fi observat în Fig. 3.7 lungimea noilor metabarcoduri (fără primeri) variază de la 117 la 136 pb.

Este necesar de a menționa că în bazele de date publice pot fi întâlnite multiple erori de secvențiere precum și alte ambiguități, iar pentru a obține o bună estimare a acoperirii taxonomice și a puterii de rezoluție a primerilor este necesară o selecție atentă a secvențelor de referință (ex: secvențe din baza de date *RefSeq*). Rezultatele prezentate mai sus au fost obținute în baza cercetărilor *in silico* folosind secvențe de înaltă calitate disponibile în baza de date *RefSeq*. De asemenea, a fost creată o bază de date de referință (Anexa 2) reprezentativă pentru aceste secvențe care ar putea fi utilizată în studiile viitoare de metabarcodare. Aceasta conține câte o secvență per specie, astfel fiind reduse aspectele legate de suprareprezentare.

3.1.4. Fragmentarea RFLP *in silico* a alelelor genei porcine *MC1R*

Simularea bioinformatică a digestiei RFLP presupune utilizarea algoritmilor specializați pentru anticiparea și analiza modelelor de fragmentare ale enzimelor de restricție asupra secvențelor de ADN. Acest lucru oferă avantajul de a planifica experimentele și de a efectua analize virtuale înainte de a lucra cu mostre reale de ADN în felul acesta economisind timp și resurse. În cadrul cercetărilor efectuate, pentru realizarea analizei RFLP *in silico*, a fost utilizat un algoritm bioinformatic care prezice fragmentarea alelelor genei *MC1R* porcine simulând digestia secvențelor de interes cu peste 700 enzime de restricție [98]. Astfel, au fost identificate mai multe enzime care au potențialul de a fi utilizate pentru genotiparea specimenilor de mistreț și pentru diferențierea între hibrizi și liniile pure. În Fig. 3.9 este prezentată electroforegrama obținută după simularea digestiei secvențelor alelice studiate cu următoarele enzime de restricție: AjiI, BspHI, BstUI, NspI, FnuDII, MhII, PcsI și TspDTI.

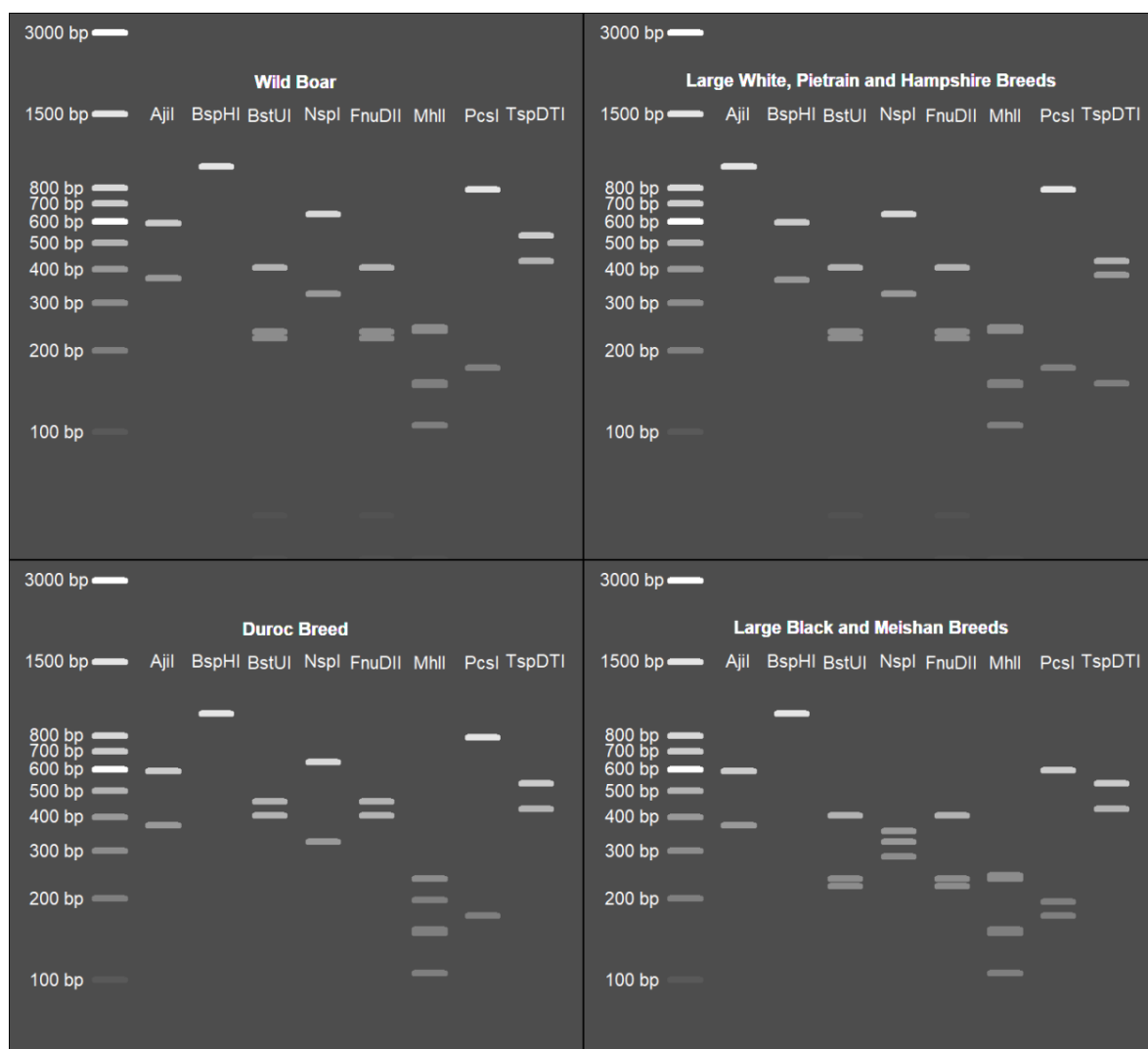


Fig. 3.9. Electroforegrama obținută în urma simulării digestiei secvențelor alelice MC1R
 Enzime de restricție utilizate – *AjiI*, *BspHI*, *BstUI*, *NspI*, *FnuDII*, *MhlI*, *PcsI*, *TspDTI*

Enzimele prezentate în figura de mai sus pot discrimina între secvențe după cum urmează:

1. *AjiI*, *BspHI* și *TspDTI* – digeră doar alela *EPD2*;
2. *BstUI*, *FnuDII* și *MhlI* – digeră toate alelele testate (paternul electroforetic variază în funcție de genotip);
3. *NspI* și *PcsI* – disting între *ED1* și alte alele;

Teoretic, este de așteptat ca în Republica Moldova alela predominantă în fermele de porci să fie *EPD2*, prin urmare enzimele din prima categorie care ar putea discrimina între această alelă și *E+* de tip sălbatic prezintă un interes sporit. Enzima *AjiI* (*BmgBI*) taie regiunile CAC[^]GTC, în timp ce *BspHI* digeră situsurile T[^]CATGA, ambele enzime având un optim de temperatură de 37°C. Deși *TspDTI* discriminează prin producerea a două benzi electroforetice la alela *E+* și trei la *EPD2*, are un cost mai mare, de aceea primele două candidate par a fi mai potrivite în aspect practic. Liniile pure ale raselor marele negru, Meishan și Duroc sunt probabil

mai puțin frecvente în fermele din Moldova însă hibrizii dintre rase ar putea fi cele mai răspândite genotipuri. Enzimele din categoriile 2 și 3 prezintă interes pentru identificarea indivizilor purtători ai alelelor *EDI* și *e*. Alte enzime de restricție care pot fi utile pentru identificarea variantelor MC1R sunt BdaI, BstNSI, BtrI, CciI, FatI, PagI, RcaI, SduI, XceI. Selectarea enzimelor pentru testarea ulterioară *in vitro* a fost realizată în baza analizei costurilor acestora și a studierii protocoalelor experimentale. S-a constatat că combinația dintre BspHI și BstUI a mai fost studiată în scopuri de genotipare a speciei *Sus scrofa* [34] și ambele enzime au un cost redus. Astfel, acestea au fost selectate pentru testarea ulterioară *in vitro* în laboratorul de biologie moleculară.

Rezultate bune pentru diferențierea între hibrizi și liniile pure de mistreț ar putea fi obținute numai prin selecția corectă a enzimelor de restricție și prin combinarea lor. Acest lucru ar contribui la obținerea unor rezultate corecte și ar permite identificarea indivizilor heterozigoți. Studiile de genotipare a mistreților din Republica Moldova ar permite determinarea gradului de hibridizare în cadrul populațiilor și ar contribui la elaborarea măsurilor adecvate de conservare. Se recomandă testarea enzimelor menționate mai sus în laboratorul de biologie moleculară și evaluarea *in vitro* a potențialului acestora de a fi utilizate în studiile de genotipare a speciei *Sus scrofa*.

3.2. Testarea și analiza în laborator

3.2.1. Izolarea ADN-ului

În scopul testării *in vitro* a acoperirii taxonomice pentru primerii *Met-12S* (evaluarea în laborator a capacității acestora de a amplifica regiunile țintă a speciilor de vertebrate studiate) a fost izolat ADN-ul a 26 specii de vertebrate terestre din Moldova dintre care 19 fac parte din lista de specii în baza cărora a fost creat noul sistem de metabarcodare (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Lista speciilor de la care a fost izolat ADN-ul genomic

Nr.	Specia	Tipul de material biologic utilizat pentru izolarea ADN-ului	Concentrația ADN-ului izolat (ng/μl)	A 260/280
1	<i>Apodemus agrarius</i>	Vârf de coadă	38,8	1,73
2	<i>Apodemus flavicollis</i>	Ficat	90,3	1,91
3	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Ficat	67,1	1,75
4	<i>Bufo bufo</i>	Piele	32,0	1,81
5	<i>Buteo buteo</i>	Piele	62,5	1,79
6	<i>Dendrocopos major</i>	Falange	74,3	1,94
7	<i>Elaphe sauromates</i>	Vârf de coadă	59,5	1,86
8	<i>Erithacus rubecula</i>	Falange, calamus	38,2	1,78
9	<i>Lacerta agilis</i>	Vârf de coadă	75,6	1,70

10	<i>Lepus europaeus</i>	Mușchi	40,9	1,85
11	<i>Martes martes</i>	Mușchi	26,7	1,76
12	<i>Meles meles</i>	Piele	195,9	2,01
13	<i>Microtus arvalis</i>	Țesut pulmonar	87,1	1,88
14	<i>Microtus levis</i>	Vârf de coadă	57,4	1,80
15	<i>Mus musculus</i>	Vârf de coadă	83,9	1,73
16	<i>Muscardinus avellanarius</i>	Mușchi	32,8	1,89
17	<i>Nyctalus noctula</i>	Ureche	71,0	1,92
18	<i>Passer domesticus</i>	Falange	54,8	1,87
19	<i>Plecotus auritus</i>	Ureche	60,1	1,84
20	<i>Rana ridibunda</i>	Tampon bucal și de piele	16,5	1,94
21	<i>Rana temporaria</i>	Tampon bucal și de piele	12,8	1,77
22	<i>Sorex araneus</i>	Vârf de coadă	62,0	1,92
23	<i>Spalax leucodon</i>	Piele	18,1	1,71
24	<i>Sus scrofa</i>	Mușchi	89,0	1,73
25	<i>Talpa europaea</i>	Vârf de coadă	43,3	1,89
26	<i>Vipera berus</i>	Fragmente de exuviu	22,6	1,65

După extragere, concentrațiile ADN-ului, precum și puritatea acestuia (raportul dintre absorbanta la 260 și 280 nm) au fost determinate cu utilizarea spectrofotometrului NanoDrop Lite, (Thermo Fisher Scientific). Histogramele cu distribuția și frecvența datelor sunt prezentate în Fig. 3.10.

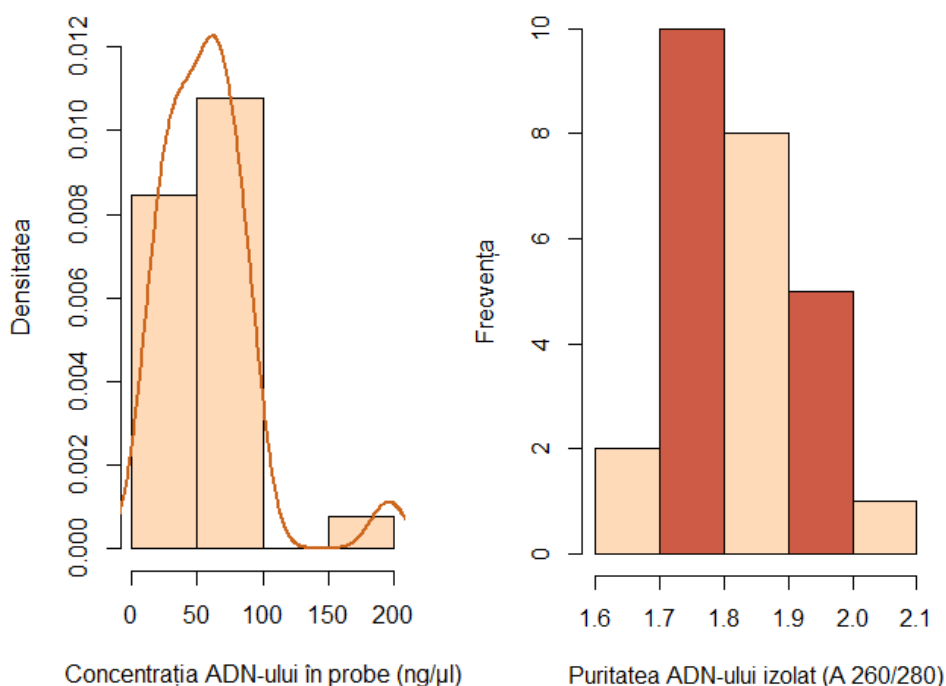


Fig. 3.10. Distribuția datelor cu referire la concentrație (stânga) și frecvența purității ADN-ului izolat (dreapta) de la cele 26 specii de vertebrate terestre

Conform testului statistic Shapiro-Wilk distribuția datelor este normală în cazul valorilor cu privire la puritate și cu un caracter non-gaussian ($p\text{-value} < 0,05$) în cazul valorilor concentrației. Se observă că cea mai mare densitate de probabilitate a valorilor concentrației ADN-ului se află în intervalul 50 și 100 ng/μl (cu o medie de 58,2 și mediana – 58,45), iar frecvența raportului de puritate – între 1,7 și 1,8 (cu media 1,82 și mediana 1,83). Raportul absorbanței la lungimile de undă 260 nm și 280 nm este un bun indicator al purității ADN-ului. Se consideră că probele pentru care valorile acestui raport se află între 1,7 și 2,0 prezintă o puritate acceptabilă a acidului dezoxiribonucleic, 1,8 fiind o caracteristică a ADN-ului „pur”. De asemenea s-a observat că în cazul fragmentelor de piele exfoliată a reptilelor, precum și în probele de tampon bucal și de piele prelevate de la amfibieni, concentrația ADN-ului a fost mai joasă comparativ cu celelalte probe analizate. Nu s-a determinat o diferență a purității ADN-ului între diferite tipuri de probe.

În ce privește mostrele colectate pentru evaluarea *in vitro* a metodei de genotipare a speciei *Sus scrofa* a fost extras ADN-ul genomic din 14 probe de mistreț și 5 probe de porci domestici. Cu o singură excepție, în toate cazurile pentru extragere s-a întrebuițat țesut muscular. A fost utilizată o singură probă de fragmente de piele de mistreț identificate în Rezervația Naturală Pădurea Domnească. S-au obținut valori optime ale purității și concentrației în probe ceea ce a permis ulterior o amplificare eficientă. În Fig. 3.11 și Tabelul 3.6 sunt prezentate datele cu referire la concentrația și puritatea ADN-ului extras după protocolul *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*.

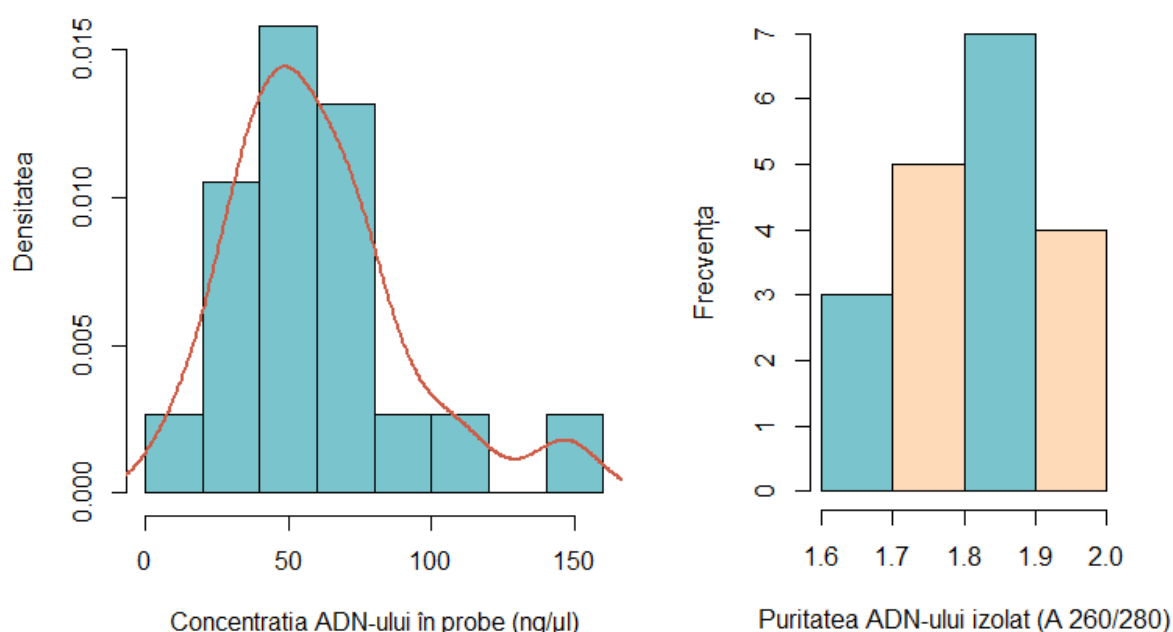


Fig. 3.11. Distribuția datelor cu referire la concentrație (stânga) și frecvența purității ADN-ului izolat (dreapta) din probele de *Sus scrofa*

**Tabelul 3.6. Concentrația și puritatea ADN-ului izolat
de la specimene de *Sus scrofa***

Nr.	Specimen	Concentrația ADN-ului izolat (ng/μl)	A 260/280
1	Mistreț	31,67	1,84
2	Mistreț	37,20	1,71
3	Mistreț	27,03	1,66
4	Mistreț	46,82	1,92
5	Mistreț	70,89	1,87
6	Mistreț	51,07	1,74
7	Mistreț	62,36	1,89
8	Mistreț	146,63	1,86
9	Mistreț	56,46	1,70
10	Mistreț	45,75	1,93
11	Mistreț	44,88	1,78
12	Mistreț	77,75	1,72
13	Mistreț	92,35	1,69
14	Mistreț	11,48	1,97
15	Porc domestic	74,71	1,91
16	Porc domestic	110,50	1,85
17	Porc domestic	71,33	1,90
18	Porc domestic	55,48	1,81
19	Porc domestic	33,54	1,76

Concentrația minimă a reprezentat 11,48 ng/μl (în cazul ADN-ului izolat din fragmente de piele), valoare scăzută însă totuși acceptabilă pentru realizarea reacției de PCR. Maximul concentrației a fost de 146,63 ng/μl, iar picul densității de probabilitate (șansa ca o valoare să apară într-un anumit interval) a concentrației se află în jurul valorii de 50 ng/μl. Mai multe detalii statistice a datelor obținute sunt prezentate în tabelul 3.7.

**Tabelul 3.7. Sumar statistic al datelor
cu referire la ADN-ul extras din probele de *Sus scrofa***

	Concentrație (ng/μl)	Puritate (A 260/280)
Media	60,42	1,82
Mediana	55,48	1,84
Abaterea standard		0,09
Intervalul intercuartil (IQR)	31,98	0,17
Testul de normalitate <i>Shapiro-Wilk</i>	Distribuție normală	Distribuție normală

Cu scopul de a evalua utilitatea metodei *Dipstick* în genotiparea speciei *Sus scrofa* a fost de asemenea realizată extragerea ADN-ului din 6 probe conform protocolului *Dipstick DNA Extraction Kit*, acestea ulterior fiind amplificate cu două master mix-uri diferite.

3.2.2. Testarea *in vitro* a acoperirii taxonomice pentru primerii Met-12S

Testarea *in vitro* a acoperirii taxonomice în studiile de metabarcodare se referă la evaluarea în laborator a capacității unei perechi de primeri de a amplifica anumite grupuri de organisme sau taxoni. Aspectul crucial în acest proces este amplificarea corectă a markerilor moleculari fără apariția produșilor nespecfici sau a dimerilor de primeri. Este necesar ca evaluarea în laboratorul de biologie moleculară să fie precedată de dezvoltarea bazelor de date de referință și a resurselor bioinformaticice.

Testele *in vitro* au fost efectuate cu ADN izolat de la 16 specii de mamifere, 4 specii de păsări și câte 3 specii de reptile și amfibieni. Primerii au fost sintetizați de către compania *Thermo Fisher Scientific* și livrați în formă liofilizată. Pentru efectuarea analizelor au fost preparate soluții stoc de 100 μM și soluții de lucru diluate de 10 ori. Condițiile de amplificare pentru primerii studiați au fost descrise în capitolul anterior. Ampliconii au fost detectați prin electroforeza ADN-ului pe gel de agaroză, iar probele care au format benzi specifice în regiunea 150-170 pb au fost considerate ca fiind amplificate cu succes. Astfel din cele 26 specii analizate au fost amplificate 25, fiind obținută o acoperire taxonomică de 96,15%. A fost confirmată *in vitro* lipsa amplificării pentru specia *Lacerta agilis* care din cauza mai multor nepotriviri în regiunile de legare a primerilor nu a dat rezultat pozitiv nici la PCR-ul *in silico*. Toate benzile s-au încadrat în intervalul de dimensiune așteptat și nu au existat amplificări nespecifice sau formare de dimeri (Fig. 3.12).

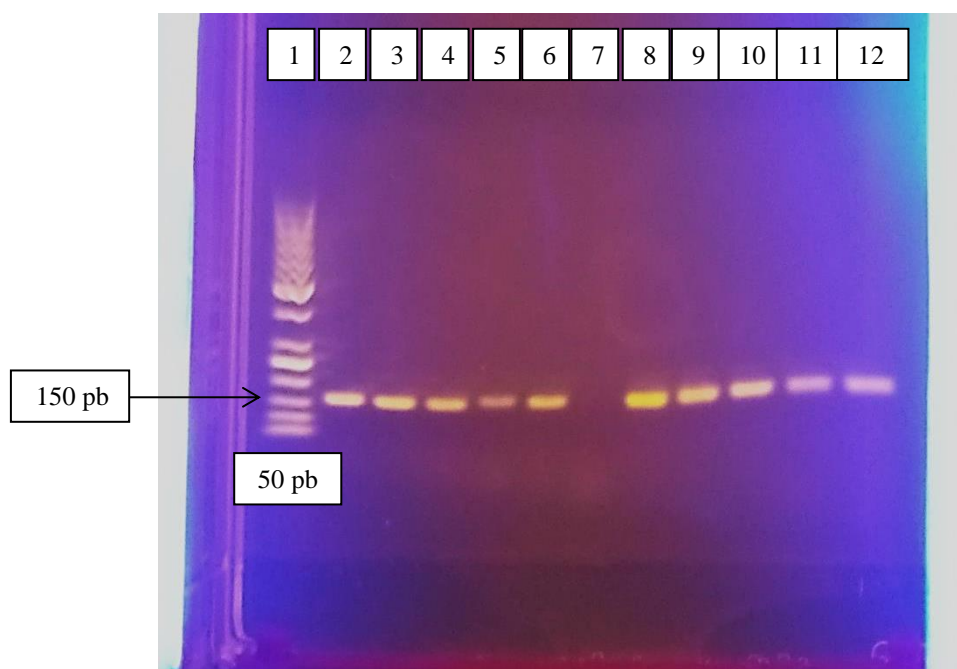


Fig. 3.12. Electroforegrama ampliconilor obținuți cu noii primeri

(1 – GeneRuler 50 bp; 2 – *Dendrocopos major*; 3 – *Martes martes*; 4 – *Meles meles*; 5 – *Muscardinus avellanarius*; 6 – *Talpa europaea*; 7 – *Lacerta agilis*; 8 – *Bufo bufo*; 9 – *Passer domesticus*; 10 – *Lepus europaeus*; 11 – *Plecotus auritus*; 12 – *Sus scrofa*)

Dimensiunile metabarcodurilor și numărul de nepotriviri per primer a speciilor amplificate cu genom mitochondrial inclus în baza de date *RefSeq* sunt prezentate în Tabelul 3.8.

Tabelul 3.8. Specii cu mitogenom în *RefSeq* testate *in vitro* pentru acoperirea taxonomică

Nr.	Specia	Dimensiunea metabarcodului (cu primeri)	Numărul de nepotriviri pentru primerul <i>forward</i>	Numărul de nepotriviri pentru primerul <i>reverse</i>
1	<i>Apodemus sylvaticus</i>	164	2	2
2	<i>Buteo buteo</i>	155	0	0
3	<i>Dendrocopos major</i>	157	0	0
4	<i>Lacerta agilis</i>	-	-	-
5	<i>Lepus europaeus</i>	160	1	2
6	<i>Martes martes</i>	159	2	1
7	<i>Meles meles</i>	158	2	2
8	<i>Microtus arvalis</i>	160	2	2
9	<i>Microtus levis</i>	160	2	2
10	<i>Mus musculus</i>	161	2	2

11	<i>Muscardinus avellanarius</i>	165	2	2
12	<i>Nyctalus noctula</i>	162	2	0
13	<i>Passer domesticus</i>	158	0	0
14	<i>Plecotus auritus</i>	164	2	0
15	<i>Rana temporaria</i>	153	2	1
16	<i>Sorex araneus</i>	161	2	2
17	<i>Sus scrofa</i>	162	1	2
18	<i>Talpa europaea</i>	161	2	2
19	<i>Vipera berus</i>	155	1	1

Din tabel se observă că toate speciile studiate cu excepția păsărilor prezintă 1-2 nepotriviri la un singur primer sau la ambii. Cele trei specii de păsări (*Buteo buteo*, *Dendrocopos major* și *Passer domesticus*) se deosebesc prin faptul că au zero nepotriviri pentru ambii primeri. Lungimea ampliconilor este între 153 pb (*Rana temporaria*) și 165 pb (*Muscardinus avellanarius*). Astfel, evaluarea în laborator a acoperirii taxonomice pentru primerii *Met-12S* confirmă capacitatea acestora de a amplifica secvențele așteptate de metabarcod, obținându-se benzi clare în regiunea 150-170 pb și fără formarea produșilor secundari.

3.2.3. Genotiparea speciei *Sus scrofa* în baza polimorfismului genei *MC1R*

Mistrețul aparține genului *Sus* din familia *Suidae* și fiind strămoșul porcului domestic se poate încrucișa ușor cu acesta. Acest lucru se poate întâmpla neintenționat în zonele fermelor de porcine deschise sau semideschise ori prin încrucișare intenționată. Populațiile de mistreț sunt în continuă creștere în întreaga lume, iar în unele țări această specie este considerată dăunător forestier și agricol [146]. O ipoteză recentă sugerează că hibridizarea între mistreț și porcul domestic crește gradul de invazivitate al primului [43]. De asemenea, există îngrijorări că hibridizarea dintre animalele sălbatice și cele domestice pot afecta integritatea genetică și potențialul de adaptare al mistreților [117]. În prezent, gradul de hibridizare a mistreților din fauna Republicii Moldova este necunoscut, motivul principal fiind lipsa protocoalelor experimentale de laborator care ar permite realizarea genotipării. Unele studii [67, 73] sugerează că diferențierea hibridilor de liniile pure poate fi realizată prin profilarea STR (*Short Tandem Repeats* – secvențe scurte repetitive cunoscute și sub denumirea de ADN microsatelit) sau/și prin analiza polimorfismului unor gene nucleare precum *NR6A1* sau *MC1R*. Gena receptorului de melanocortină 1 sau *MC1R* reglează sinteza melaninei la multe mamifere și păsări, astfel jucând

un rol central în procesul de pigmentare. Aceasta conține instrucțiuni pentru producerea unei proteine receptor ce se află în membrana melanocitelor, iar analizele secvențelor de ADN au arătat că specia *Sus scrofa* are mai multe alele ale acestei gene. Alelismul multiplu al genei *MC1R* poate fi observat fenotipic prin diversitatea pigmentării pielii la porci. Alela de tip sălbatic numită *E+* a fost identificată la mistreți, alela *ED1* – la rasele domestice marele negru și Meishan, *EPD2* – la rasele marele alb, Hampshire și Pietrain [34, 65], în timp ce alela recesivă *e* este asociată cu rasa Duroc (Fig. 3.13).

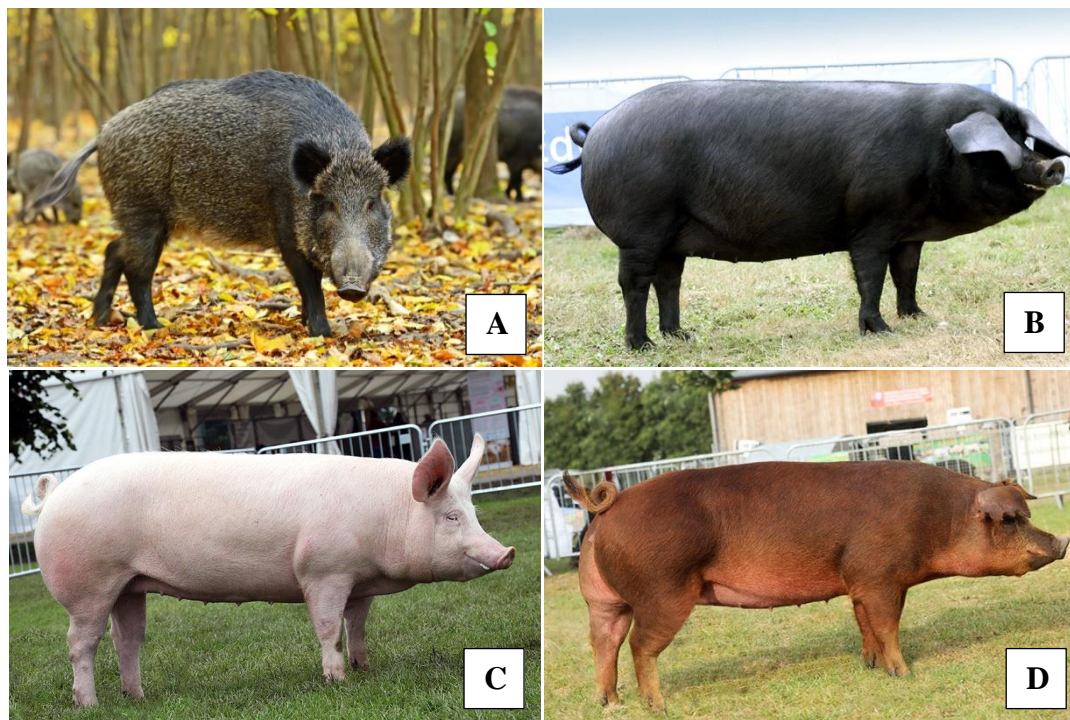


Fig. 3.13. Trăsături fenotipice de culoare a pielii la specia *Sus scrofa* cu diferite alele *MC1R*
A - mistreț [169], B – marele negru [157], C – marele alb [157], D – Duroc [157]

Secvențierea *MC1R* și a altor markeri ar fi o modalitate eficientă de diferențiere a hibridilor de liniile pure, cu toate acestea, chiar și în prezent aceasta rămâne a fi o metodă moleculară costisitoare și nu este accesibilă pentru toate laboratoarele. În acest context apare necesitatea utilizării unor alternative mai ieftine pentru identificarea hibridilor de mistreț. O posibilă alternativă ar fi discriminarea între secvențele de interes prin utilizarea enzimelor de restricție și a metodei *RFLP-PCR* [87]. Astfel, la această etapă a cercetărilor ne-am propus optimizarea și aplicarea metodei *RFLP-PCR* în scopul diferențierii hibridilor și liniilor pure de mistreț. A fost amplificat ADN-ul genomic provenit de la 14 probe de mistreț și pentru comparație – de la 5 probe de porc domestic. Protocoalele de extragere, amplificare și digestie cu enzime de restricție au fost optimizate și adaptate la condițiile și resursele laboratorului.

Ampliconii obținuți au fost supuși digestiei 16 ore la temperatura de 37 °C cu enzimele BspHI și BstUI, iar fragmentele rezultate au fost vizualizate pe gel de agaroză de 1% la transiluminatorul instrumentului *Bento Lab*. În rezultatul analizei celor 19 probe au fost identificate 3 genotipuri (Fig. 3.14): E^+/E^+ (mistreț pur, 13 probe), E^{PD2}/e (porc domestic, 5 probe) și E^+/e (mistreț hibrid, 1 probă).

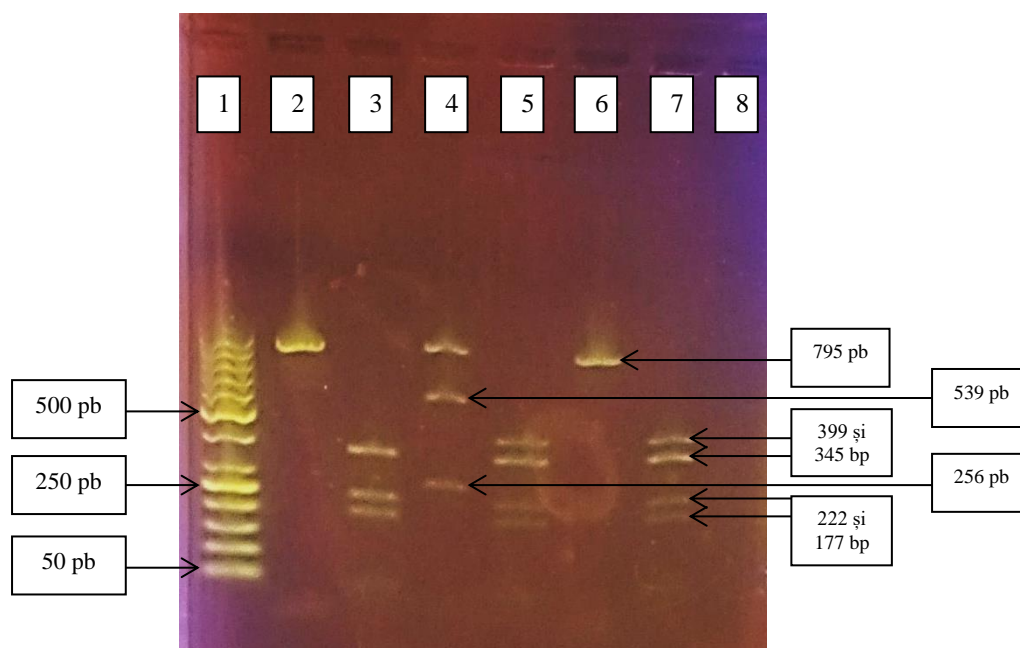


Fig. 3.14. Electroforegrama genotipurilor identificate

(1 – GeneRuler 50 bp; 2,3 – genotip E^+/E^+ ; 4,5 – genotip E^{PD2}/e ; 6,7 – genotip E^+/e ; 8 – control negativ; 2,4,6 – probe supuse digestiei cu BspHI; 3,5,7 – probe supuse digestiei cu BstUI)

Toți produșii de digestie au dimensiunile așteptate și creează un tablou molecular specific fiecărui genotip, iar rezultatele obținute confirmă că metoda poate fi utilizată în practica de cercetare în scopul diferențierii hibridizilor și liniilor pure de mistreț. Pe parcursul studiului s-a încercat simplificarea protocolului de extragere a ADN-ului (înlocuirea *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* cu *Dipstick DNA Extraction Kit*) și amplificarea ulterioară cu două tipuri de mastermix-uri: *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* și *AmpliTaq Gold 360 Master Mix*. În acest scop în mod repetat a fost extras ADN-ul din 6 probe de mistreț prin metoda *Dipstick* după care a fost realizat PCR-ul. În toate cazurile reacția de amplificare a eșuat cu excepția unei probe (amplificată cu mastermix *DreamTaq*) la care au fost obținuți ampliconii așteptați de 795 pb. Unul din motivele eșuării PCR-ului ar putea fi prezența inhibitorilor de amplificare cum este hemoglobina, întrucât procesul de spălare al ADN-ului prin metoda *Dipstick* nu asigură o curățare foarte eficientă. Pentru rezolvarea acestei probleme în cercetările viitoare ar putea fi utilizat un

aditiv care oferă o anumită rezistență a reacției față de inhibitori (ex. *BSA* - *Bovine Serum Albumin*).

Suplimentar, la etapa finală de analiză a rezultatelor, s-a urmărit compararea electroforegramelor obținute la digestia *in silico* și *in vitro* a alelei sălbatice E^+ (Fig. 3.15).

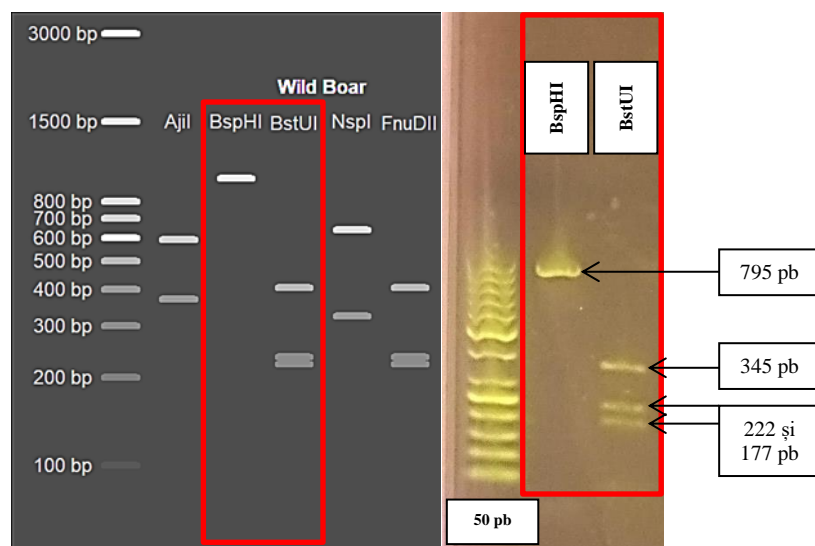


Fig. 3.15. Benzile electroforetice obținute la liniile pure de mistreț (E^+) în urma digestiei ampliconilor *MC1R* cu enzimele de restricție BspHI și BstUI (*in silico* – stânga, *in vitro* – dreapta)

Fragmentarea *in silico* a fost realizată utilizându-se întreaga secvență genică *MC1R* care constituie 963 perechi de baze, pe când digestia *in vitro* s-a efectuat asupra ampliconilor obținuți cu primerii AGTGCCTGGAGGTGTCCATTCCC și CGTAGATGAGGGGGTCCACGATGGA cu o lungime de 795 pb [34]. Astfel în figura 3.15 se observă că cercetarea bioinformatică a oferit un rezultat corect pentru o potențială analiză RFLP-PCR cu enzimele BspHI și BstUI. În acest context limbajul *R* și librăria *seqRFLP* se dovedesc a fi instrumente valoroase pentru simularea digestiei fragmentelor de interes cu diverse enzime de restricție. Precedarea analizelor de laborator RFLP-PCR cu studii bioinformatică ar permite descoperirea posibilităților de discriminare între secvențe cu o reducere semnificativă a costurilor, acest lucru la rândul său facilitând identificarea și optimizarea metodelor de diferențiere a speciilor, subspeciilor sau formelor hibride.

3.3. Concluzii la capitolul 3

1. Au fost identificate toate speciile de amfibieni, reptile, păsări și mamifere care fac parte din fauna Republicii Moldova și au genom mitocondrial secvențiat, inclus în baza de date globală *RefSeq* (174 specii).
2. A fost efectuată validarea *in silico* a noi primeri pentru metabarcodarea celor 174 specii. În limita grupului de specii studiat, noii primeri (denumiți provizoriu *Met-12S*) au demonstrat performanțe superioare în comparație cu primerii universali pentru metabarcodarea vertebratelor. De asemenea, au fost evaluate *in vitro* acoperirea taxonomică a noilor primeri și dimensiunea metabarcodurilor asociate. Au fost obținute benzi electroforetice clare fără formare de dimeri sau produși secundari, iar dimensiunea ampliconilor obținuți *in vitro* a coincis cu cea a ampliconilor generați *in silico*. *Met-12S* au potențialul de a identifica peste o sută de specii de vertebrate terestre într-un singur experiment, utilizând tehnici neinvazive.
3. A fost testată *in silico* și *in vitro* o metodă moleculară de genotipare și diferențiere a hibrizilor de mistreț în baza alelelor genei *MC1R*. Secvențele alelice au fost amplificate, fragmentate cu enzime de restricție și analizate în câmp electroforetic. S-au optimizat protocoalele experimentale, iar fluxul de lucru a fost adaptat la condițiile laboratorului. Datorită cercetărilor efectuate, în cadrul laboratorului Vertebrate Terestre al Institutului de Zoologie poate fi realizată testarea de rutină și genotiparea speciei *Sus scrofa* în scopul diferențierii hibrizilor și liniilor pure de mistreț.

4. ANALIZA FILOGENETICĂ ȘI MODELAREA DISTRIBUȚIEI SPECIILOR

4.1. Analiza filogenetică a secvențelor genei *CYTB* la speciile de microtine

Gena *CYTB* este de origine mitocondrială și conține instrucțiuni pentru producerea unei proteine denumită citocrom b, parte componentă a lanțului transportator de electroni din mitocondrii și care participă în procesul de sinteză a adenosin trifosfatului (ATP). Secvențele genei *CYTB* sunt adesea utilizate pentru determinarea relațiilor filogenetice dintre organisme și identificarea speciilor întrucât posedă o variabilitate limitată în cadrul speciei și o variabilitate ridicată în afara acesteia. De asemenea, în bazele de date de specialitate sunt depozitate secvențe de ADN ale citocromului b pentru o multitudine de specii din întreaga lume, cercetătorii putând compara secvențele obținute în studiile lor cu cele din bazele de date. Acest lucru permite identificarea cu precizie a speciilor, chiar și atunci când acestea sunt morfologic similare sau în stadii de dezvoltare diferite. Astfel, la această etapă a cercetărilor ne-am propus secvențierea genei citocromului b și analiza filogenetică a secvențelor obținute de la 13 specimene ale genului *Microtus*. În Republica Moldova genul *Microtus* este reprezentat prin 2 specii: *M. arvalis* (Șoarece de câmp) și *M. levis* (Șoarece răsăritean de câmp), iar întrucât aceste specii nu pot fi diferențiate vizual și habitatul acestora se poate suprapune, la prelevarea probelor nu a fost posibilă identificarea până la nivel de specie. Astfel, diferențierea celor 13 specimene a fost realizată în urma secvențierii genei *CYTB*, fiind obținute 8 secvențe pentru *M. levis* și 5 pentru *M. arvalis*. Probele au fost prelevate din suburbia Chișinăului și din alte câteva localități din regiunea centrală a țării (Tabelul 4.1, Fig. 4.1). În zona localității Horești au fost identificați reprezentanți ai ambelor specii (habitează simpatric).

**Tabelul 4.1. Localitățile din Moldova în care
au fost capturate microtinele incluse în studiu**

Localitate	Latitudine	Longitudine	Specimene identificate
Piatra Albă	46.926	28.825	1 x <i>M. arvalis</i>
Horești	46.806	28.929	3 x <i>M. arvalis</i> 3 x <i>M. levis</i>
Malcoci	47.016	28.665	5 x <i>M. levis</i>
Chișinău	47.021	28.718	1 x <i>M. arvalis</i>

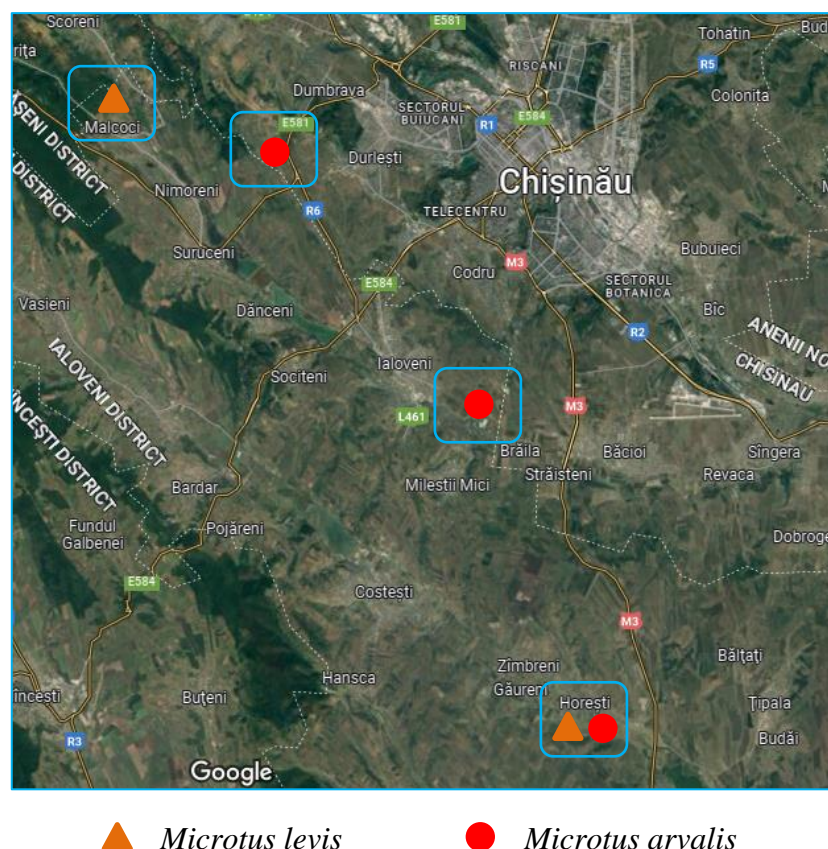


Fig. 4.1. Locațiile geografice de colectare a probelor [163]

Succesiunea secvențelor de barcod a celor 13 specimene este următoarea:

1. *M_01 Microtus arvalis*, Chisinau, cytochrome *b* gene, mitochondrial

CAGTCATCCGAAAAAACACCCATTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATCGACC
 TTCCCGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCTCTCCTAGGCCTTTG
 TCTGATTGTCCAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCTATACTACACATCAGACAC
 AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCCATATCTGTGCGAGACGTAAACTATGGTTGACT
 TATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATTTGCCTGTTCTTACAC
 GTAGGACGAGGGGTTTACTACGGCTCATATAACATAATCGAAACATGAAACATAGG
 GATTGTCTTACTATTCGCCGTAATAGCAACAGCATTTCATAGGCTACGTCCTTCCATG
 AGGCCAAATATCGTTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAATCTCTTATCAGCAATCCC
 CTACATTGGTACTACATTAGTAGAGTGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTAGATAAAGC
 CACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCCTTTATTATTACCGCCCTTG
 TATTAATCCACCTTTTATTCTTCACGAACTGGGTCTAACAACCCAACCTGGACTGA
 ACTCAGACGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGATTTTCCTAG
 GAGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCAGATATTCTC

GGAGACCCCGACAATTACACCCCTGCAAATCCACTCAACACACCACCCCATATTAA
ACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTACGCCATTCTACGATCTATCCCCAACAACT
AGGTGGCGTACTAGCACTGATCCTATCAATCGTAATCCTAGCCTTTATACCACTCCT
CCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATCACACAAACAATGTACTG
AATCCTAGTAGCTGATCTCCTAGTCCTCACATGAATCGGAGGCCAGCCAGTTGAATA
CCCATTTCATCATCATTGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTTGCTATCATCGTTATC
TTCATACCAATAGCAGGC

2. *M_02 Microtus arvalis, Horesti, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAGTCATCCGAAAAAACACCCATTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATCGACC
TTCCCGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGCCTTTG
TCTGATTGTCCAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCTATACACTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCCATATCTGTGCGAGACGTAAACTATGGTTGACT
TATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATTTGCCTGTTCTACAC
GTAGGACGAGGGGTTTACTACGGCTCATATAACATAATCGAAACATGAAACATAGG
GATTGTCTTACTATTCGCCGTAATAGCAACAGCATTTCATAGGCTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCGTTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAATCTCTTATCAGCAATCCC
CTACATTGGTACTACATTAGTAGAGTGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTAGATAAAGC
CACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCCTTTATTATTACCGCCCTTG
TATTAGTCCACCTTTTATTCTTCACGAAACTGGGTCTAACAACCCAACTGGACTGA
ACTCAGACGCAGACAAAATCCCATTCACCCCTATTATACAGTCAAAGATTTCTAG
GAGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCAGATATTCTC
GGAGACCCCGACAATTACACCCCTGCAAATCCACTCAACACACCACCCCATATTAA
ACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTACGCCATTCTACGATCTATCCCCAACAACT
AGGTGGCGTACTAGCACTGATCCTATCAATCGTAATCCTAGCCTTTATACCAATCCT
CCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATCACACAAACAATGTACTG
AATCCTAGTAGCTGATCTCCTAGTCCTCACATGAATCGGAGGCCAGCCAGTTGAATA
CCCATTTCATCATCATTGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTTGCTATCATCGTTATC
TTCATACCAATAGCAGGC

3. *M_03 Microtus rossiaemeridionalis, Horesti, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAATCATCCGAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATTGACC
TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
TCTAATTRYACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC

AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATTTGTCGAGACGTAAACTATGGCTGACT
CATCCGATAYATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCCTRCAC
GTAGGACGAGGRGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAGG
AGTTGTCTTACTATTMACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATYACAAATCTCCTATCAGCAATCCC
CTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAAG
CCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTTATTATTACCGCCCT
CGTAYTAGTCCACCTTCTATTCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGACT
GAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCTT
AGGGGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATT
CTCGGAGACCCCGACAATTAYACCCCGCAAATCCACTYAAACACACCACCCCATAT
YAAACCAGAATGATAYTTCCTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAA
ACTAGGTGGCGTACTAGCACTAATCTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACT
CCTCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATTACACAGACAATGTA
CTGAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTGTCCTCACATGAATCGGAGGACAACCAGTTGA
ATACCCATTTATCRCCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTC
ATCTTCATACCAATAGCAGGC

4. *M_04 Microtus rossiaemeridionalis, Horesti, cytochrome b gene, mitochondrial*

ACATCATCCGAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATTGACC
TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
TCTAATTRYACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATTTGTCGAGACGTAAACTATGGCTGACT
CATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCCTRCAC
GTAGGACGAGGRGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAGG
AGTTGTCTTACTATTAACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATYACAAATCTCCTATCAGCAATCCC
CTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAAG
CCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTTATTATTACCGCCCT
CGTAYTAGTCCACCTTCTATTCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGACT
GAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCTT
AGGGGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATT
CTCGGAGACCCCGACAATTAYACCCCGCAAATCCACTYAAACACACCACCCCATAT
YAAACCAGAATGATACTTCCTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAA

ACTAGGTGGCGTACTAGCACTAATCTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACT
CCTCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACCTTTCCGCCCAATTACACAGACAATGTA
CTGAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTGTCCTCACATGAATCGGAGGACAACCAGTTGA
ATACCCATTTATCRCCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTC
ATCTTCATACCAATAGCAGGC

5. *M_05 Microtus rossiaemeridionalis, Horesti, cytochrome b gene, mitochondrial*

ACATCATCCGAAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATTGACC
TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
TCTAATTRYACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATTTGTCGAGACGTAAACTATGGCTGACT
CATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCCTRCAC
GTAGGACGAGGRGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAGG
AGTTGTCTTACTATTAACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATYACAAATCTCCTATCAGCAATCCC
CTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAAG
CCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTTATTATTACCGCCCT
CGTAYTAGTCCACCTTCTATTCCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGACT
GAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCTT
AGGGGTCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATT
CTCGGAGACCCCGACAATTAYACCCCGCAAATCCACTYAAACACACCACCCCATAT
YAAACCAGAATGATAYTTCCTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAA
ACTAGGTGGCGTACTAGCACTAATCTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACT
CCTCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACCTTTCCGCCCAATTACACAGACAATGTA
CTGAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTGTCCTCACATGAATCGGAGGACAACCAGTTGA
ATACCCATTTATCACCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTC
ATCTTCATACCAATAGCAGGC

6. *M_06 Microtus arvalis, Horesti, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAGTCATCCGAAAAAAACACCCATTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATCGACC
TTCCCGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGCCTTTG
TCTGATTGTCCAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCTATACTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCCATATCTGTGTCGAGACGTAAACTATGGTTGACT
TATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATTTGCCTGTTCTACAC

GTAGGACGAGGGGTTTACTACGGCTCATATAACATAATCGAAACATGAAACATAGG
GATTGTCTTACTATTCGCCGTAATAGCAACAGCATTTCATAGGCTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCGTTCTGAGGGGGCCACAGTCATTACAAATCTCTTATCAGCAATCCC
CTACATTGGTACTACATTAGTAGAGTGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTAGATAAAGC
CACCTTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCCTTTATTATTACCGCCCTTG
TATTAGTCCACCTTTTATTCCTTCACGAAACTGGGTCTAACAACCCAACCTGGACTGA
ACTCAGACGCAGACAAAATCCCATTCACCCCTATTATACAGTCAAAGATTTCCCTAG
GAGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATTCTC
GGAGACCCCGACAATTACACCCCTGCAAATCCACTCAACACACCACCCCATATTAA
ACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTACGCCATTCTACGATCTATCCCCAACAACT
AGGTGGCGTACTAGCACTGATCCTATCAATCGTAATCCTAGCCTTTATACCAATCCT
CCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATCACACAAACAATGTACTG
AATCCTAGTAGCTGATCTCCTAGTCCTCACATGAATCGGAGGCCAGCCAGTTGAATA
CCCATTTCATCATCATTGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTTGCTATCATCGTTATC
TTCATACCAATAGCAGGC

7. *M_07 Microtus arvalis, Horesti, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAGTCATCCGAAAAAACACCCATTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATCGACC
TTCCCGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGCCTTTG
TCTGATTGTCCAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCTATACTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCCATATCTGTGCGAGACGTAAACTATGGTTGACT
TATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATTTGCCTGTTCCCTACAC
GTAGGACGAGGGGTTTACTACGGCTCATATAACATAATCGAAACATGAAACATAGG
GATTGTCTTACTATTCGCCGTAATAGCAACAGCATTTCATAGGCTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCATTCTGAGGGGGCCACAGTCATTACAAATCTCTTATCAGCAATCCC
CTACATTGGTACTACATTAGTAGAGTGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTAGATAAAGC
CACGCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCCTTTATTATTACCGCCCTT
GTATTAGTCCACCTTTTATTCCTTCACGAAACAGGGTCTAACAACCCAACCTGGACTG
AACTCAGACGCAGACAAAATCCCATTCACCCCTATTATACAGTCAAAGATTTCCCTA
GGAGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATTCT
CGGAGACCCCGACAATTACACCCCTGCAAATCCACTCAACACACCACCCCATATTAA
ACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTACGCCATTCTACGATCTATCCCCAACAACT
AGGTGGCGTACTAGCACTGATCCTATCAATCGTAATCCTAGCCTTTATACCACTCCT
CCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATCACACAAACAATGTACTG

AATCCTAGTAGCTGATCTCCTAGTCCTCACATGAATCGGAGGCCAGCCAGTTGAATA
CCCATTTCATCATCATTGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTTGCTATCATCGTTATC
TTCATACCAATAGCAGGC

8. *M_08 Microtus rossiaemeridionalis, Malcoci, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAATCATCCGAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATTGACC
TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
TCTAATTGYACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATYTGTCGAGACGTAAACTATGGCTGACT
CATCMGATAYATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCCTGCA
CGTAGGACGAGGAGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAG
GARTTGTCTTACTATTMACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGGTTACGTCCTTCCAT
GAGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATTACAAATCTCCTATCAGCAATCC
CCTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAA
GCCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTTATTATTACCGCCC
TCGTATTAGTCCACCTTCTATTCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGAC
TGAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCT
TAGGGGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTTCCCAGATATT
CTCGGAGACCCCGACAATTACACCCCGCAAATCCACTCAACACACCACCCCATATC
AAACCAGAATGATACTTCCTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAAA
CTAGGTGGCGTACTAGCACTAATCTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACTC
CTCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATTACACAGACAATGTAC
TGAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTRCCTCACATGAATCGGAGGMNAACCAGTTGAA
TACCCATTTATCGTCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTCA
TCTTCATACCAATAGCAGGC

9. *M_09 Microtus rossiaemeridionalis, Malcoci, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAATCATCCGAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATTGACC
TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
TCTAATTGYACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATTTGTCGAGACGTAAACTATGGCTGACT
CATCCGATAYATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCCTGCAC
GTAGGACGAGGRGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAGG
AGTTGTCTTACTATTMACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGGTTACGTCCTTCCATG

AGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATYACAAATCTCCTATCAGCAATCCC
 CTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAAG
 CCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTTATTATTACCGCCCT
 CGTAYTAGTCCACCTTCTATTCCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGACT
 GAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCTT
 AGGGGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATT
 CTCGGAGACCCCGACAATTAYACCCCGCAAATCCACTYAAACACACCACCCCATAT
 YAAACCAGAATGATAYTTCCTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAA
 ACTAGGTGGCGTACTAGCACTAATCTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACT
 CCTCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATTACACAGACAATGTA
 CTGAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTGTCCTCACATGAATCGGAGGACAACCAGTTGA
 ATACCCATTTATCRTCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTC
 ATCTTCATACCAATAGCAGGC

10. *M_10 Microtus rossiaemeridionalis, Malcoci, cytochrome b gene, mitochondrial*

-CATCATCCGAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAAACCACTCGTTCATTGACC
 TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
 TCTAATTACACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC
 AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATTTGTGCGAGACGTAAACTATGGCTGACT
 CATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCTTACAC
 GTAGGACGAGGGGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAGG
 AGTTGTCTTACTATTAACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGTACGTCCTTCCATG
 AGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATCACAAATCTCCTATCAGCAATCCC
 CTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAAG
 CCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTTATTATTACCGCCCT
 CGTACTAGTCCACCTTCTATTCCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGACT
 GAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCTT
 AGGGGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATT
 CTCGGAGACCCCGACAATTATACCCCGCAAATCCACTTAACACACCACCCCATATT
 AAACCAGAATGATATTTCTTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAAA
 CTAGGTGGCGTACTAGCACTAATTTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACTCC
 TCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATTACACAGACAATATACT
 GAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTGTCCTCACATGAATCGGAGGACAACCAGTTGAAT

ACCCATTTATCACCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTCAT
CTTCATACCAATAGCAGGC

11. *M_11 Microtus rossiaemeridionalis, Malcoci, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAATCATCCGAAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATTGACC
TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
TCTAATTRYACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATTTGTCTGAGACGTAAACTATGGCTGACT
CATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCTRCAC
GTAGGACGAGGRGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAGG
AGTTGTCTTACTATTAACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATYACAAATCTCCTATCAGCAATCCC
CTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAAG
CCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTATTATTACCGCCCT
CGTAYTAGTCCACCTTCTATTCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGACT
GAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCTT
AGGGGTCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTCCCAGATATT
CTCGGAGACCCCGACAATTATACCCCGCAAATCCACTYAAACACACCACCCCATATY
AAACCAGAATGATAYTTCCTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAAA
CTAGGTGGCGTACTAGCACTAATCTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACTC
CTCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATTACACAGACAATGTAC
TGAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTGTCTCACATGAATCGGAGGACAACCAGTTGAA
TACCCATTTATCACCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTCA
TCTTCATACCAATAGCAGGC

12. *M_12 Microtus rossiaemeridionalis, Malcoci, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAATCATCCGAAAAAAACACCCACTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATTGACC
TTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGTCTTTG
TCTAATTRYACAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCCATACATTACACATCAGACAC
AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCACATTTGTCTGAGACGTAAACTATGGCTGACT
CATCCGATAYATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATCTGCCTATTCTRCAC
GTAGGACGAGGRGTCTACTACGGCTCCTATAACATGATCGAAACATGAAACATAGG
AGTTGTCTTACTATTAACCGTAATAGCAACAGCATTTCATGGGTACGTCCTTCCATG
AGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTTATYACAAATCTCCTATCAGCAATCCC

CTACATCGGTACAACACTAGTAGAATGAATTTGAGGGGGTTTCTCAGTAGATAAAG
 CCACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCATTTATTATTACCGCCCT
 CGTAYTAGTCCACCTTCTATTCCTCCACGAAACAGGATCTAACAATCCAACCTGGACT
 GAACTCAGATGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGACTTCTT
 AGGGGTCCTTATCCTATTAATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATT
 CTCGGAGACCCCGACAATTAYACCCCGCAAATCCACTYAAACACACCACCCCATAT
 YAAACCAGAATGATAYTTCCTATTTGCTTACGCCATCCTACGATCTATCCCCAACAA
 ACTAGGTGGCGTACTAGCACTAATCTTATCAATCGTAATCCTAGCCTTCATACCACT
 CCTCCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATTACACAGACAATGTA
 CTGAATCCTAGTAGCTGATCTCTTTGTCCTCACATGAATCGGAGGACAACCAGTTGA
 ATACCCATTTATCACCATCGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTCGCTATCATCGTC
 ATCTTCATACCAATAGCAGGC

13. *M_13 Microtus arvalis, Piatra Alba, cytochrome b gene, mitochondrial*

CAGTCATCCGAAAAAACACCCATTAATCAAAATCATTAACCACTCGTTCATCGACC
 TTCCCGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTCGGCTCTCTCCTAGGCCTTTG
 TCTGATTGTCCAAATTCTCACAGGATTATTCCTAGCTATACTACACATCAGACAC
 AGCAACAGCATTCTCATCAGTAGCCCATATCTGTGCGAGACGTAAACTATGGTTGACT
 TATCCGATACATACATGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTCATTTGCCTGTTCTACAC
 GTAGGACGAGGGGTTTACTACGGCTCATATAACATAATCGAAACATGAAACATAGG
 GATTGTCTTACTATTCGCCGTAATAGCAACAGCATTTCATAGGCTACGTCCTTCCATG
 AGGCCAAATATCGTTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAATCTCTTATCAGCTATCCC
 CTACATTGGTACTACATTAGTAGAGTGAATTTGAGGGGGCTTCTCAGTAGACAAAGC
 CACCCTCACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTACCCTTTATTATTACCGCCCTTG
 TATTAGTCCACCTTTTATTCCTTCACGAAACTGGGTCTAACAACCCAACCTGGACTGA
 ACTCAGACGCAGACAAAATCCCATTCCACCCCTATTATACAGTCAAAGATTTCTAG
 GAGTCCTTATCCTATTGATAGCTTTCATAATTTTGACTTTATTTTTCCCAGATATTCTC
 GGAGACCCCGACAATTACACCCCTGCAAATCCACTCAACACACCACCCCATATTAA
 ACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTACGCCATTCTACGATCTATCCCCAACAACCT
 AGGTGGCGTACTAGCACTGATCCTATCAATCGTAATCCTAGCCTTTATACCACTCCT
 CCACACTTCAAAACAACGAGCATTAACTTTCCGCCCAATCACACAAACAATGTACTG
 AATCCTAGTAGCTGATCTCCTAGTCCTCACATGAATCGGAGGCCAGCCAGTTGAATA
 CCCATTTCATCATCATTGGCCAAACAGCTTCAATTGCCTACTTTGCTATCATCGTTATC
 TTCATACCAATAGCAGGC

Microtinele reprezintă mamifere mici dar cu o influență semnificativă asupra habitatului în care trăiesc. Cercetarea acestor specii este necesară pentru înțelegerea modului în care ele interacționează cu alte organisme și cu mediul înconjurător, starea populațiilor de microtine reprezentând indicatori importanți ai stabilității ecosistemelor. Analiza variabilității intraspecifice oferă o perspectivă mai profundă atât asupra ecologiei acestor rozătoare facilitând dezvoltarea măsurilor de control a populațiilor, cât și asupra aspectelor ce vizează relațiile filogenetice dintre populații.

Un interes aparte îl reprezintă specia *M. arvalis* întrucât pentru două subspecii ale acesteia (*M. a. arvalis* și *M. a. obscurus*) care populează în zone din Europa și Asia linia de delimitare trece prin țara vecină, Ucraina [20, 51]. Astfel, în această regiune ar putea exista o zonă de hibridizare între aceste două forme [20]. Studiarea ADN-ului mitocondrial al speciei *M. arvalis* poate oferi informații despre răspunsul speciei la schimbările de mediu, adaptabilitatea sa la diferite condiții ecologice, precum și urmărirea evoluției acesteia. De exemplu, prin analize filogenetice se pot identifica populații cu un grad ridicat de izolare și cu risc de reducere a diversității genetice. Aceste informații oferă o perspectivă asupra evoluției care a avut loc până în prezent dar și previzionarea modului în care ar putea evolua în viitor. De asemenea, ele contribuie la dezvoltarea strategiilor de conservare și gestionare a speciei pentru a proteja aceste populații vulnerabile și a menține diversitatea genetică necesară pentru adaptabilitatea la schimbările viitoare de mediu. Secvențierea genei *CYTB* la aceste microtine poate fi utilă și în studiile de taxonomie și comparare a profilului molecular cu cel al speciilor criptice. Astfel, ar putea fi observate diferențele genetice între speciile care nu pot fi diferențiate morfologic.

Cercetările anterioare [51] sugerează că pe teritoriul Europei și Asiei există câteva linii filogenetice ale șoarecelui de câmp și anume: vestică (Regatul Unit, Franța, Spania), italică (Italia), centrală (Germania, Olanda, Danemarca), estică (Ungaria, Slovacia, Polonia, Ucraina, Finlanda) și o linie distinctă (Ucraina, Georgia, Armenia) care coincide cu distribuția formei *obscurus*. În cercetările efectuate ne-am propus analiza filogenetică a celor cinci secvențe ale genei *CYTB* obținute de la specimene de *M. arvalis* din Moldova în comparație cu alte 26 secvențe obținute din GenBank [23, 110]. Astfel, au fost analizate 31 de secvențe care cuprind toate liniile filogenetice menționate mai sus și care provin de la specimene din următoarele țări: Armenia, Danemarca, Finlanda, Franța, Georgia, Germania, Italia, Moldova, Olanda, Polonia, Regatul Unit (Orkney), Slovacia, Spania, Ucraina, Ungaria. În Fig. 4.2, sub formă de *heatmap*, este reprezentată matricea distanțelor obținută în baza analizei filogenetice după modelul propus de Tamura și Nei în 1993 (TN93) [131].

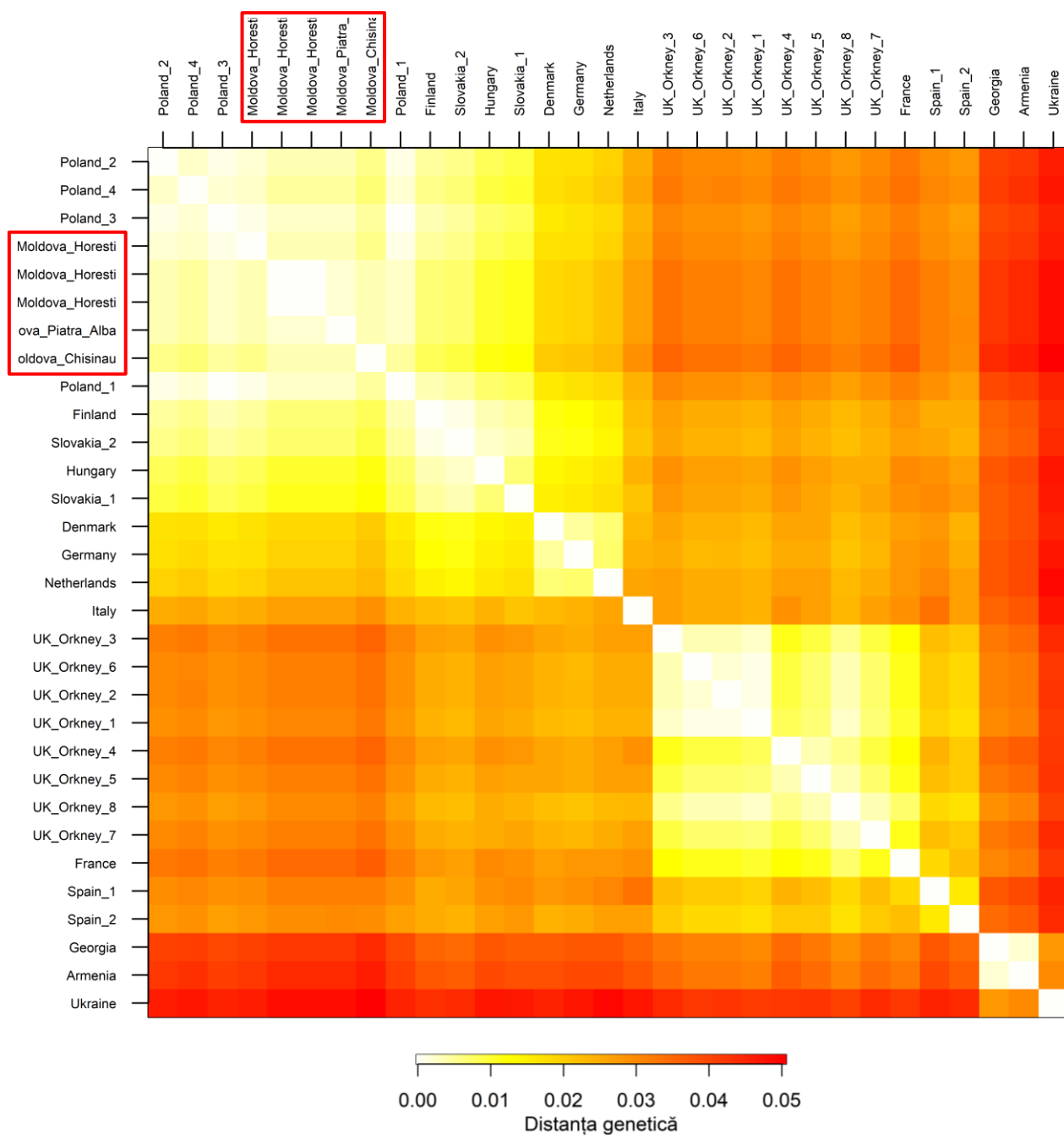


Fig. 4.2. Distanța genetică între 31 secvențe ale genei *CYTB* la specia *M. arvalis*

Din figura de mai sus se observă că pentru speciile analizate din Moldova mai apropiate din punct de vedere genetic sunt cele din Polonia și din linia filogenetică estică. Distanța minimă între secvențe a fost de 0,001 (0,1%), medie – 0,024 (2,4%) și maximă – 0,05 (5%). Distanța genetică maximă de 5% a fost observată între secvența specimenului din Chișinău și secvența din Ucraina. Este de notat că o distanță genetică de 5% la rozătoare, în cadrul aceleiași specii, indică o diferență relativ mare între secvențe. Conform datelor obținute secvențele studiate au format 5 clustere asociate celor 5 linii filogenetice descrise anterior, speciile analizate din Moldova grupându-se cu cele din linia filogenetică estică (Fig. 4.3).

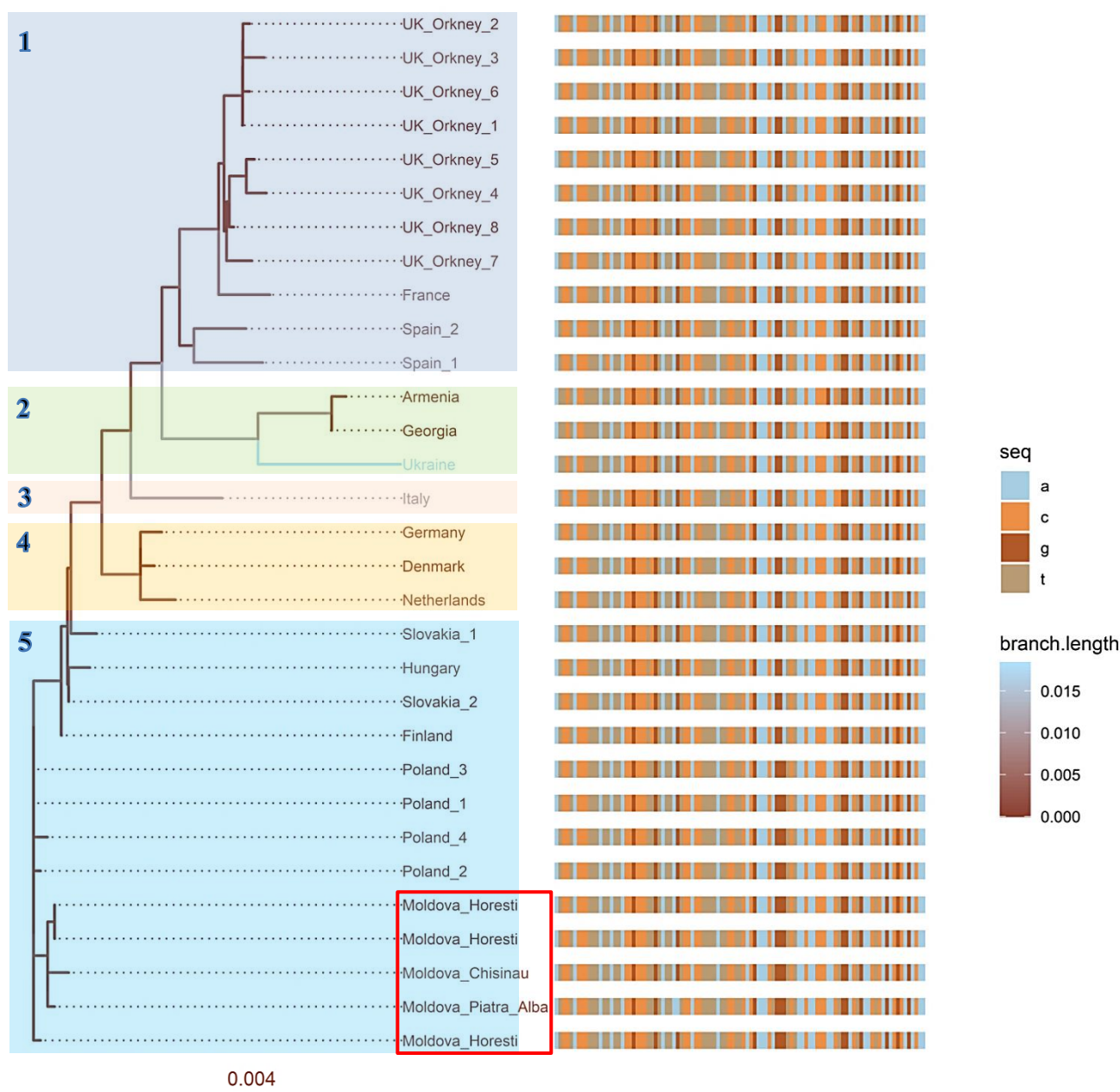


Fig. 4.3. Arborele filogenetic obținut din secvențe ale genei *CYTB* la specia *M. arvalis*

Liniile filogenetice care pot fi observate: 1. Vestică; 2. Linia asociată formei obscurus; 3. Italică; 4. Centrală; 5. Estică, din care fac parte și microtinele din Republica Moldova; a, c, g, t – adenina, citozina, guanina, timina; branch.length – lungimea ramurii

Scala de culoare a ramurilor arborelui reprezintă distanța genetică iar modificările de culoare a secvențelor aliniate arată diferențele de nucleotide. Se observă o diferență relativ mare între linii în special între clusterul estic și cel vestic pe de o parte și estic cu cel asociat liniei *obscurus* pe de alta. Totodată nu se atestă o variație mare între secvențele din cadrul liniei filogenetice estice. Arborele filogenetic prezentat are 29 noduri interne și 31 ramuri de vârf, iar

secvențele analizate au dimensiunea de 1106 pb și prezintă 113 site-uri de variație. Substituțiile nucleotidice per site (unitatea lungimii de ramură) au o valoare de 0,004 ceea ce constituie 0,4% variație genetică la 100 site-uri nucleotidice. Pentru testarea calității arborelui filogenetic creat a fost investigată măsura în care acesta reprezintă distanța originală din matrice (Fig. 4.4).

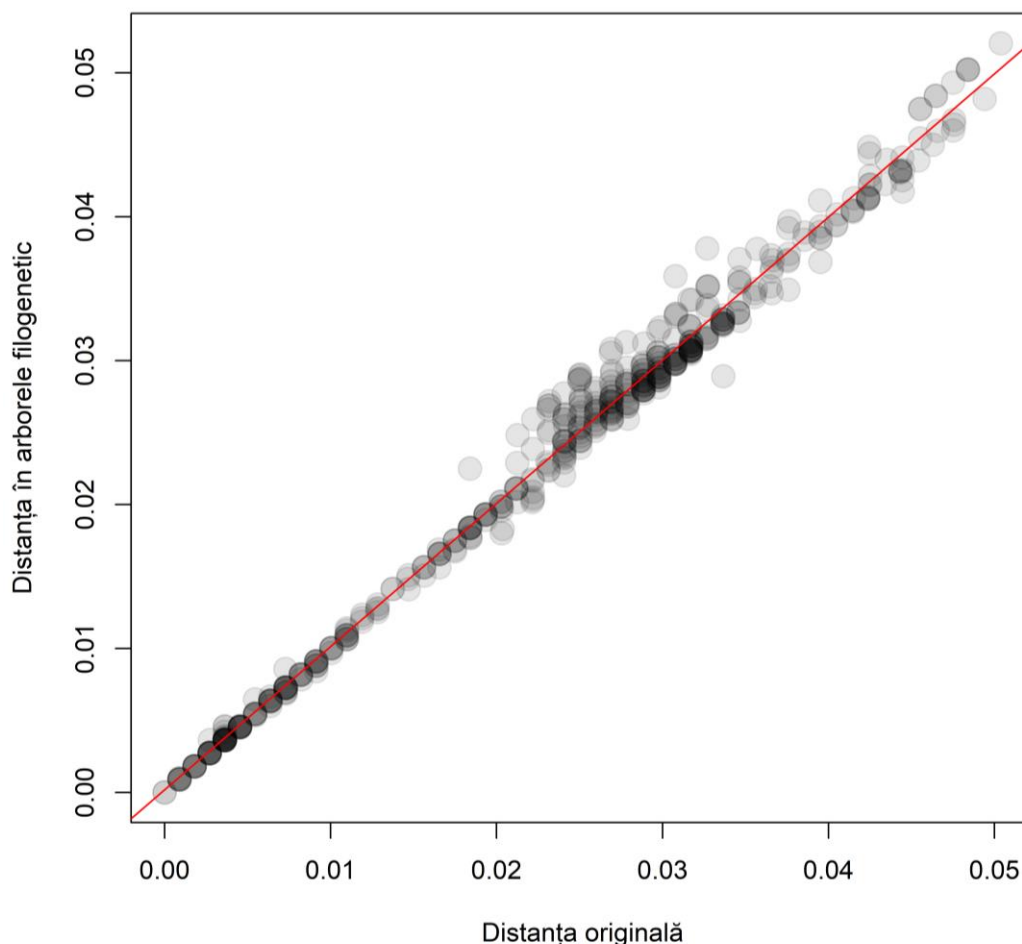


Fig. 4.4. Corelația dintre distanța prezentată în arborele filogenetic și distanța originală

Coeficientul cogenetic de corelație are o valoare de 0,99 ceea ce demonstrează o calitate înaltă a filogeniei obținute cu modelul TN93, arborele construit având o reprezentare corectă a distanțelor genetice.

Tot după modelul lui Tamura și Nei [131] a fost calculată distanța genetică între secvențele obținute de la speciemenle de *M. levis* din Moldova și 78 secvențe din GenBank din următoarele țări: Elveția, Grecia, Kazahstan, Polonia și Turcia. În acest caz a fost observată o distanță mult mai mică între secvențe cu un maxim de 0,02; o medie de 0,008 și un minim de 0,002 (Fig. 4.5).

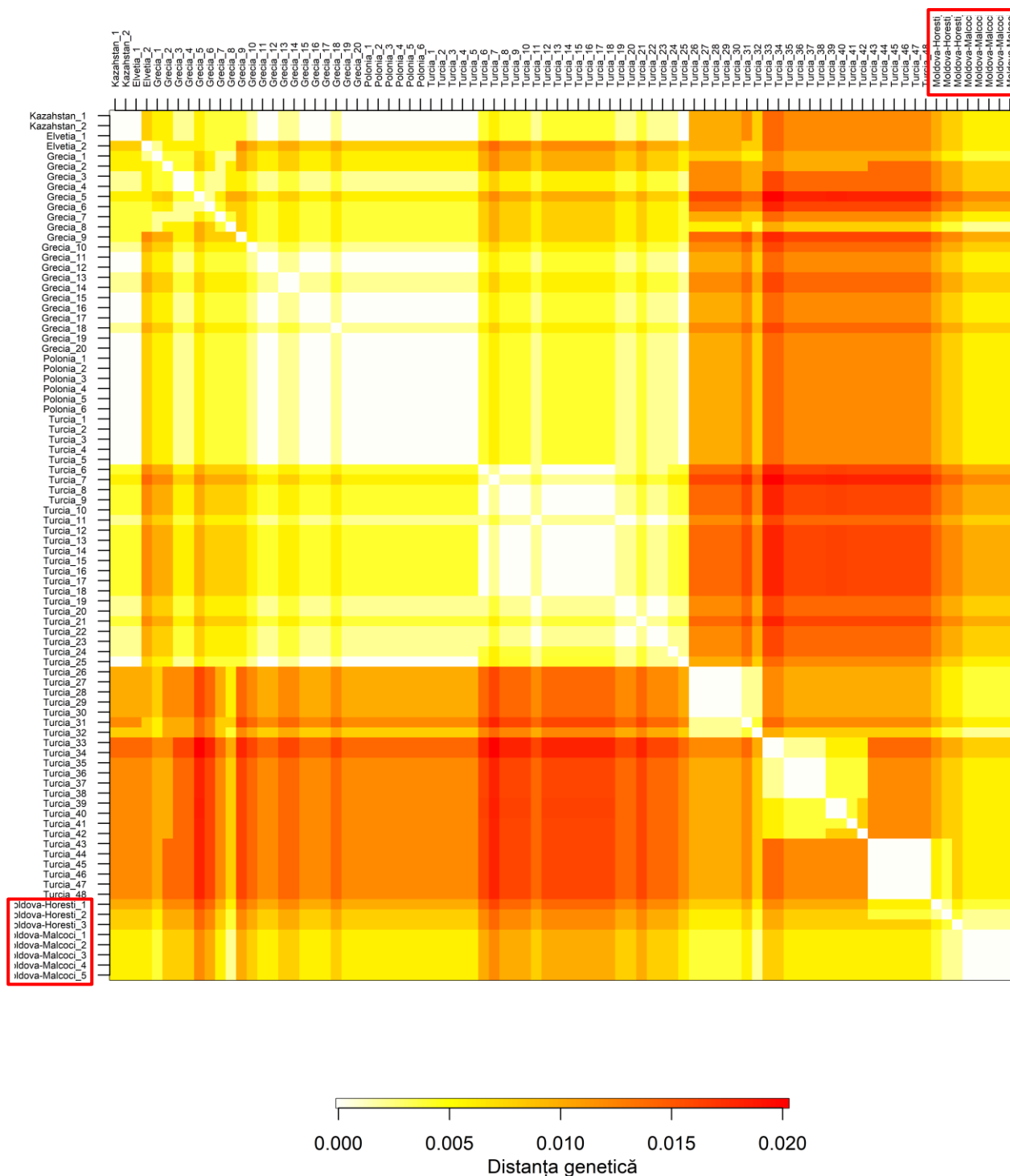


Fig. 4.5. Distanța genetică între 86 secvențe ale genei *CYTB* la specia *M. levis*

Distanța genetică relativ joasă între secvențele de *M. levis* din diferite țări și regiuni poate duce la observația că procesul de speciație la această specie este încă în stadiu incipient. În Fig. 4.6 este prezentat arborele filogenetic ($CCC > 0,9$) al celor 86 secvențe menționate în care se observă că 7 secvențe din R. Moldova formează un cluster comun, în timp ce a 8-a, care provine de la microtine din satul Malcoci prezintă un grad mai mare de variație.

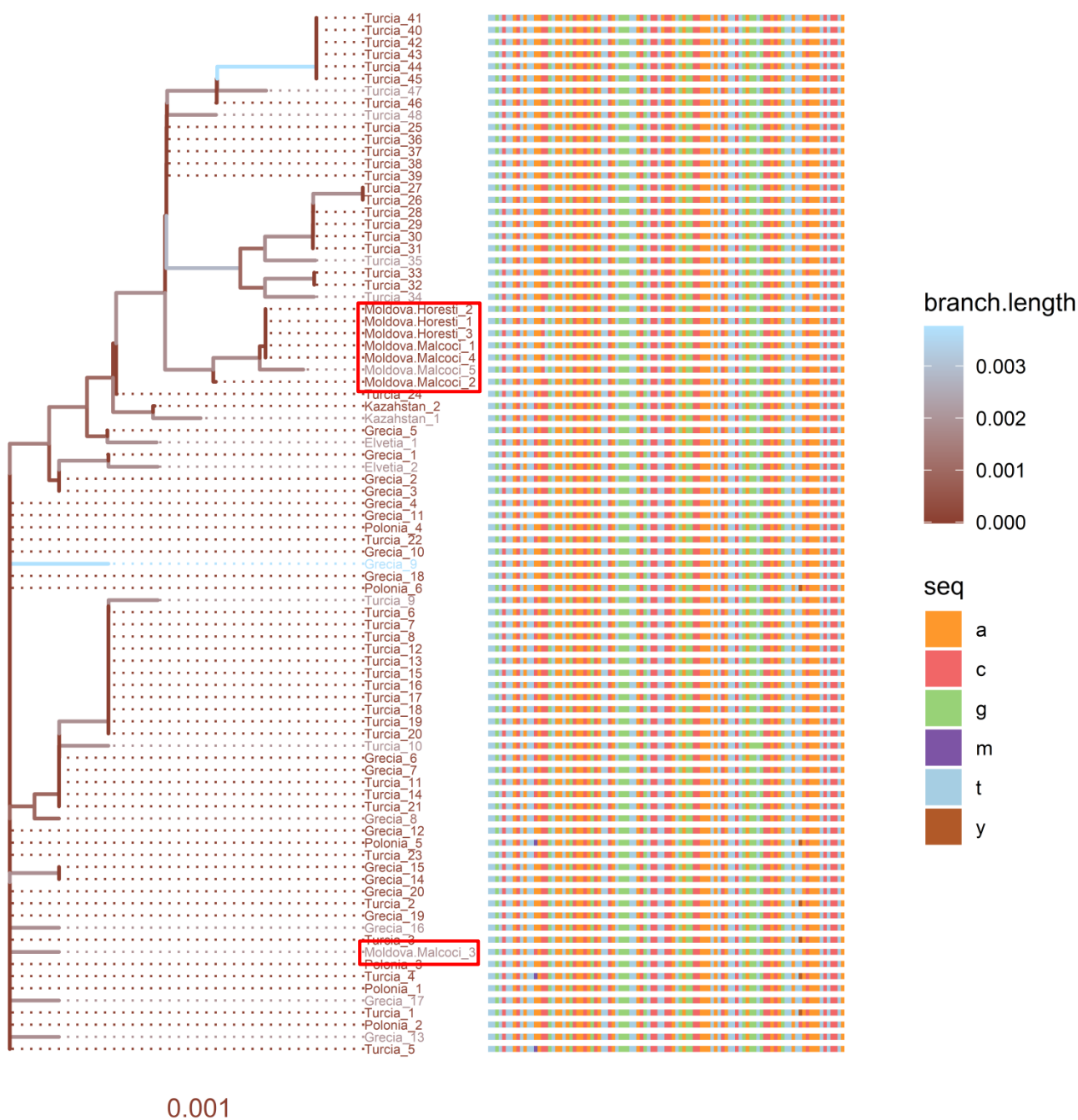


Fig. 4.6. Arborele filogenetic obținut din secvențe ale genei *CYTB* la specia *M. levis*
branch.length – lungimea ramurii; *a* – adenină; *c* – citozină; *g* – guanină; *t* – timină;
m – amino (adenină sau citozină); *y* – pirimidină (citozină sau timină)

Astfel, la speciile de microtine din Malcoci se observă o diversitate genetică mai mare comparativ cu cele colectate în localitatea Horești. Acest lucru poate fi influențat de dimensiunea populațiilor, gradul de migrație între populații, factorii mediului etc. O populație mică și izolată va prezenta un nivel scăzut al diversității, în schimb o populație mare cu rate mari de migrație va avea un flux constant de gene ceea ce va favoriza diferențierea genetică.

Cât privește filogenia obținută în baza secvențelor de *M. arvalis* și *M. levis* din Moldova aceasta este prezentată în Fig. 4.7.

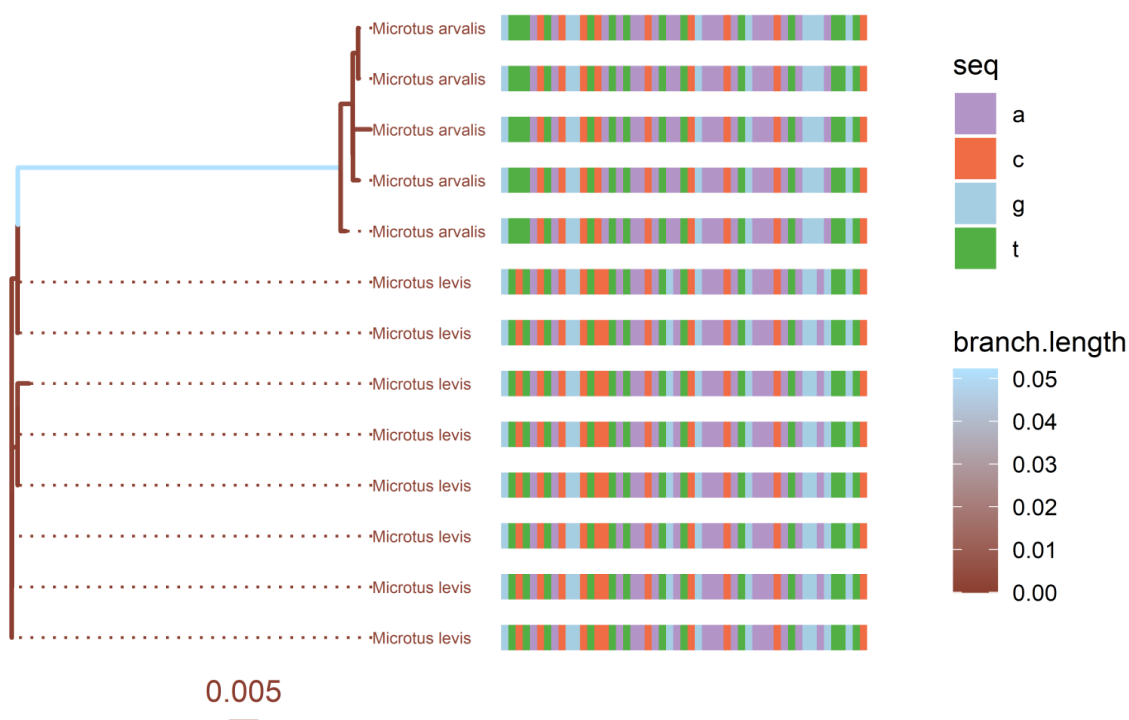


Fig. 4.7. Arborele filogenetic construit în baza secvențelor obținute de la microtine din Republica Moldova

a, c, g, t – adenina, citozina, guanina, timina; *branch.length* – lungimea ramurii

Se observă o diferență mică între reprezentanții aceleiași specii, precum și clusterizarea secvențelor în baza criteriului de specie. Distanța genetică între cele două unități taxonomice precum și alte caracteristici ale filogeniei create sunt prezentate în Tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Caracteristica filogeniei din Fig. 4.7

Parametru	Valoare
Numărul speciilor	2
Numărul secvențelor analizate	13
Dimensiune secvențe	1106 pb
Numărul site-urilor de variație	44
Noduri interne	11
Vârfuri de ramuri	13
Unitatea lungimii de ramură	0,005
Coeficientul cofenetic de corelație	> 0,9
Distanța genetică maximă	0,061
Distanța genetică medie	0,056
Distanța genetică minimă	0,053

Deși speciile *M. arvalis* și *M. levis* nu pot fi diferențiate morfologic, se observă diferențe genetice semnificative la nivelul genei CYTB ale acestora. Aceste diferențe reflectă divergența evolutivă dintre cei doi taxoni, contribuie la delimitarea lor ca entități distincte și pot fi utilizate pentru identificarea indivizilor. De asemenea, cercetarea comparativă a genelor citocromului b poate furniza informații despre fluxul genetic între populațiile de *M. arvalis* și *M. levis*, aceste informații prezentând interes pentru înțelegerea dinamicii populaționale și a interacțiunilor între specii. Ținând cont de faptul că habitatul acestor două specii din Moldova se suprapune și există contact între populații, sunt necesare studii ample de genetică populațională prin intermediul cărora ar putea fi observați indici ai amestecului genetic și a migrației genelor între specii.

Cele 13 secvențe ale genei citocromului b obținute de la microtine din țara noastră au dimensiunea de 1106 pb și au fost secvențiate la Institutul de Ecologie și Evoluție a Universității din Berna, Elveția. Ulterior acestea au fost înregistrate și depozitate pe platforma globală *Barcode of Life Data Systems* în cadrul proiectului *TERVM - Terrestrial vertebrates of the Republic of Moldova* [116].

4.2. Modelarea distribuției speciilor cu utilizarea algoritmului Bioclim

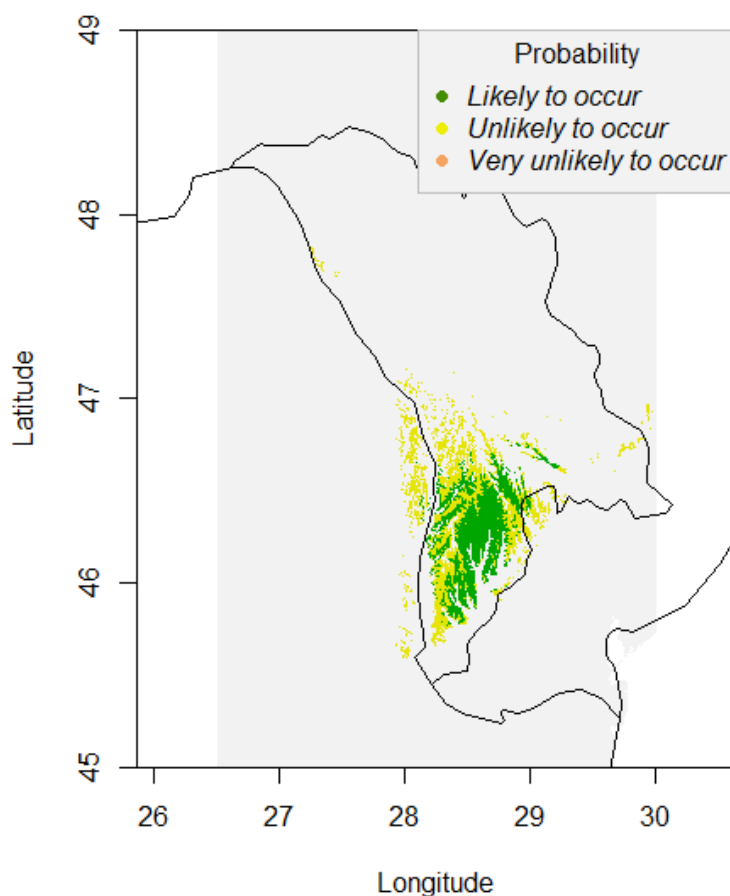
Modelarea distribuției speciilor cu algoritmul Bioclim se bazează pe faptul că factorii climatici și mediul reprezintă determinanți cheie ai prezenței și absenței speciilor într-o anumită regiune. Prin analiza variabilelor bioclimatice și a datelor despre distribuția cunoscută, Bioclim permite crearea hărților cu distribuția potențială. Această abordare este deosebit de importantă în lupta cu pierderea biodiversității și cu extincția speciilor întrucât oferă posibilitatea de a identifica zonele de importanță critică pentru conservarea speciilor rare. În cadrul prezentului studiu a fost aplicat algoritmul Bioclim și au fost create hărți de distribuție pentru unele specii rare de șerpi.

4.2.1. Modelarea distribuției șarpelui cu patru linii răsăritean (*Elaphe sauromates*)

Elaphe sauromates (conform clasificării mai vechi – *Elaphe quatuorlineata sauromates*) este o specie rară inclusă în Cartea Roșie a Moldovei (2015) la categoria **specie critic periclitată (CR)** [25]. Ea a fost diferențiată ca specie separată de complexul *Elaphe quatorlineata* în baza deosebirilor ADN-ului mitocondrial, distanța genetică între fostele subspecii *E. quatorlineata quatorlineata* și *E. quatorlineata sauromates* fiind prea mare pentru reprezentanți ai aceleiași specii. În lume arealul șarpelui cu patru linii răsăritean cuprinde zona de stepă a Europei de Est, Turcia, Transcaucazia și coastele mării Caspice, iar pe teritoriul țării noastre a fost semnalată prezența câtorva populații izolate (com. pers. Vladimir Țurcanu, 2022) și anume:

1. Satul Burlacu, raionul Cahul (46.04 N/ 28.41 E);
2. Satul Răscăieți, r. Ștefan Vodă (46.57 N/ 29.78 E);
3. Rezervația naturală „Suta de movile”, r. Rîșcani (47.79 N/ 27.26 E).

Motivul principal care a dus la reducerea și fragmentarea arealului acestei specii în Moldova este reducerea și degradarea habitatelor [141, 152, 154]. Astfel, în baza datelor despre distribuția cunoscută a șarpelui cu patru linii și a variabilelor bioclimatice asociate, a fost elaborată o hartă (Fig. 4.8) cu privire la potențiala distribuție a acestei specii pe teritoriul Republicii Moldova.



**Fig. 4.8. Modelarea distribuției speciei
Elaphe sauromates pe teritoriul Republicii Moldova**

Din figură se observă că în partea de sud a republicii, în raioanele Cantemir, Comrat, Cahul și Taraclia, există cea mai mare probabilitate de a identifica specimene de șarpe cu patru dungi. În perioada 2018-2023 au fost efectuate mai multe deplasări în teren în această regiune, iar în noiembrie 2022 la marginea traseului de lângă lacul Sărata Nouă (46.5 N; 28.4 E) a fost descoperit un mascul mort, reprezentant al speciei *Elaphe sauromates* (Fig. 4.9).



Fig. 4.9. Specimen de șarpe cu patru linii răsăritean identificat la sudul țării

În Moldova ultima semnalare a prezenței acestei specii în preajma localității învecinate Filipeni datează din anii 1970 (com. pers. Vladimir Țurcanu, 2022). Astfel, pentru prima dată a fost semnalată prezența șarpelui cu patru linii răsăritean în această regiune după mai bine de jumătate de secol. Specia este protejată atât la nivel național, cât și internațional fiind inclusă în Lista Roșie IUCN, Anexa IV a Directivei Habitate, Anexa II a Convenției de la Berna și Cartea Roșie a Europei [25].

4.2.2. Modelarea distribuției viperei de stepă (*Vipera ursinii*)

În ultimele decenii habitatele comunităților de vipere din Republica Moldova au suferit schimbări majore acest lucru sporind necesitatea cercetării și monitorizării stării lor actuale. *Vipera ursinii* este o specie de șarpe veninos răspândită de la nord-estul Bulgariei, sud-estul României și estul Europei până în Kazahstanul de Vest și munții Altai din Mongolia. În Republica Moldova aceasta este inclusă în Cartea Roșie având statut de specie critic periclitată [Critically Endangered (CR)] [25], iar ultima semnalare a prezenței speciei a fost raportată în anul 1964 în regiunea localității Ciucur Mingir, raionul Cimișlia (com. pers. Vladimir Țurcanu, 2022). În prezent această locație este o zonă protejată (Rezervație Naturală), însă se consideră că *V. ursinii* deja a dispărut din aceste locuri și nu mai face parte din herpetofauna țării noastre [69]. În scopul modelării distribuției viperei de stepă pe teritoriul Republicii Moldova în calitate de date de intrare au fost utilizate locații cunoscute ale acestei specii în România (Fig. 4.10).

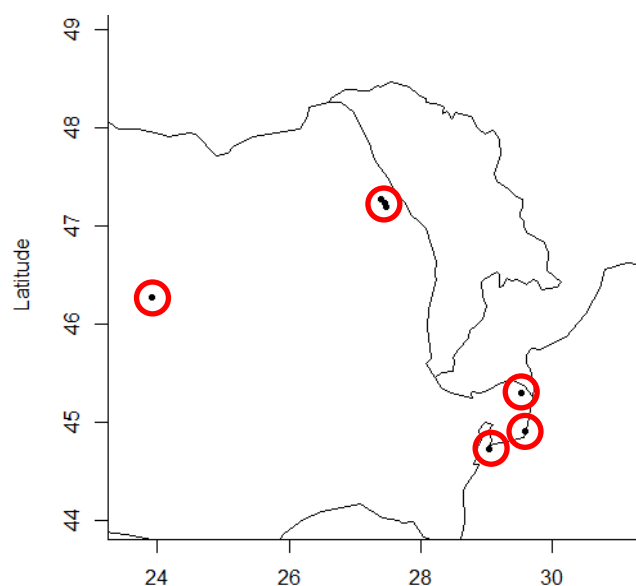


Fig. 4.10. Distribuția viperei de stepă în România în anul 2008 [70]

În baza datelor cu referire la distribuția cunoscută pe teritoriul României în anul 2008 [70] în studiu au fost incluse 7 coordonate geografice asociate următoarelor populații de *V. ursinii*: una în satul Cicârd, județul Alba; trei în Valea lui David, Tăutești și regiunea dintre Românești-Avântu-Ursoaia, județul Iași; alte trei în Delta Dunării (Perișor-Periteașca, Letea și Sfântu Gheorghe), județul Tulcea. În Fig. 4.11 este prezentată harta cu modelarea distribuției viperei de stepă în Republica Moldova, sud-estul României și regiunea Bugeacului din Ucraina.

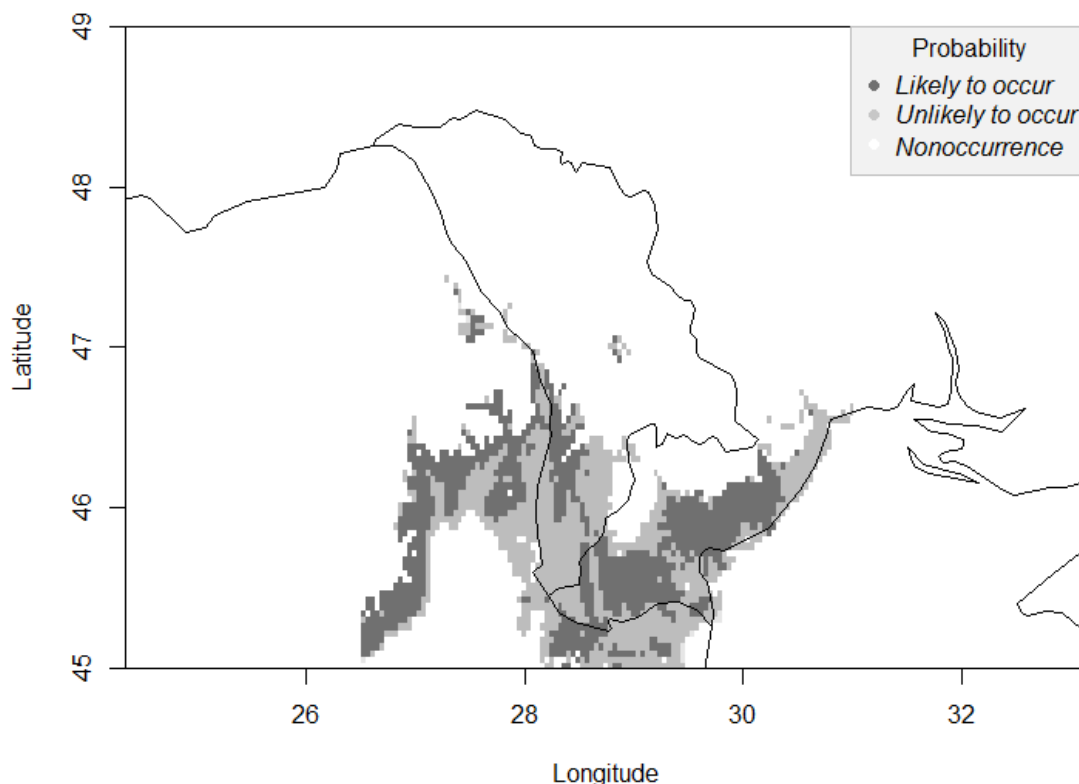


Fig. 4.11. Modelarea distribuției speciei *Vipera ursinii*

Conform hărții create se observă o potențială prezență a speciei în regiunea de sud a R. Moldova în zone cu silvostepă deluroasă. Deși a trecut mai bine de jumătate de secol de la ultima semnalare a prezenței viperei de stepă în această regiune, există totuși probabilitatea ca această specie să nu fi dispărut complet din herpetofauna țării noastre. Cât privește potențiala distribuție pe teritoriul României, conform hărții din Fig. 4.11 care a fost elaborată în anul 2018 [123] s-a observat o probabilitate mare de prezență a *V. ursinii* în mai multe regiuni, printre care și în județul Buzău. În vara anului 2021 o echipă de biologi și fotografi români, în urma semnalării unui localnic, au identificat în premieră acest șarpe în geoparcul „Ținutul Buzăului” (Fig. 4.12) [16].

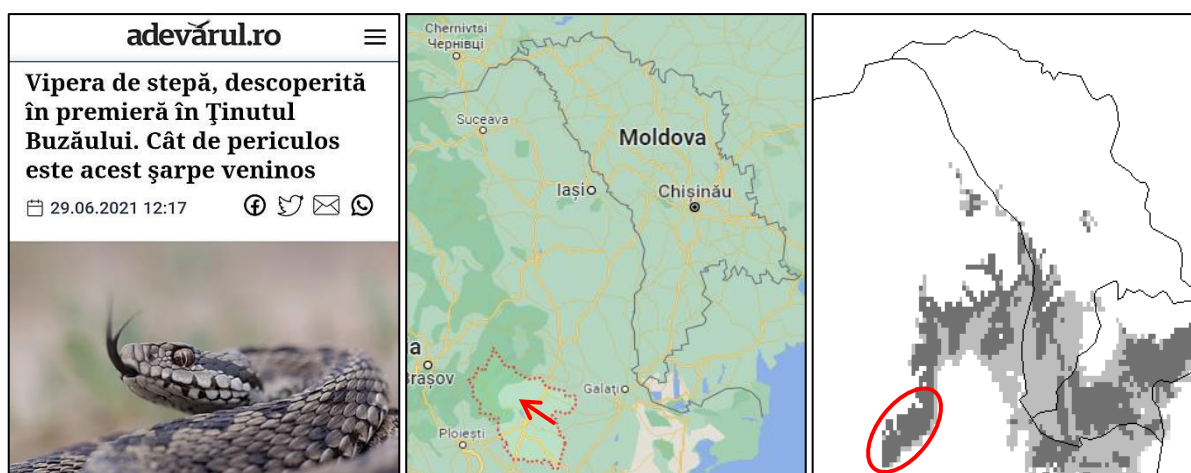


Fig. 4.12. Semnalarea prezenței *V.ursinii* în Ținutul Buzăului (stânga) [16], locația geoparcului Ținutul Buzăului (mijloc) [166], harta cu modelarea distribuției (dreapta)

În prezent vipera de stepă este considerată una dintre cele mai amenințate specii de șerpi din Europa și este ocrotită de lege. Specia este inclusă în: Anexa II a Directivei Habitats, Anexa I a CITES (Convention on International Trade in Endangered Species), Anexa II a Convenției de la Berna și Cartea Roșie a Europei [25].

4.2.3. Distribuția morfelor de *Vipera berus* în funcție de altitudine

Vipera comună (*Vipera berus*) este un șarpe veninos relativ mic răspândit în Europa și Asia. În Republica Moldova poate fi întâlnită în zonele împădurite din nordul țării și în regiunea Codrilor, preferând însă și anumite sectoare deschise cu arbuști. În prezent, statutul taxonomic al acestei specii este discutabil, întrucât unii cercetători susțin că subspecia *Vipera berus nikolskii* (care face parte din fauna Republicii Moldova) ar putea fi de fapt o specie separată – *Vipera nikolskii* (com. pers. V. Țurcanu, 2022). În cadrul speciei există trei variații de culoare numite morfe: melanică, brun-roșietică și cenușie sau gri (Fig. 4.13).



Fig. 4.13. *Vipera berus* melanică (stânga) [168], brun-roșietică (mijloc) și cenușie (dreapta)

Deși nu au fost identificate cauze exacte ale variațiilor de culoare la această specie, conform anumitor cercetători (declarație personală a lui Vladimir Țurcanu, 2018) ar putea exista o variație a pigmentației indivizilor în funcție de altitudine sau chiar sexul indivizilor. Spre exemplu, în timpul sezonului de împerechere masculii prezintă adesea culori mai strălucitoare, mai intense, cum ar fi pete roșii sau chiar portocalii pe spate. Aceste culori vii sunt parte a ritualurilor de curtare, utilizate de masculii pentru a atrage femelele. După această perioadă, culorile revin la nuanțele obișnuite ale specimenului. În cadrul acestei etape a cercetărilor ne-am propus determinarea corelației dintre tipul variației de culoare care predomină în populații și altitudinea habitatului. În acest scop au fost analizate 8 populații de viperă comună din Moldova (Tabelul 4.3) și evaluată înălțimea locului în care acestea habitează (Fig. 4.14).

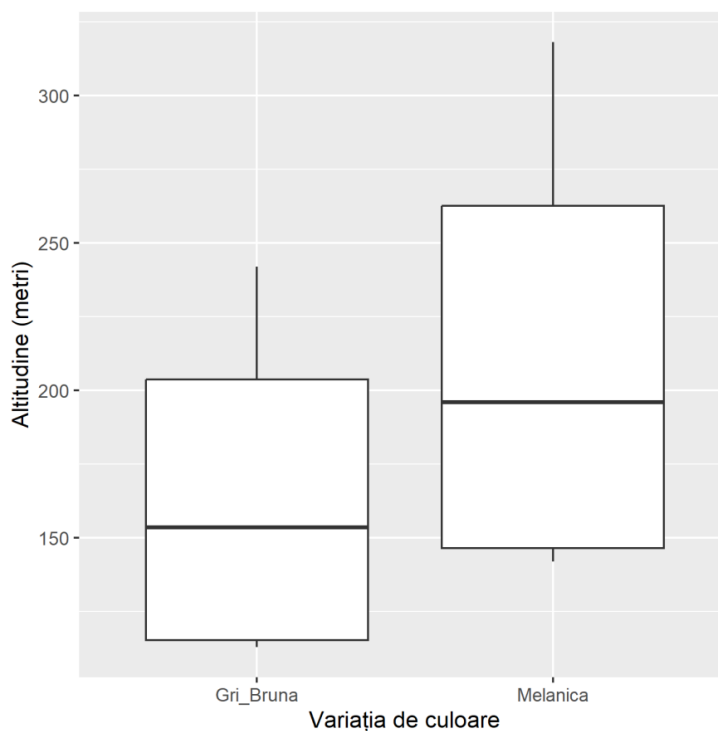


Fig. 4.14. Boxplotul corelației dintre variația de culoare predominantă în populații și altitudinea habitatului

Tabelul 4.3. Coordonatele geografice ale populațiilor de *Vipera berus* din Moldova

Variația de culoare predominantă	Localitatea	Latitudine	Longitudine
Melanică	Bălănești, Nisporeni	47.21	28.07
	Mereșeni, Hîncești	46.80	28.54
	Olișcani, Șoldănești	47.79	28.71
	Lozova, Strășeni	47.13	28.39
Gri și brun-roșietică	Rudi-Arionești, Soroca	48.33	27.90
	Tătărauca veche, Soroca	48.30	27.98
	Iagorlîc, Dubăsari	47.22	29.09
	Răzeni, Ialoveni	46.77	28.90

S-a obținut un coeficient de corelație de 0,35, iar distribuția a fost reprezentată grafic pe hărți cu scală de altitudine (Fig. 4.15).

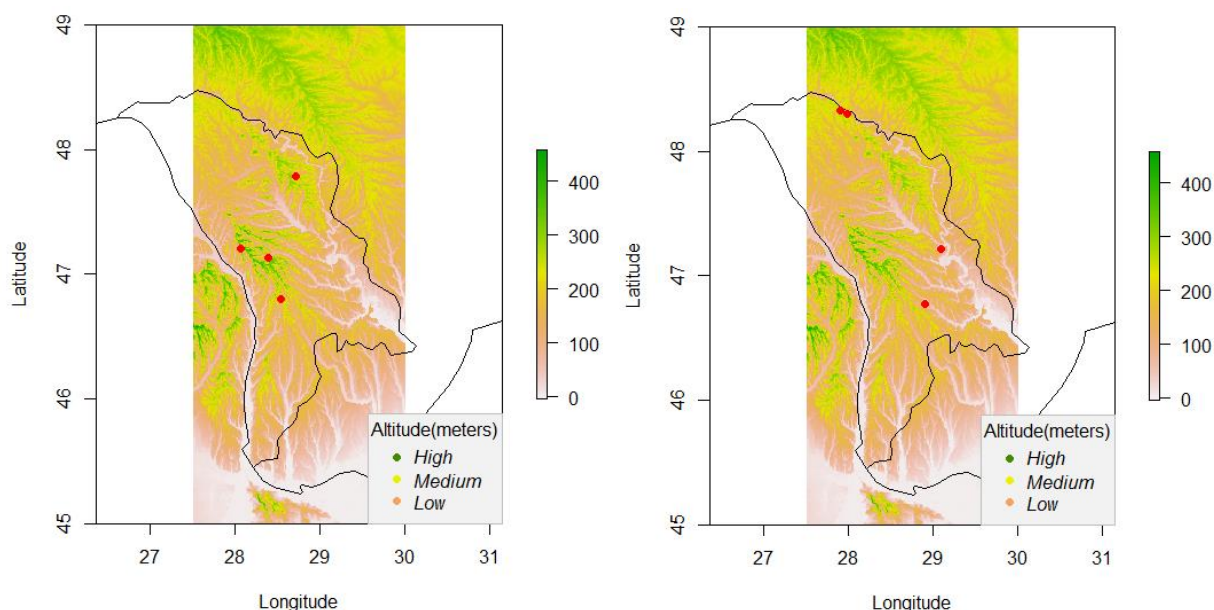


Fig. 4.15. Distribuția morfelor de *Vipera berus* în funcție de altitudine:

stânga – populații în care predomină frecvența melaniștilor;

dreapta – populații în care predomină frecvența morfelor gri și roșietice

Se observă că în locațiile deluroase precum este dealul de la Bălănești se întâlnesc populații majoritar melaniste, iar în zonele cu altitudine mai joasă predomină specimene cu variație de culoare gri și brun-roșietică. Astfel, colorația diferită a specimenelor viperei comune ca și în cazul variației altor caracteristici ale reptilelor [121, 124] poate reflecta strategia de

adaptare a populațiilor la factorii biogeografici și de mediu. Variațiile de culoare în funcție de altitudine la *Vipera berus* ar putea fi un exemplu clar de variabilitate. Aceste modificări cromatice permit șerpilor să se camufleze mai bine în mediul lor specific, crescându-și astfel șansele de a supraviețui și de a se reproduce cu succes.

Utilizarea algoritmilor informatici pentru studierea diversității speciilor reprezintă o abordare complexă care a devenit esențială în eforturile de protejare și restabilire a diversității biologice pe Terra. Întrebările fundamentale legate de genetica speciilor și distribuția acestora permit identificarea problemelor și soluțiilor legate de supraviețuirea populațiilor, anticiparea schimbărilor și stabilirea ariilor critice pentru conservare într-un context în care presiunile asupra mediului și asupra resurselor naturale sunt într-o creștere constantă. Fiecare specie poartă propriile caracteristici unice iar diversitatea vieții pe pământ este cheia adaptabilității și supraviețuirii pe termen lung a speciilor în mediul lor natural.

4.3. Concluzii la capitolul 4

1. În premieră a fost secvențiată și efectuată analiza filogenetică a genei CYTB pentru 13 specimene de microtine din Republica Moldova. În baza studierii relațiilor filogenetice dintre secvențe a fost demonstrat că indivizii studiați de *Microtus arvalis* fac parte din linia filogenetică estică. Toate barcodurile moleculare ale specimenelor din Moldova au fost depozitate pe platforma globală *BOLD Systems*.
2. Modelarea distribuției unor specii rare a permis crearea hărților cu distribuția potențială și identificarea în regiunea localității Sărata Nouă a unei populații de șarpe cu patru linii răsăritean care ultima dată a fost atestată în această regiune cu mai bine de jumătate de secol în urmă. De asemenea la vipera comună (*Vipera berus*) a fost descrisă corelația dintre variațiile de culoare care predomină în populații și altitudinea habitatului.
3. Utilizarea limbajului R pentru analiza filogenetică și modelarea distribuției speciilor este o abordare fiabilă care contribuie la eficientizarea monitorizării diversității speciilor de vertebrate terestre.

CONCLUZII GENERALE

Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat „**Abordări bioinformatică în cercetarea diversității vertebratelor terestre în Republica Moldova**” au condus la formularea următoarelor concluzii generale:

1. Au fost identificate 174 specii de amfibieni, reptile, păsări și mamifere care fac parte din fauna de vertebrate terestre a Republicii Moldova (337 specii) și au genom mitocondrial secvențiat, inclus în baza de date globală *RefSeq*.
2. A fost efectuată validarea *in silico* a noi primeri pentru metabarcodarea celor 174 specii și elaborată o bază de date locală care include date moleculare și taxonomice asociate acestora. În limita grupului de specii studiat, noii primeri au demonstrat performanțe superioare în comparație cu primerii universali pentru metabarcodarea vertebratelor.
3. A fost evaluată *in vitro* acoperirea taxonomică și dimensiunea metabarcodurilor asociate noilor primeri fiind obținute benzi electroforetice clare fără formare de dimeri sau produși secundari. Dimensiunea ampliconilor obținuți *in vitro* a coincis cu cea a ampliconilor generați *in silico* fiind amplificat ADN-ul a 25 specii din 26 analizate.
4. Pentru prima dată în Republica Moldova a fost testată *in silico* și *in vitro* o metodă moleculară de genotipare și diferențiere a hibrizilor de mistreț în baza alelelor genei *MC1R*. Secvențele alelice au fost amplificate, fragmentate cu enzime de restricție și analizate în câmp electroforetic. S-au optimizat protocoalele experimentale iar fluxul de lucru a fost adaptat la condițiile laboratorului. Metoda a fost implementată în cadrul laboratorului Vertebrate Terestre al Institutului de Zoologie pentru genotiparea speciei *Sus scrofa* și se aplică în cercetări efectuate în cadrul unor rezervații naturale din Moldova (Anexa 4).
5. În premieră, a fost secvențiată și efectuată analiza filogenetică a genei *CYTB* pentru 13 specimene de microtine din Republica Moldova. În baza studierii relațiilor filogenetice dintre secvențe a fost demonstrat că indivizii studiați de *Microtus arvalis* fac parte din linia filogenetică estică. Toate barcodurile moleculare ale specimenelor din Moldova au fost depozitate pe platforma globală *BOLD Systems* (Anexa 3).
6. Modelarea distribuției unor specii rare de vertebrate terestre a permis crearea hărților cu distribuția potențială și identificarea în regiunea localității Sărata Nouă a unei populații de șarpe cu patru linii răsăritean (*Elaphe sauromates*) care ultima dată a fost atestată în această regiune cu mai bine de jumătate de secol în urmă.

Rezultatele științifice prezentate în lucrare au fost aprobate la următoarele foruri științifice naționale și internaționale: Simpozionul Internațional *Biologia și Dezvoltarea Durabilă*, Ediția 15, 2017, Bacău, România; *The Ninth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum*, 2017, București, România; Conferința Științifică Aniversară 60 de ani de muzeologie în domeniul științelor naturii la Muzeul Județean Mureș, 2018, Târgu Mureș, România; *The Tenth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum*, 2018, București, România; International Symposium *Functional ecology of animals*, 2018, Chișinău, Moldova; Conferința științifico-practică cu participare internațională *Биоразнообразие и Рациональное Использование Природных Ресурсов*, 2018, Махачкала, Rusia; Simpozionul Internațional *Biologia și Dezvoltarea Durabilă*, Ediția 17, 2019, Bacău, România; International Conference of Zoologists *Sustainable use and protection of animal world in the context of climate change*, 2021, Chișinău, Moldova; Conferința națională cu participare internațională *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*, 2022, Chișinău, Moldova; Conferința științifico-practică internațională *Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă*, 2022, Chișinău, Moldova; Conferința națională cu participare internațională *Natural sciences in the dialogue of generations*, 2023, Chișinău, Moldova; Conferința națională cu participare internațională *One Health Approach - achievements and challenges*, Section Biodiversity and Health – perspective of interconnection, 2023, Chișinău, Moldova.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Aplicarea instrumentelor bioinformaticice și a tehnicilor de biologie moleculară descrise în lucrare pentru identificarea taxonomică și cercetarea diversității speciilor de vertebrate terestre. Utilizarea liniilor de cod a limbajului R pentru testarea primerilor, analiza filogenetică, modelarea distribuției speciilor, s.a. Punerea în practică atât a metodelor moleculare simple, low-cost (PCR, RFLP-PCR) cât și a protocoalelor de secvențiere care presupun costuri mai mari.
2. Evaluarea populațiilor de mistreț din Republica Moldova și diferențierea între hibrizi și liniile pure în baza metodei de genotipare descrisă în lucrare.
3. Utilizarea în experimente de metabarcodare a primerilor obținuți în cadrul studiului. Se recomandă crearea librăriilor genomice cu ajutorul instrumentului *Bento Lab* și testarea eficienței tehnologiei de secvențiere de generația a treia în cercetarea ADN-ului de mediu.
4. Continuarea înregistrării barcodurilor și metabarcodurilor speciilor de vertebrate terestre din Moldova în baza de date *BOLD Systems* în cadrul proiectului *TERVM - Terrestrial vertebrates of the Republic of Moldova*.
5. Studiarea metodelor de colectare și procesare a probelor de mediu din sol, apă, aer, sedimente, materii fecale etc.
6. Combinarea analizei ADN-ului de mediu cu modelarea distribuției speciilor. Spre exemplu se pot preleva probe de ADN din locațiile geografice în care există o probabilitate înaltă de a întâlni o anumită specie și invers - locațiile geografice în care a fost detectat ADN-ul unei specii pot fi utilizate în calitate de date de intrare pentru modelarea distribuției.

BIBLIOGRAFIE

Surse în limbile română și engleză

1. Alatawi, A.S. et al. Modelling terrestrial reptile species richness, distributions and habitat suitability in Saudi Arabia. [online]. *Journal of Arid Environments*. iulie 2020, vol 178, 104153. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104153>.
2. Alfano, N. et al. Non-invasive surveys of mammalian viruses using environmental DNA [online]. *bioRxiv*, 2020. 009993. Disponibil: <https://doi.org/10.1101/2020.03.26.009993>.
3. alpine L-Ld., ROBITaxonomy: Metabarcoding data biodiversity analysis_. R package version 0.1. [online]. 2012. Disponibil: <https://git.metabarcoding.org/obitools/ROBITaxonomy>.
4. alpine L-Ld., ROBITools: Metabarcoding data biodiversity analysis_. R package version 0.1. [online]. 2012. Disponibil: <https://git.metabarcoding.org/obitools/ROBITools>.
5. alpine L-Ld., ROBIBarcodes: Metabarcoding barcode database_. R package version 0.1. [online]. 2013. Disponibil: <https://git.metabarcoding.org/obitools/ROBIBarcodes>.
6. Álvarez, Y. et al. Brief communication. Mitochondrial DNA haplotyping of *Testudo graeca* on both continental sides of the Straits of Gibraltar. *Journal of Heredity*. ianuarie 2000, 91(1), pp. 39–41.
7. Arif, I.A. et al. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Anim Biodiv Conserv*. 2009, 32(1), pp. 9–17.
8. Artiomov, L., Frunze, N. Considerații privind potențialul biotehnic al microbiomului solului pentru dezvoltarea agriculturii durabile. In: *Modern Biotechnologies – Solutions to the Challenges of the Contemporary World Symposium Proceedings* [online]. Institute of Microbiology and Biotechnology, Chișinău, 2021 [citat 1 februarie 2023]. ISBN 978-9975-3498-7-1. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/132250.
9. Bass, D. et al. Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. *Trends in Parasitology*. octombrie 2015, 31(10), pp. 499–513.
10. Becker, O. et al. maps: Draw Geographical Maps. R package version 3.4.1 [online]. 2022. Disponibil: <https://CRAN.R-project.org/package=maps>.
11. Bidlack, A.L. et al. Characterization of a western North American carnivore community using PCR–RFLP of cytochrome b obtained from fecal samples. *Conserv Genet*. 24 octombrie 2007, 8(6), pp. 1511.
12. Bivand, R. et al. rgdal: Bindings for the „Geospatial” Data Abstraction Library_. R package version 1.6-5 [online]. 2023. Disponibil: <https://CRAN.R-project.org/package=rgdal>.

13. Bodenhofer, U. et al. msa: an R package for multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 31(24), 3997-9999 [online]. 2015. pp. 3997–3999, Disponibil: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv494>.
14. Boyer, F. et al. OBITOOLS : a UNIX -inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour.* ianuarie 2016, 16(1), pp. 176–82.
15. Budeanu, O. et al. Medicinal plant material identification by PCR primer design. *Genetica și fiziologia rezistenței plantelor*. Chisinău, 2011, pp. 92, ISBN 978-9975-78-994-3.
16. Bunila, I. Vipera de stepă, descoperită în premieră în Ținutul Buzăului. Cât de periculos este acest șarpe veninos, foto Iancu, M. adevarul.ro, Ținutul Buzăului [online]. [citat 12 februarie 2023]. Disponibil: <https://adevarul.ro/stiri-locale/buzau/vipera-de-stepa-descoperita-in-premiera-in-2104569.html>.
17. Burney, D. et al. Fifty millennia of catastrophic extinctions after human contact. *Trends in Ecology & Evolution*. iulie 2005, 20(7), pp. 395–401.
18. Burton, A.S. et al. Off Earth Identification of Bacterial Populations Using 16S rDNA Nanopore Sequencing. *Genes*. 9 ianuarie 2020, 11(1), pp. 76.
19. CBOL Plant Working Group1, Hollingsworth, P.M. et al. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 4 august 2009, 106(31), pp. 12794–7.
20. ÇetiNtürk, D. et al. Inferring phylogenetic relationships in the common vole (*Microtus arvalis*) based on mitochondrial and nuclear sequence diversities. *Turk J Zool.* 24 martie 2021, 45(2), pp. 117–30. Disponibil: <https://doi.org/10.3906/zoo-2008-3>.
21. Chang, J.J.M. et al. Takeaways from Mobile DNA Barcoding with BentoLab and MinION. *Genes*. 24 septembrie 2020, 11(10), pp. 1121. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/genes11101121>.
22. Chapman, A. D. Ecological Niche Modeling - BIOCLIM. In: *Key Innovations in Biodiversity Informatics*, Indaituba, Brazil, 2002.
23. Clark, K. et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 4 ianuarie 2016, 44(D1), pp. D67–72. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>.
24. Coghlan, M.L. et al. Metabarcoding avian diets at airports: implications for birdstrike hazard management planning. *Investig Genet.* decembrie 2013, 4(1), pp. 27. Disponibil: <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-27>.
25. Comisia Națională a Cărții Roșii. Cartea Roșie a Republicii Moldova [online]. *Î.E.P. Știința, (Combinatul Poligr)*, 2015. pp. 492. Disponibil: https://zoology.md/sites/default/files/inline-files/Cartea%20Rosie_Partea%20II%20Animale_0.pdf.

26. Da Silva Neto, J.G. et al. Integrating species distribution and occupancy modeling to study hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) occurrence based on eDNA surveys. *Biological Conservation*. noiembrie 2020, 251:108787. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108787>.
27. De Barba, M. et al. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Mol Ecol Resour*. martie 2014, 14(2), pp. 306. Disponibil: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12188>.
28. Deagle, B.E. et al. DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biol Lett*. septembrie 2014, 10(9), 20140562. Disponibil: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0562>.
29. Dejean, T. et al. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*: Alien invasive species detection using eDNA. *Journal of Applied Ecology*. august 2012, 49(4), pp. 953. Disponibil: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x>.
30. Demir, E. et al. Mitochondrial DNA diversity of D-loop region in three native Turkish cattle breeds. *Arch Anim Breed*. 24 ianuarie 2023, 66(1), pp. 31–40.
31. Diniz-Filho, J.A.F. et al. Mantel test in population genetics. *Genet Mol Biol*. 2013, 36(4), pp. 475–85. Disponibil: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>.
32. Douglas, N. et al. fields: Tools for spatial data. R package version 14.1 [online]. 2021. Disponibil: <https://github.com/dnychka/fieldsRPackage>.
33. Duyke, A.V. et al. The future is now, science in a spoonful of snow. Using Edna to monitor a polar bear (*Ursus maritimus*) population in the Chukchi Sea. In: *22nd Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*. Halifax, Canada, 2017 [citată 4 martie 2023], Disponibil: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.35809.40809>.
34. Dzialuk, A. et al. High domestic pig contribution to the local gene pool of free-living European wild boar: a case study in Poland. *Mamm Res*. ianuarie 2018, 63(1), pp. 65–71.
35. Egeter, B. et al. Challenges for assessing vertebrate diversity in turbid Saharan water-bodies using environmental DNA. Pochon X, editor. *Genome*. noiembrie 2018, 61(11), pp. 807–14.
36. Elith, J. H. et al. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*. aprilie 2006, 29(2), pp. 129–51.
37. Elith, J. et al. Species Distribution Models: Ecological Explanation and Prediction Across Space and Time. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 1 decembrie 2009, 40(1), pp. 677–97.

38. Ermakov, O.A. et al. Implications of Hybridization, NUMTs, and Overlooked Diversity for DNA Barcoding of Eurasian Ground Squirrels. Boykin LM, editor. *PLoS ONE*. 24 ianuarie 2015, 10(1), e0117201.
39. Ficetola, G. et al. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*. 2010, 11(1), pp. 434. Disponibil: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-434>.
40. Ficetola, G.F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett*. 23 august 2008, 4(4), pp. 423–5.
41. Fick, S.E., Hijmans R.J. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol*. octombrie 2017, 37(12), pp. 4302–15. Disponibil: <https://www.worldclim.org/data/worldclim21.html>.
42. Fleischer, R.C. et al. Mid-Pleistocene divergence of Cuban and North American ivory-billed woodpeckers. *Biol Lett*. 22 septembrie 2006, 2(3), pp. 466–9.
43. Frantz, A.C. et al. Genetic evidence for introgression between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Belgium and Luxembourg: a comparative approach with multiple marker systems: Introgression Between Pigs and Boars. *Biol J Linn Soc Lond*. septembrie 2013, 110(1), pp. 104–15.
44. Gentleman, R.C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004, 5(10), R80. Disponibil: <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>.
45. Giorgi, F.M. et al. The R Language: An Engine for Bioinformatics and Data Science. *Life*. 27 aprilie 2022, 12(5), pp. 648.
46. Giovannoni, S.J. et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. mai 1990, 345(6270), pp. 60–3. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/345060a0>.
47. GNU P. Ubuntu. Free Software Foundation. Unix shell program, [online] 2007. Disponibil: <https://ubuntu.com/>.
48. Goldberg, C.S. et al. Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. editor. *PLoS ONE*. 26 iulie 2011, 6(7), e22746. Disponibil: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>.
49. Gomes, G.P. et al. Combinations of distance measures and clustering algorithms in pepper germplasm characterization. *Hortic Bras*. iunie 2019, 37(2), pp. 172–9.
50. Goossens, B. et al. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Mol Ecol*. septembrie 1998, 7(9), pp. 1237–41.

51. Haynes, S. et al. Phylogeography of the common vole (*Microtus arvalis*) with particular emphasis on the colonization of the Orkney archipelago. *Mol Ecol.* aprilie 2003, 12(4), pp. 951–6. Disponibil: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01795.x>.
52. Hebert, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B.* 7 februarie 2003, 270(1512), pp. 313–21.
53. Heibl, C. PHYLOCH: R language tree plotting tools and interfaces to diverse phylogenetic software packages [online]. 2008. Disponibil: <http://www.christophheibl.de/Rpackages.html>.
54. Hijmans, R. raster: Geographic Data Analysis and Modeling_. R package version 3.6-14 [online]. 2023. Disponibil: <https://CRAN.R-project.org/package=raster>.
55. Hijmans, R.J. et al. dismo: Species Distribution Modeling_. R package version 1.3-9 [online]. 2022. Disponibil: <https://CRAN.R-project.org/package=dismo>.
56. Hijmans, R.J., Elith, J. Species distribution modeling with R. [online] 2017. Disponibil: <http://cran.nexr.com/web/packages/dismo/vignettes/sdm.pdf>.
57. Huber, W. et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods.* februarie 2015, 12(2), pp. 115–21.
58. Jerde, C.L. et al. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA: eDNA surveillance of rare aquatic species. *Conservation Letters.* aprilie 2011, 4(2), pp. 150–7.
59. Ji, Y. et al. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. Holyoak M, editor. *Ecol Lett.* octombrie 2013, 16(10), pp. 1245–57.
60. Johnson, W.E., O’Brien, S.J. Phylogenetic reconstruction of the felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *J Mol Evol.* ianuarie 1997, 44(S1), S98–116.
61. Johnston, A.D. et al. PrimerROC: accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis. *Sci Rep.* 18 ianuarie 2019, 9(1), pp. 209.
62. Jombart, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405 [online]. 2008. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>.
63. José, H. N. Modeling Species Distributions in R [online]. R Functions. [citad 13 februarie 2023]. Disponibil: <https://rfunctions.blogspot.com/2014/05/modeling-species-distributions-in-r.html>.
64. Kanz, C. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research.* 17 decembrie 2005, 33 (Database issue), D29–33. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/nar/gki098>.
65. Kijas, J.M.H. et al. Melanocortin Receptor 1 (MC1R) Mutations and Coat Color in Pigs. *Genetics.* 1 noiembrie 1998, 150(3), pp. 1177–85.

66. Kitano, T. et al. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *Int J Legal Med.* 21 august 2007, 121(5), pp. 423–7.
67. Koseniuk, A. et al.. Differentiating Pigs from Wild Boars Based on NR6A1 and MC1R Gene Polymorphisms. *Animals.* 17 iulie 2021, 11(7), pp. 2123.
68. Kwok, S. et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl Acids Res.* 1990, 18(4), pp. 999–1005.
69. László, K., et al. An updated overview of the distribution of the moldaviansteppe viper (*Vipera ursinii moldavica* Nilson, Andrén et Joger, 1993). *Russian Journal of Herpetology.* 2003, Vol. 10, pp. 199–206.
70. László, K., Zamfirescu, Ș. R. *Vipera* (Acridophaga) *ursinii* in Romania: historical and present distribution. *North-Western Journal of Zoology* 44(2). 2008, pp. 339–59.
71. Lebreton, J.D. The impact of global change on terrestrial vertebrates. *Comptes Rendus Biologies.* 1 mai 2011, 334(5), pp. 360–9.
72. Leempoel, K. et al. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proc R Soc B.* 15 ianuarie 2020, 287(1918), 20192353.
73. Lorenzini, R. et al. Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pigs and their recent hybrids for forensic purposes. *Sci Rep.* 21 februarie 2020, 10(1), pp. 3188. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59644-6>.
74. Lozano Mojica, J.D. et al. Applications of eDNA Metabarcoding for Vertebrate Diversity Studies in Northern Colombian Water Bodies. *Front Ecol Evol.* 25 ianuarie 2021, 8:617948.
75. Lynggaard, C. et al. Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Current Biology.* februarie 2022, 32(3), pp. 701-707.e5.
76. Mangul, S. Project: Developing efficient and scalable bioinformatics methods and databases to analyze the adaptive immune repertoires of vertebrate species. University of Southern California, United States [online]. 2021-2026 [citat 3 februarie 2023], Disponibil: <https://grantome.com/grant/NSF/DBI-2041984>.
77. Martea, R. Elaborarea primerilor specifice pentru studierea genelor implicate în sinteza compușilor din uleiul esențial de salvia *Sclarea* L. In: *Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor*, Chișinău, Ediția 5. 2014, pp. 121–5.
78. Matthias, L. et al. Improving ecological surveys for the detection of cryptic, fossorial snakes using eDNA on and under artificial cover objects. *Ecological Indicators.* noiembrie 2021, 131:108187. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108187>.

79. Menning, D.M. et al. eDNA Metabarcoding Analyses of Diet in Yellow-Billed Loons of Northern Alaska. *Waterbirds* [online]. 8 februarie 2023 [citat 12 ianuarie 2023], 45(2). pp. 159-166. Disponibil: <https://doi.org/10.1675/063.045.0206>.
80. Mikheyev, A.S. et al. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Mol Ecol Resour.* noiembrie 2014, 14(6), pp. 1097–102.
81. Mitin, V., Mitina, I. Some aspects of primer design for Real Time PCR with SYBR GREEN as a dye. *Journal of Engineering Science.* 15 decembrie 2020 [citat 3 februarie 2023], XXVII (4) pp. 191-196. Disponibil: <https://zenodo.org/record/4296193>.
82. Moldovan, A, et al. DNA barcoding technique: application and perspectives in beetles identification. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții* [online]. martie 2022 [citat 31 ianuarie 2023], 2(344). pp. 51-62. Disponibil: <http://bsl.asm.md/article/id/152751>.
83. Muha, T.P. et al. Using Environmental DNA to Improve Species Distribution Models for Freshwater Invaders. *Front Ecol Evol.* 7 decembrie 2017, 5:158. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00158>.
84. Munteanu. V. et al. Subfuncționalizarea factorilor transcripționali în procesul evoluției la vertebrate. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științele vieții.* 2008, 2(305), pp. 74–80. ISSN 1857-064X.
85. Neice, A.A. et al. An eDNA diagnostic test to detect a rare, secretive marsh bird. *Global Ecology and Conservation.* iunie 2021, 27:e01529. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01529>.
86. New England Biolabs. NEB Tm Calculator [online]. [citat 8 februarie 2023]. Disponibil: <https://tmcaculator.neb.com/#!/main>.
87. Nistoreanu, V., **Sitnic, V.** et al. Diversitatea și ecologia speciilor de mamifere din Rezervația științifică „Pădurea Domnească”. *Akademios.* iunie 2023, 1(68), pp. 22–32. ISSN 1857-0461. Disponibil: <https://doi.org/10.52673/18570461.23.1-68.02>.
88. Nixon, K.C. Phylogeny. *Encyclopedia of Biodiversity.* Elsevier [online]. 2001 [citat 15 martie 2023]. p. 16–23. Disponibil: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847195001088>.
89. Nordstrom, B. et al. A review of applications of environmental DNA for reptile conservation and management. *Ecology and Evolution* [online]. iunie 2022 [citat 10 mai 2023], 12(6). Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ece3.8995>.
90. Ogram, A. et al. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods.* decembrie 1987, 7(2–3), pp. 57–66.

91. O’Leary, N.A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 4 ianuarie 2016, 44(D1), D733–45. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>.
92. Pagès, H. et al. Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. R package version 2.66.0 [online]. 2022. Disponibil: <https://bioconductor.org/packages/Biostrings>.
93. Paradis, E., Schliep, K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35, 526-528. [online]. 2019. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>.
94. Pharmawati, M., Yuni, L. Sources of DNA and amplification of COI gene of Changeable Hawk-eagle Nisaetus cirrhatus (J.F. Gmelin 1788). In: *Conservation Network International Symposium*. Bali, Indonesia. 10-11 October 2019, 590(1), 012010. Disponibil: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/590/1/012010>.
95. Phillips, S.J. et al. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. ianuarie 2006, 190(3–4), pp. 231–59.
96. Porco, D., Busmachiu, G. et al. Cryptic Diversity in the Ubiquist Species Parisotoma notabilis (Collembola, Isotomidae): A Long-Used Chimeric Species?, editor. *PLoS ONE*. 26 septembrie 2012, 7(9), e46056. Disponibil: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046056>.
97. Port, J.A. et al. Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Mol Ecol*. ianuarie 2016, 25(2), pp. 527–41.
98. Qiong, D., Jinlong, Z. seqRFLP: Simulation and visualization of restriction enzyme cutting pattern from DNA sequences. R package version 1.0.1. [online]. 2012. Disponibil: <https://CRAN.R-project.org/package=seqRFLP>.
99. Quilodrán, C.S. et al. Harmonizing hybridization dissonance in conservation. *Commun Biol*. 21 iulie 2020, 3(1), pp. 391. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1116-9>.
100. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [online]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponibil: <https://www.R-project.org/>.
101. Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes, Barcoding*. 24 ianuarie 2007, 7(3), pp. 355–64. Disponibil: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>.
102. Regan, H.M. et al. The Currency and Tempo of Extinction. *The American Naturalist*. ianuarie 2001, 157(1), pp. 1–10.

103. Riaz, M. et al. Combining environmental DNA and species distribution modeling to evaluate reintroduction success of a freshwater fish. *Ecol Appl* [online]. martie 2020 [citat 16 februarie 2023], 30(2). Disponibil: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eap.2034>.
104. Riaz, T. et al. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*. 1 noiembrie 2011, 39(21), e145. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr732>.
105. Rizopoulos, D. ltm: An R Package for Latent Variable Modeling and Item Response Theory Analyses. *J Stat Soft* [online]. 2006 [citat 31 martie 2023], 17(5). Disponibil: <http://www.jstatsoft.org/v17/i05/>.
106. Rohlf, F.J., Fisher, D.R. Tests for Hierarchical Structure in Random Data Sets. *Systematic Zoology*. decembrie 1968, 17(4), pp. 407.
107. Rowden, A.A. et al. High-Resolution Habitat Suitability Models for the Conservation and Management of Vulnerable Marine Ecosystems on the Louisville Seamount Chain, South Pacific Ocean. *Front Mar Sci*. 25 octombrie 2017, 4:335. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00335>.
108. Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* [online]. iulie 1987 [citat 20 martie 2023], Disponibil: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
109. Sanger, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. decembrie 1977, 74(12), pp. 5463–7.
110. Sayers, E.W. et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*. 7 ianuarie 2022, 50(D1), D20–6. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.
111. Schneider, T.D., Stephens, R.M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucl Acids Res*. 1990, 18(20), pp. 6097–100. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332411/>.
112. Serrano-Notivoli, R. et al. bioclim: An R package for bioclimatic classifications via adaptive water balance. *Ecological Informatics*. noiembrie 2022, 71:101810. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2022.101810>.
113. Shabani, F. et al. A comparison of absolute performance of different correlative and mechanistic species distribution models in an independent area. *Ecol Evol*. august 2016, 6(16), pp. 5973–86. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/ece3.2332>.

114. **Sitnic, V.** ADN-ul de mediu – instrument de monitorizare a diversității vertebratelor terestre. In: *Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă*, Chișinău. Ediția 9. 19 martie 2022, Vol. 1, pp. 98–101. ISBN 978-9975-76-390-5.
115. **Sitnic, V.** Comparative in silico analysis of primers used for vertebrate metabarcoding. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*. Chișinău. Ediția 2. septembrie 2022, pp. 144. ISBN 978-9975-159-80-7. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/167734.
116. **Sitnic, V.** et al. Project: Terrestrial vertebrates of the Republic of Moldova - TERVM [online]. BOLDSYSTEMS. 2023 [citat 7 mai 2023]. Disponibil: https://www.boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=TERVM009-23.
117. **Sitnic, V.** Using in silico RFLP method for the study of MC1R gene alleles in the species *Sus Scrofa*. In: *Sustainable use and protection of animal world in the context of climate change* [online]. Institute of Zoology, Chișinău, 2021 [citat 18 februarie 2023]. pp. 375–8. ISBN 978-9975-157-82-7. Disponibil: <https://doi.org/10.53937/icz10.2021.61>.
118. **Sitnic, V.,** Nisteanu, V. Rolul bioinformaticii în organizarea și integrarea datelor despre biodiversitatea organismelor. In: *Functional Ecology of Animals* [online]. Institute of Zoology, Chișinău, 21 septembrie 2018, Chișinău, pp. 127-129. ISBN 978-9975-3159-7-5. [citat 14 martie 2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.53937/9789975315975.24>.
119. **Sitnic, V.** et al. Bioinformatics algorithms - advances and applications. In: *Biology and Sustainable Development*. Bacău. Ediția 17. 2019, pp. 84.
120. **Sitnic, V.** In silico validated primers for metabarcoding terrestrial vertebrate species from the Republic of Moldova. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2022, 3(347), pp. 71–7. ISSN 1857-064X. Disponibil: <https://doi.org/10.52388/1857-064X.2022.3.08>.
121. **Sitnic, V.** Intraspecific variation of the venom proteins from wild and captive *Vipera berus*. In: *The Ninth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum*. București. 2017, pp. 121. ISSN: 2457-9777. Disponibil: http://czga.ro/pozepagini/CZGA2017_Book_of_Abstracts_online_edition_.pdf.
122. **Sitnic, V.** Using R language and Bioclim algorithm for Species Distribution Modelling. In: *The Tenth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum*, București, România. 2018, pp. 97. ISSN: 2457-9777. Disponibil: https://czga.ro/wp-content/uploads/2020/01/CZGA2018_Book_of_Abstracts_online_edition_.pdf.

123. **Sitnic, V.** Using R programming language for prediction of *Vipera ursinii* spatial niche in the Republic of Moldova. *Studii și Comunicări*. Complexul Muzeal de Științele Naturii „Ion Borcea”, Bacău. 2017, Vol. 26, pp. 65–7.
124. **Sitnic, V.**, Turcanu, V. The impact of the environmental factors on body length of *Natrix tessellata* populations. In: *Biologia și Dezvoltarea Durabilă*, Bacău, România. 2017.
125. Smith, M.A. et al. DNA Barcoding: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources*. 28 iunie 2008, 8(2), pp. 235–46.
126. Speller, C.F. et al. Feather barbs as a good source of mtDNA for bird species identification in forensic wildlife investigations. *Investig Genet*. decembrie 2011, 2(1), pp. 16. Disponibil: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21794178/>.
127. Stratan, V., Tutuianu, V., **Sitnic, V.** et al. Training of researchers and doctors in metagenomic DNA sequencing techniques. Indicație metodică în cadrul proiectului transfrontalier 2SOFT/1.2/105 COLONSTRESS. Chișinău, 2022.
128. Șuleșco, T. et al. Phlebotomine sand fly survey in the Republic of Moldova: species composition, distribution and host preferences. *Parasites Vectors*. decembrie 2021, 14(1), pp. 371.
129. Svenningsen, A.K.N. et al. eDNA Metabarcoding Benchmarked towards Conventional Survey Methods in Amphibian Monitoring. *Animals*. 18 martie 2022, 12(6), pp. 763. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/ani12060763>.
130. Taberlet, P. et al. Environmental DNA [online]. Vol. 1. Oxford University Press, 2018 [citat 31 ianuarie 2023]. online ISBN: 9780191821387. Disponibil: <https://academic.oup.com/book/32663>.
131. Tamura, K., Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* [online]. mai 1993 [citat 6 martie 2023], 10(3), pp. 512–526. Disponibil: <https://academic.oup.com/mbe/article/10/3/512/1016366/Estimation-of-the-number-of-nucleotide>.
132. Tateno, Y., Gojobori, T. DNA Data Bank of Japan in the age of information biology. *Nucleic Acids Research*. 1 ianuarie 1997, 25(1), pp. 14–17.
133. Taylor, P.G. Reproducibility of ancient DNA sequences from extinct Pleistocene fauna. *Molecular Biology and Evolution*. 1 ianuarie 1996, 13(1), pp. 283–5.
134. Temple Lang, D. XML: Tools for Parsing and Generating XML Within R and S-Plus. R package version 3.99-0.13 [online]. 2022. Disponibil: <https://CRAN.R-project.org/package=XML>.

135. Thermo Fisher. GeneJET PCR Purification Kit [online]. [citat 8 februarie 2023]. Disponibil: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0701>.
136. Thibaut, J. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Genetic data analysis using R: introduction to phylogenetics. [online]. *Bioinformatics*, 24(11), pp. 1403-1405. Disponibil: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18397895/>.
<https://adegenet.r-forge.r-project.org/files/MRC-session2-tuto.1.3.pdf>.
137. Thomsen, P.F. et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Species Monitoring by Environmental DNA. *Molecular Ecology*. iunie 2012, 21(11), pp. 2565–73.
138. Toderaș, I. Raportul de activitate pe anul 2015 pentru membrii titulari și membrii corespondenți ai AȘM [online]. 2015. Disponibil: [https://old.asm.md/galerie/Acad_TODERA%C5%9E%20Ion%20\(IZ\)%20.pdf](https://old.asm.md/galerie/Acad_TODERA%C5%9E%20Ion%20(IZ)%20.pdf).
139. Toparslan, E. et al. A workflow with R: Phylogenetic analyses and visualizations using mitochondrial cytochrome b gene sequences. *PLoS ONE*. 15 decembrie 2020, 15(12), e0243927. Disponibil: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33320915/>.
140. Toxqui Rodríguez, M.D.S. et al. Evaluation of DNA metabarcoding using Oxford Nanopore sequencing for authentication of mixed seafood products. *Food Control*. martie 2023, 145:109388. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109388>.
141. Turcanu, V., **Sitnic, V.** Study on the herpetofauna formation of the Prut-Nistru space. In: *The Ninth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum*. București. 2017, pp. 120. ISSN: 2457-9777. Disponibil: http://czga.ro/pozepagini/CZGA2017_Book_of_Abstracts_online_edition_.pdf.
142. Valentini, A. et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*. februarie 2016, 25(4), pp. 929–42.
143. Vestheim, H. et al. Application of Blocking Oligonucleotides to Improve Signal-to-Noise Ratio in a PCR. *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011 [citat 2 februarie 2023]. vol. 687, pp. 265–74. Disponibil: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-944-4_19.
144. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [online]. Springer-Verlag New York, 2016. Disponibil: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
145. Willerslev, E. et al. Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene and Pleistocene Sediments. *Science*. 2 mai 2003, 300(5620), pp. 791–5.
146. Wilson, C.J. The establishment and distribution of feral wild boar (*Sus scrofa*) in England. *Wildl Biol Pract*. 9 septembrie 2013, 10(3), pp. 249.

147. Wright, E.S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal*. [online]. 2016, 8(1), pp. 352-359. Disponibil: <https://journal.r-project.org/archive/2016/RJ-2016-025/index.html>.
148. Yu, G. et al. GGTREE : an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol Evol*. ianuarie 2017, 8(1), pp. 28–36.
149. Zhang, F., Jiang, Z. Mitochondrial phylogeography and genetic diversity of Tibetan gazelle (*Procapra picticaudata*). *Implications for conservation. Molecular Phylogenetics and Evolution*. noiembrie 2006, 41(2), pp. 313–21.
150. Zhang, T. et al. Genetic Diversity of mtDNA D-loop and Maternal Origin of Three Chinese Native Horse Breeds. *Asian Australas J Anim Sci*. 21 iunie 2012, 25(7), pp. 921–6.
151. Zou, Y. et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLoS Biol*. 21 noiembrie 2017, 15(11), e2003916. Disponibil: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003916>.

Surse în limba rusă

152. Сытник, В. Моделирование распространения вида *Elaphe quatuorlineata* на территории Республики Молдова. В: *Биоразнообразие и Рациональное Использование Природных Ресурсов*. Махачкала. 2018, с. 158–61. ISBN 978-5-907060-03-6.
153. Фокин, А. Оценка возможностей акклиматизации совков рода *spodoptera* в Румынии. In: *Sustainable use and protection of animal world diversity: International Symposium dedicated to 75th anniversary of Professor Andrei Munteanu*, Chişinău, Moldova. 2014, pp. 142–4. ISBN 978-9975-62-379-7. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/77277.
154. Цуркану, В. Формирование и современное распространение фауны змей Днестровско-Прутского междуречья. *Buletin Ştiinţific Revista de Etnografie, Ştiinţele Naturii şi Muzeologie*. Serie Nouă. Chişinău. 2005, nr. 2(15), pp. 73-77. ISSN 1857-0054.

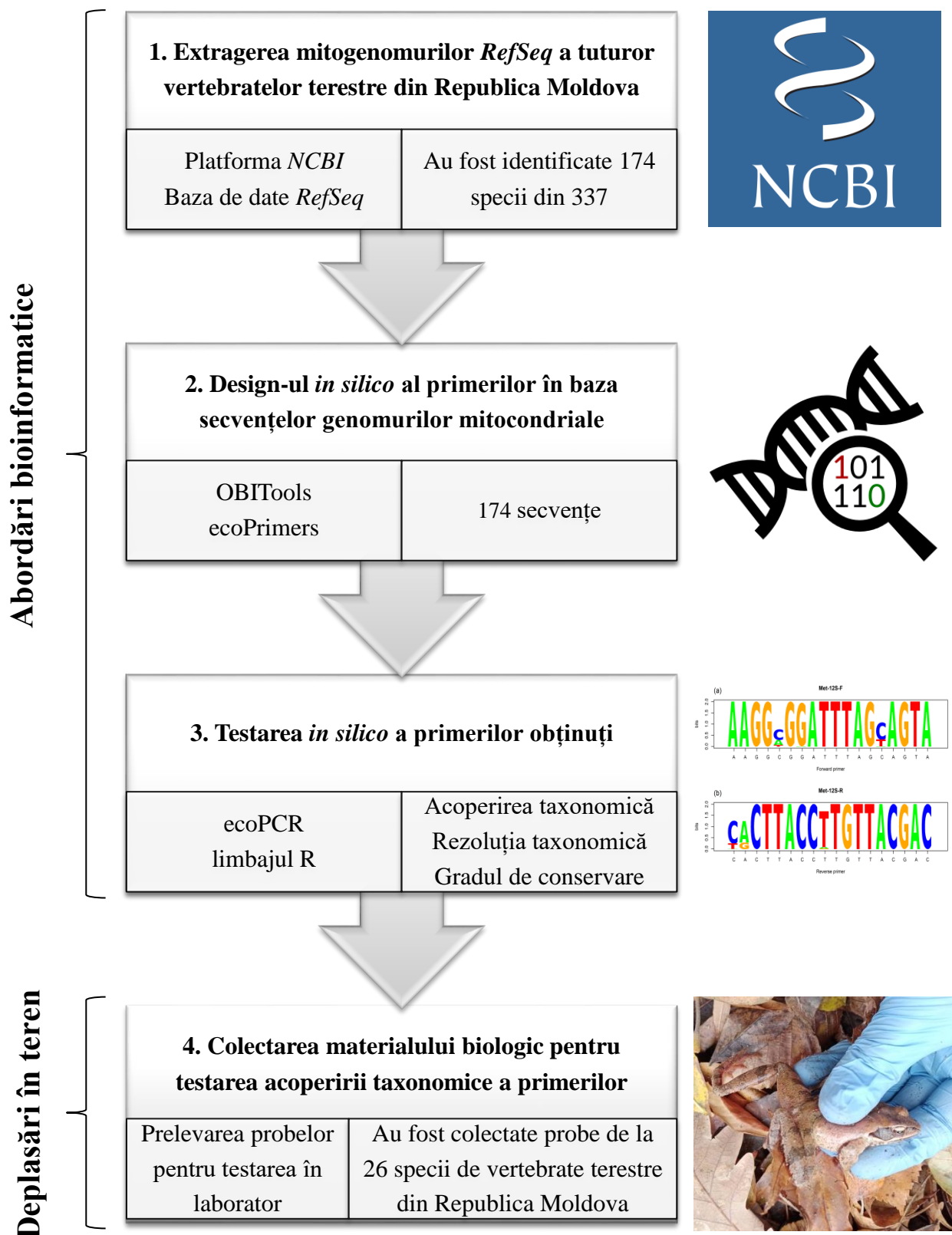
Pagini WEB

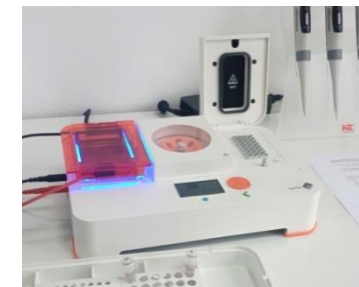
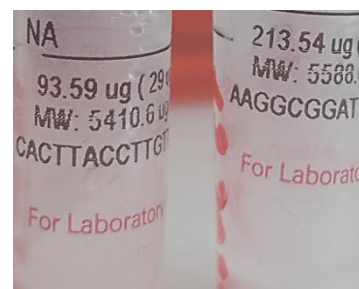
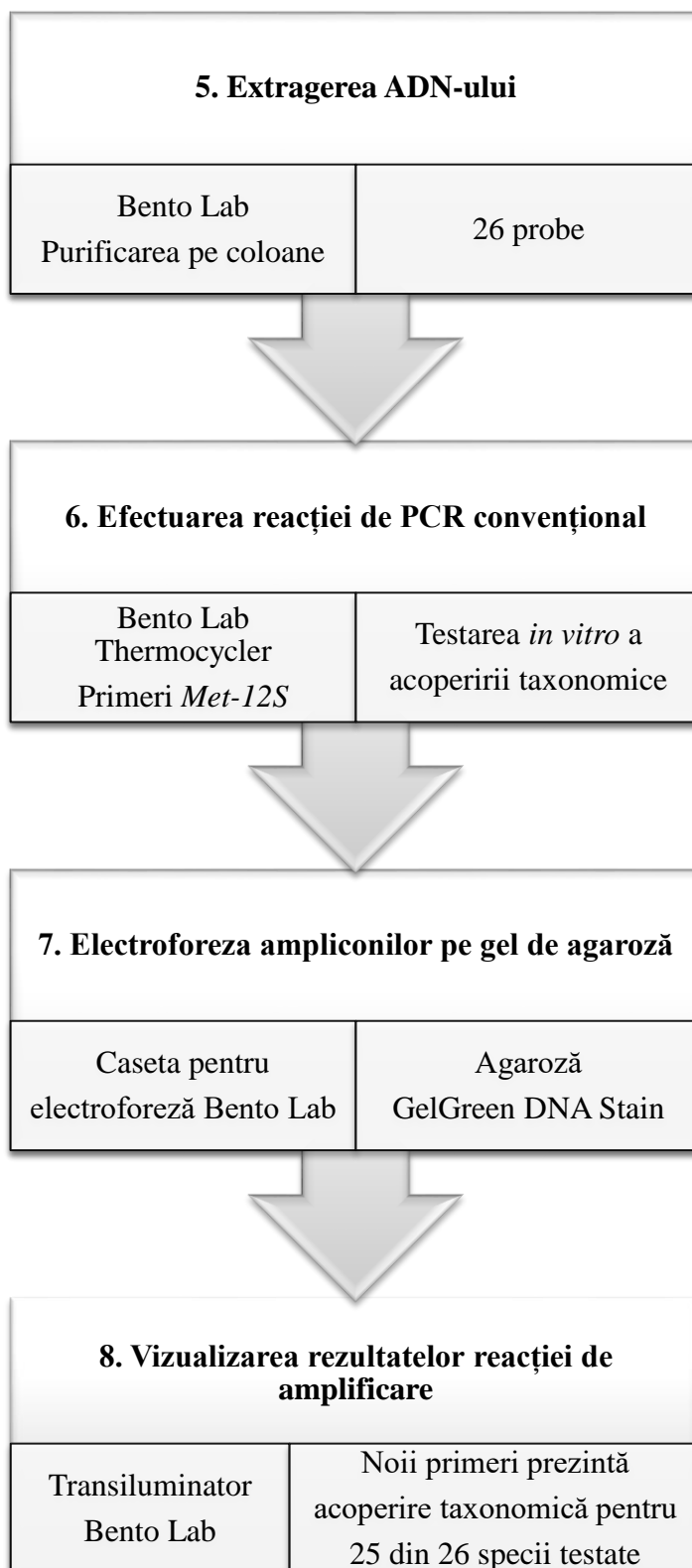
155. Bento Lab Your Portable DNA Laboratory [online]. [citat 7 februarie 2023]. Disponibil: <https://bento.bio/product/bento-lab/>.
156. BirdLife Data Zone [online]. BirdLife International. [citat 21 aprilie 2023]. Disponibil: <http://datazone.birdlife.org/country/moldova>.

157. British Pig Association [online]. BPA. [citat 6 februarie 2023]. Disponibil: <https://www.britishpigs.org.uk/>.
158. Dipstick DNA Extraction Kit | Bento Lab [online]. [citat 8 februarie 2023]. Disponibil: <https://bento.bio/product/dipstick-dna-extraction-kit/>.
159. Eckher Sequence Logo Maker [online]. [citat 2 februarie 2023]. Disponibil: <https://www.eckher.com/c/21hcsqIm8n>.
160. ecoPrimers: new barcode markers and primers — OBITools 1.01 22 documentation [online]. [citat 23 februarie 2023]. Disponibil: <https://pythonhosted.org/OBITools/scripts/ecoPrimers.html>.
161. File:Predator prey curve.png - Wikimedia Commons [online]. [citat 26 februarie 2023]. Disponibil: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Predator_prey_curve.png.
162. How to design primers for PCR. INTEGRA [online]. [citat 7 februarie 2023]. Disponibil: <https://www.integra-biosciences.com/china/en/blog/article/how-design-primers-pcr>.
163. Moldova, regiune centrală [online]. Google Maps. 2023. Disponibil: <https://maps.google.com>.
164. NGS - Illumina sequencing [online]. [citat 27 martie 2023]. Disponibil: <https://www.illumina.com>.
165. Păsările Republicii Moldova. Wikipedia [online]. [citat 8 februarie 2023]. Disponibil: https://ro.wikipedia.org/wiki/Păsările_Republicii_Moldova.
166. România, Județul Buzău [online]. Google Maps. 2023. Disponibil: <https://maps.google.com>.
167. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC [online]. Boston, MA, 2020. Disponibil: <http://www.rstudio.com/>.
168. VipersGarden - Amphibians and Reptiles of Europe and the Mediterranean [online]. vipersgarden.at. [citat 12 februarie 2023]. Disponibil: <https://vipersgarden.at/reports/schwarzw09.php>.
169. Wild boar - alimentarium [online]. [citat 6 februarie 2023]. Disponibil: <https://www.alimentarium.org/en/fact-sheet/wild-boar>.

ANEXE

Anexa 1. Etapele de design și testare a primerilor *Met-12S*





**Anexa 2. Date moleculare din baza de date de referință
cu privire la metabarcodarea vertebratelor terestre din RM**

ecoPCR version 1.0.1

direct strand oligo1 : AAGGCGGATTTAGCAGT#A#

reverse strand oligo2 : CACTTACCTTGTTACGA#C#

max error count by oligonucleotide : 2

database : vertebrate_terestre_moldova

amplified length between [80,150] bp

DB sequences are considered as circular

RefSeq ID	Species name	Mitogenome length	Forward match	Forward mismatch	Reverse match	Reverse mismatch	Amplicon length (without primers)	Metabarcoding sequence (without primers regions)
NC_062298	Corvus cornix	16946	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	124	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCACAAGC GACCCAAAACCCCAATA CATTAAATACACTATCCAGC TAAAGAGGAGGCAA
NC_057089	Falco subbuteo	17678	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGCAGGATAACATAAGC CTACTTTAAGCCGGCCCTG AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCCTCCTCACAAGC TACTAACCCAGATAACT AACCTACCACTATAGCCA AAGATGAGGTAA
NC_056273	Tringa stagnatilis	16799	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGAGGGATAATACAAGC TCTCTTTAAGCTGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCCTCCTCATAAGC TCCAACCCCAACAATACAT AATACAACCTTATAGCTGA AGATGAGGTAA
NC_056257	Pluvialis squatarola	16860	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGTAGGATAATAATGCC TGCTTTAAGTTGGCCCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCATAAGCT ACTACTCCTATACCTTAA TACACCACCCAGCTGAAG ATGAGGTAA
NC_056132	Mustela lutreola	16504	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	123	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCCCTCCTCAAGCA ACACACCCAAATATTACA TAATAAAAGTAAACCTAA AGCAAGAGGAGACAA
NC_056091	Jynx torquilla	16832	AAGGCGG	0	CACTTA	0	121	AAACACGACCACAATGCT

			ATTTAGC AGTA		CCTTGT TACGAC			TGTTTTAAGTTGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC AACCCCCCACCACAACC TATTACCCATTAAAGCTGA AGATGAGGTAA
NC_015526	Phasianus colchicus	16692	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CGCTTA CCTTGT TACGAC	1	127	AAGTAGGACCATGCCTCT TCAAGCCTACTTTAAGAC GGCCCTGGGGCAGGTACA TACCGCCCGTCACCTCTT CGCAGGCCACCAATACTA ATAAATAATACCCACATC AAGCCAAAGACGAGGTAA
NC_013978	Columba livia	17229	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGAGGGATAATATAAGC CCCCTTAAGCTGGCTCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC TCTAAACTACCAATAAAT AATACTCTACCTGCTAAA GATGAGGTAA
NC_009684	Anas platyrhynchos	16604	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGACAATAAAGCT CGCTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC CACACCCACATAATTA ATACCACGTAAATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_007007	Gavia stellata	17573	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCGGGACAATAAAGCC CCCTTTAAGTTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAAGCC CCCATTACTTATAACTAAT ACATTTACAAGCTGAAGA TGAGGTAA
NC_000878	Falco peregrinus	18068	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGCAGGATAACATAAGC CTACTTTAAGTTGGCCCTG AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC TACCAACCCAGATAACT AACCCACCACTATAGCCA AAGATGAGGTAA
NC_000845	Sus scrofa	16613	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	126	AATCGAGAATAGAGTGCT TGATTGAATAAGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCAT GTAGTAATAAAAATAACC TATATTCAATTACACAACC ATGCAAGAAGAGACAA
NC_054728	Falco naumanni	17652	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGCAGGATAATAGAGCC TACTTTAAGTCGGCCCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCC ACCAACTCAAATAACTA ATCCACCACCACGGCCAA AGATGAGGTAA
NC_053106	Panurus biarmicus	17009	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCG CCCCCAAACCCATACCT AATAAGTGTGCGAGCTGA AGAGGAGGTAA
NC_053059	Sitta europaea	16827	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAGGC GACCCCCCCCCCATAA

								CTAATAAGCAATCCAGCC AAAGATGAGGTAA
NC_053058	Oriolus oriolus	16794	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	125	AAGTGGGACAATCGAACC CTCTTTAAGCCGGCTCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC GACCAACCCCCCCCCCAT ACATTAATAAGTTACTCA GCTAAAGAGGAGGTAA
NC_053057	Bombycilla garrulus	16875	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAGGC GACCCACACACCTATTAA CTAATAAGCCATTAAAGCC AAAGATGAGGTAA
NC_053054	Sylvia borin	17971	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	124	AAGTGGGACAAGCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAGC GNACCCCCCCCCCATA ACTTAATAAGCTACTCAG CCGAAGAGGAGGTAA
NC_052780	Stercorarius parasiticus	16672	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGGGGAACAATAGAGTC CCCTTTAAGTTGGCCCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCC ACCAATTTTATAACTAAT AAGCTTTGCGGCTGAAGA TGAGGTAA
NC_051953	Pelobates fuscus	16828	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	TACTTA CCATGT TACGAC	2	118	AAAAGAAACCAGAACATT CTTTTTAATCTGGCCCTAG GGCGCGCACACACCGCCC GTCGCCCTCCTCAATTTAA ATTTCAATTTAAATAAAC CCCAACAAACCTAAGAG GAGGTAA
NC_051558	Nucifraga caryocatactes	16914	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGCGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC GACCCAATTCCAATACATT AATACACTATCCAGCTAA AGAGGAGGCAA
NC_051036	Oenanthe oenanthe	16826	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC GCCCCAACACCCCCATAA CTAATAAGCCATCCAGCT AAAGATGAGGTAA
NC_050973	Mareca penelope	16596	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGACAATAGAGCC TACTTTAAACCGGCCCTAG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCC ACATCCCCATATAACTAAT ACCACGTAAATGCCGAAG ATGAGGTAA
NC_050298	Delichon urbicum	17973	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAAAGGGAGAATCGAGCC CTTTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGC GACCAACCACCCCATAC TAATACGCTATCCAGCTA AAGAGGAGGTAA
NC_050295	Hirundo rustica	17893	AAGGAGG ATTTAGC	1	CACTTA CCTTGT	0	121	AAAAGGGAGAATCGAGCC CTTTTTAAGACGGCTCTGG

			AGTA		TACGAC			GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGC GACCAATCACCCAATAAC TAATACGCTATCCAGCCA AAGAGGAGGTAA
NC_050264	Muscardinus avellanarius	16731	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	CGCTTA CCATGT TACGAC	2	129	AGCTAGGAGTAGAGAGCC TAAGTGAATAGGGCCATT AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAT CCAACATTATATAGATAT ATACATATACAAGTTTATT TAAATGCAAGAGGAGATA A
NC_049122	Apodemus sylvaticus	16308	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	128	AATTAAGAGTAGAGAGCT TAATTGAATAGAGCAATG AAGTACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAACTA AATTAAGTTCACAGTATA AATAATGACGTAAATAAT AATTTACGAGAGGAGATA A
NC_048470	Eremophila alpestris	17855	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	125	AAGCGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTAG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGC GACCCCCCCCCCCCCATA AATTAATACGTTTCCAGC CAAAGAGGAGGTAA
NC_046877	Calidris pugnax	16902	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATATAAGC CTTCTTTAAATCGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC TACCCACCTACAATACCT AATACAACCTCAAGCTGA AGATGAGGTAA
NC_046765	Limosa lapponica	16773	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGCGGGATCATATAAGC CCTCTTTAAATCGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC TATAAGCCTACAATCTCTA ATACAACCATCAGCCGAA GATGAGGTAA
NC_046417	Curruca curruca	17959	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGAGAGACAAGCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAACG CCCCCCCCCCCCCATACC TTAATAAGATGCTCAGCC AAAGAGGAGGTAA
NC_045373	Mareca strepera	16600	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGACAATAGAGCC TACTTTAAACCGGCCCTAG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCC ACATCCCCATATAACTAAT ACCACGTAAATGCCGAAG ATGAGGTAA
NC_045372	Picus canus	17103	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AGACATAGTCATCACAAT TGTCTTAAATTGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCATCACAAGC ATTTTCTCCATACCCCT AGGACCACAAACAGCCAG AGATGAGGCAA
NC_044651	Tringa nebularia	16682	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGAGGGACAATACAAGC CCCCTTTAAACTGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC

								TCAAACCTTCACAATACCTA ATACAACCTATAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_044648	Tringa totanus	16818	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGAGGGATAATACAAGC CCTCTTTAAACCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCTCTATAAGC TTCAACCCTACAATACATA ATGCAACTTATAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_042501	Bombina bombina	17154	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TACTTA CCATGT TACGAC	2	119	AAAAGAAAACGATAGTGTT CTTTTTAACTGGCCCTGG GGCGCGCACACACCGCCC GTCACCTCTTCAACTAAA ACTAATAGATCCCCATAA ACATAAAACAAGTACAAG AAGAGGTAA
NC_042226	Rana temporaria	16061	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	CACTTA CCATGT TACGAC	1	117	AAAAGAAAATAGAGTGTT CTTTTTAACCCGGCTCTGG GACGCGTACACACCGCCC GTCACCTCTTCAATAGTA CCCCGTATGTTCTAACCC AACACCACGTTTTAGAAG AGGCAA
NC_041578	Rallus aquaticus	17149	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGAGGGGCAAGAATACC CTCTTAAACCCGGCCCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCTTCACAACTG CCAAACACTCATAACTTA ATCAAACACCCAAAGTTA AAAGATGAGGTAA
NC_041118	Charadrius alexandrinus	16905	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGTGAGACAATAGAGCT CGCTTTAAGTCGGCCCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCTTCACAAGCT ATAGACCCCCCAAATAAT TCAATACGCAACCTAGCT AAAGATGAGGTAA
NC_040858	Haliaeetus albicilla	17719	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	118	AACTGGGACAATAGAGCC CTATTTAAGCTGGCCCTGG GGCGGTACATACCGCCC GTCACCTCTCTCGTAGGCC GTATTCTCATAACTAATA ACCCAACATGCCAAAGAT GAGGTAA
NC_040986	Mergus merganser	16630	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGTGAGATAATAAGGCC CACTTTAAGCCGGCTCTAG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCTCTCATAGGCC ACACCCCAACATAACTAA TACCATCAACATGCCGAA GATGAGGTAA
NC_040875	Parus major	16777	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	125	AAGTGAGATAATCAAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCTCTAAAAGC GACCCCAACCCCCCAT AACTTAATAAGCTACTCA GCCAAAGATGAGGTAA
NC_040290	Oenanthe isabellina	16812	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGAGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCTCTACAAGC GACCAACACACCTATATA CTAATAAGCCATCCAGCT AAAGATGAGGTAA

NC_039843	<i>Perdix perdix</i>	16699	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CGCTTA CCTTGT TACGAC	1	127	AAATGGGACCATAACCCT AAGCCCACTTTAAGCTGG CCCTGGGGCACGTACATA CCGCCCCGTCACCCTCTTCA CAGGCCACCAGTATTGAT AAATAATACCTCACCCCC CAGCCAAAGACGAGGTAA
NC_039736	<i>Asio otus</i>	17555	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGATGGGGTCATAGTAC CCTCTTTAAGATGGCCCTG GGGTACGTACATACCGCC CGTCACCCTCCTCGCAAGC TTTTTCCCCTATAAATAA TACCCCTCCGAGCTAAAG ATGAGGTAA
NC_039096	<i>Tringa glareola</i>	16804	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGAGGGATCATACAAGC CCTTTTTAAATCGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCTCCTCATAAGC TTCAACCCACAATACAT AATACAATTTATAGCTGA AGATGAGGTAA
NC_038219	<i>Bubo bubo</i>	18952	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	125	AAGACGGAGCCATAACAT CCTCTTTAAGGCGGCCATG GAGCACGTACACACCGCC CGTCACCCTCCTCACAAGC CACAACCTACATATAACA TCATACCACCACCTTAGGC CAAAGATGAGGTAA
NC_038218	<i>Strix uralensis</i>	18708	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGGCGGAGCCATAATAC CCCCTTTAAGACGGCCCTG GGACACGTACATACCGCC CGTCACCCTCCTCACAAGC CACACCCCATAAAACTA TACTACCACCCAGGCTAA AGATGAGGTAA
NC_038195	<i>Milvus migrans</i>	18016	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	118	AACTGAGACAATCGAGCT CTATTTAAACTGGCCCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCCTCCTCGTAGGCC ATATCCTCCATAACTAATA ACCCACCACGCCAAAGAT GAGGTAA
NC_038176	<i>Microtus arvalis</i>	16285	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	124	AATTAAGAATAGAGTGCT TAATTGAATAGAGCAATG AAGTACGTACACACCGCC CGTCACCCTCCTCAAACTA AATAAACGAAAACATATA ATAATTACATCAAACCTTT ACGAGAGGAGATAA
NC_037888	<i>Cricetus cricetus</i>	16263	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	126	AATTAAGAGTAGAGAGCT TAGTTGAATAGAGCAATG AAGTACGTACACACCGCC CGTCACCCTCCTCAAACTA GGCTGCCGATCTATATACC TAATAACAATCAATAAGC CTATGAGAGGAGACAA
NC_037513	<i>Streptopelia decaocto</i>	17160	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGATAATATAAGC CCTCTTTAAGCCGGCTCTG AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCTCCTCACAAGC TCTACAGTAACCAATAAA TAATATGCCCTCCCCGTAA AGATGAGGTAA
NC_036345	<i>Sterna hirundo</i>	16707	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCGGGACAATAGAGCC CCCTTTAAGTTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCCTCCTCACAAGCC

								ACAAACCATCATAACTAA TAACCCTTACGGCTGAAG ATGAGGTAA
NC_036956	Vipera berus	16370	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCATGT TACGAC	1	119	AGATAGGAATAAAACACC TAACTGAACATAAAGCAA TGAAGTGCGTACACACCG CCCGTCATCCCTGCCTACA CCATATTAATCTATATAAA CCTAATTAATAATCTCTAAC CAGGGCAA
NC_036344	Gelochelidon nilotica	16748	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGGGGGACAATAGAGCC CCCTTTAAGTTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCACAAGCC ACTAACCATCATAACTAA TAACCTTCACGGCTGAAG ATGAGGTAA
NC_034838	Corvus corax	16928	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCACAAGC GACCCCCAACCCATTAC ATTAATACGCTATCTAGCT AAAGAGGAGGCAA
NC_036035	Ondatra zibethicus	16348	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	124	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGAGCAATG AAGTACGTACACACCGCC CGTCACCCCTCCTCAAACCTA AATAAACGAAATATATAC ATAATTACATCAACAATTT ACGAGAGGAGATAA
NC_035806	Aquila heliaca	18067	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGTGGGACAATAAAGCC CTACTTAAGCCGGCCCTG AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCCTCCTCGCAAGC CATAACCCATCTATAACTA ATACCCCACTAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_035868	Alcedo atthis	17383	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AACCAGAATGAGAATGTC TGATTTAAGCCGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCCTCCTCACAAGC TAATAACCTACATAACTA ATACCTATACTTGCTGAAG ATGAGGTAA
NC_035423	Himantopus himantopus	17378	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAACGGGACAATGAAGCC CGCTTTAAGTCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCATAAGCT ACAAACCCCATTAATTTA ATACACCACTAAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_001665	Rattus norvegicus	16313	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	126	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGAGCAATG AAGTACGCACACACCGCC CGTCACCCCTCCTCAAATTA GATTGGCATTATATATAC ATAATTTCACTAACAAATT TATGAGAGGAGATAA
NC_005089	Mus musculus	16299	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	125	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATTGAGCAATG AAGTACGCACACACCGCC CGTCACCCCTCCTCAAATTA AATTAACTTAACATAATT AATTCTAGACATCCGTTT ATGAGAGGAGATAA

NC_034237	Haematopus ostralegus	16798	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGTGGGAACCATAAAGCC CACTTTAAGTCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCACAAGCC ATAGATCACCATAATTTA ATTTCATCACTCGGCTGAA GATGAGGTAA
NC_034227	Myotis bechsteinii	17151	AAGGTGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	131	AATTAAGAGTAGAGAGCT TAATTGAATGTTGGCCATA AGGCACGCACACACCGCC CGTCACCCCTCCTCAAATAA AACAATATTAAATATACC CTAAATGATATACAAATA TTAATCTATGAGAGGAGA CAA
NC_033974	Tringa ochropus	16906	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGAGGGATAATATAAGC CCCCTTTAAATCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCCTCTTCACAAGC TCCAATTCTACATGTACTT AACACAACCAATAGCTGA AGATGAGGTAA
NC_033347	Vespertilio murinus	16721	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	125	AATTAAGAATAGAGTGCT TAATTGAATAGGGCCATG AGGCACGCACACACCGCC CGTCACCCCTCCTCAAGTAA TACTTATTAATTTTTTCAT AAAACCTTTAATACCATT ATAAGAGGAGATAA
NC_031802	Cricetulus migratorius	16246	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	126	AATTAAGAGTAGAGAGCT TAATTGAATAGAGCAATG AAGTACGTACACACCGCC CGTCACCCCTCCTCAAACCTG GGCTGCCAAACCCTATAC CTAATAACAACCATTAAG CTCACGAGAGGAGATAA
NC_030585	Tringa erythropus	16683	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGAGGGACAATACAAGC CCCCTTTAAACCGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCCTCCTCATAAGC TCCAACCTCCCAATACTTA ATAAACTTATAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_026223	Periparus ater	16783	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	124	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCAAAAGC GACCCCAACCCCCCATA AACTAATAAGCTACTCAG CCAAAGATGAGGTAA
NC_002069	Corvus frugilegus	16931	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCAAAAGC GACCCAAACCCCTAATAC ATTAATACGCTATTACAGT AAAGAGGAGGCAA
NC_029147	Turdus philomelos	18540	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGAGAGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCCCTCCTCATAAGCG CCCAACACACCCAATACC TAATAAGCCATCCAGCTA AAGAGGAGGTAA
NC_029862	Dendrocopos leucotos	16838	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAACATGATCATACGCC TGTCTTAAGTCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC

								GTCACCTCCTCACAAGC AACTTTTCCCCCTTCAAT CAAAACCACAACCTCGCTA AAGATGAGGCAA
NC_029837	Regulus regulus	16847	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAGGC GAACCAACACCCCATAAA TTAATAAGCTATCCAGCC AAAGATGAGGTAA
NC_029346	Myotis myotis	17213	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	136	AACTAAGAATAGAGAGCT TAGTTGAATATGGCCATA AGGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAATAA AACAAATATTAAATATATCT TAGATAATATATATACAT AGATATTGACACATGAGA GGAGACAA
NC_029360	Sturnus vulgaris	16793	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACCATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAGGC GAACCAACTCCCCATAC CTAATAAGCTATCCAGCC AAAGAGGAGGTAA
NC_029229	Motacilla alba	16826	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCG CCCCCTCCCATAAAATT AATAAGCCATGCAGCCAA AGATGAGGTAA
NC_029189	Buteo lagopus	18559	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AACTGGGACAATAAAGCC CTATTTAAGCTGGCCCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCGCAGGCT ATACCCACATAACTAA TAACCCACTATGCCAAAG ATGAGGTAA
NC_028346	Spatula clypeata	16599	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGATAATAGAGCC CGCTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC CACATCCCCACATAACTA ATACTACTTAAATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_028310	Felis silvestris	16640	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	124	AATTTGAGAATAGAGAGC TCAATTGAATCGGGCCAT GAAGCACGCACACACCGC CCGTCACCTCCTCAAGTG GTAACCTCCAAAAAACC TATTTAAATCATCACACCC ACAAGAGGAGATAA
NC_028188	Turdus merula	16733	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGAGAGACAATTGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAAGCG ACCAATACACCCCATAACC TAATAAGCCATCCAGCTA AAGAGGAGGTAA
NC_028178	Upupa epops	16562	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGGGGGACAATAATACT CCCTTTAAACAGGCCCTG GAGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCGCAAGC CCATTCCACAGCATAATTA ATACCACACACTCGCTGA

								AGATGAGGTAA
NC_028176	<i>Sternula albifrons</i>	16357	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGTGGGACAATAGAGCC CTCTTTAAGTTGGCCCTGG GATACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAAGCC ACCAATCACCATAACTAA TAACCTTCGCGGCTAAAG ATGAGGTAA
NC_028174	<i>Dendrocopos major</i>	16845	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAACATGATCATCACACC TGTCTTAAGTCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC AACTTTCCCCCTTCAATC AAAACCACAACCTCGCTAA AGATGAGGTAA
NC_028162	<i>Otus scops</i>	17413	AAGGCGG ATTTAGA AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	124	AAAAAGGAACCATAAAGC CTTCTTTAACCCGGCCCTG GGACACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC CACAACCCCCACAACTT ATACCCCTCCACCCAAGCT AGAGATGAGGTAA
NC_028013	<i>Mustela eversmannii</i>	16463	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	123	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCA ACATACCCAAACATTACA TAATAAAAGTAAACCTAA AGCAAGAGGAGACAA
NC_027963	<i>Sorex araneus</i>	16887	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	125	AGTTGAGAATAGAGTGCT CAACTGAATCAGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAC CCTAGACTATACTAATATA TAATTACAAGTCCCCCAGT ATTAGAAGAGATAA
NC_027933	<i>Motacilla cinerea</i>	16835	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCG CCCCCTCCCACTATAAATT AATAAGCTATGCAGCCAA AGATGAGGTAA
NC_027932	<i>Micromys minutus</i>	16232	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	125	AATTAAGAATAGAGTGCT TAATTGAATTGAGCAATG AAGTACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAACTA TGCCTAAAAAAAATAAAA TAATTAATAACAACAGGC TTACGAGAGGAGATAA
NC_027096	<i>Cygnus olor</i>	16739	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCGGGACAATAGAGCC CCCTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGCT ACATCCACATAACTAAT ACCACTAACACGCTAAAG ATGAGGTAA
NC_027095	<i>Cygnus cygnus</i>	16724	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGTGGGACAATAGAGCC TACTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGCT ATATCCCCATAACTAATA CCATTAACACGCTAAAGA TGAGGTAA
NC_027606	<i>Asio flammeus</i>	18966	AAGGCGG ATTTAGC	0	CACTTA CCTTGT	0	119	AAGATGGAGCCATAACAT CCTCTTTAAGATGGCCCTG

			AGTA		TACGAC			GGGTACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCGCAAGC TACTCCCCCATAAATAAT ACCCCTCAAAGCTAAAGA TGAGGTAA
NC_012431	Anguis fragilis	17479	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CGCTTA CCATGT TACGAC	2	117	AAACAAGCAAGAGTGCTT TTTTAAAAACAGCCCTGG AGCGCGCACACACCGCCC GTCACCTCCTCAATAACC ACCGACTCTAAAACCTATA AAACCACAAACCACCAGA TGAGGCAA
NC_025579	Falco columbarius	17516	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGCAGGATAACATAAGC CTACTTTAAGCCGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC TACCAACCCATAATAACT AATCCACCACTATAGCCA AAGATGAGGTAA
NC_027420	Recurvirostra avosetta	16897	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AACCGGGACAATGAAGCC CGCTTTAAGTCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACAAACCTTCATAATTCA ATATGTTATTAAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_027267	Phalacrocorax carbo	18995	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGACAATAGAGCC CCCTTTAAACCGGCCCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCC ACAAATACCCCATAACTA ATACCCCTGCCGGCCAAA GATGAGGTAA
NC_027237	Nyctalus noctula	17478	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	126	AATTAAGAATAGAGTGCT TAATTGAATAAGGCCATG AGGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCA AAACATTATTATTTTCGT AAACCCTAATAAATATAA TCCGTGAGAGGAGATAA
NC_026911	Poecile palustris	16824	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	124	AAGTGGGATAATCAAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGC GACCCCAAACCCCCCATA AACTAATAAGCTACTCAG CCAAAGATGAGGTAA
NC_024640	Tadorna ferruginea	16639	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAATGGGACAATAGAGCT CATTTTAAGCCGGCCCCA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTTCACAGGC CACACCCGCACATAACTA ATACCATTAACATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_026715	Falco cherrug	18059	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGCAGGATAACATAAGC CTACTTTAAGTTGGCCCTG AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC TACCAACCCAGATAACT AACCTCTACTACAGCCA AAGATGAGGTAA
NC_025923	Botaurus stellaris	20350	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCAGGACAATTAAGCC TCCTTTAAACCGGCCCTGG GGTACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCC ACCTAATCCTATAACTAAT ATAACACCCAGCTGAAGA

								TGAGGTAA
NC_025919	Ardea purpurea	18722	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCAGGATTATAAGGCC TGCTTTAAACTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACTAAGTCCAATAGCTAA TACAACACCCAGCCGAAG ATGAGGTAA
NC_025917	Bubulcus ibis	18959	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGTAGGATTATAAAGGCC TGCTTTAAACTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACTGAGCCTAATAACTAA TACAACACCCAGCCGAAG ATGAGGTAA
NC_025599	Fringilla coelebs	16801	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC GCCCCCTACCCCCATAAAT TAATAAGCCATTTCAGCCG AAGAGGAGGTAA
NC_025649	Chroicocephalus ridibundus	16807	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCGGGACAATAGAGCC CCCTTTAAGTTGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCC ACCAACAACCATAACTAA TAAACCTTATGGCTAAAG ATGAGGTAA
NC_025637	Vanellus vanellus	16795	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGAACAATAATGTC CACTTTAAGTCGGCTCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ATAAGCCCCTATAACTCA ATACACCTTTCAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_025625	Pyrrhula pyrrhula	16831	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCG CCCCCTCCACATAAATTA ATAAGCCATCCAGCCAAA GATGAGGTAA
NC_025623	Loxia curvirostra	16805	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCG CCCCCCCCCCCCCATAACATT AATAAGCTATCCAGCCAA AGATGAGGTAA
NC_025614	Coccothraustes coccothraustes	16823	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCG CCCCCCCCCCCCCATAAATTA TAAGCCATCTAGCCAAAG ATGAGGTAA
NC_025611	Passer domesticus	16802	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGCGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCGCCCTCCTCGCAGGC GCCCCCCCCCCCCATAAA CTAATAAGCTATCCAGCC GAAGATGAGGTAA
NC_025580	Accipiter nisus	18647	AAGGCGG ATTTAGC	0	CACTTA CCTTGT	0	119	AAATGGGACAATAAAGGCC CAATTTAAGCCGGCCCTG

			AGTA		TACGAC			AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCGTAGGC CCTACCTCTTAATAACTAA TACCCCTACTGCCAAAG ATGAGGTAA
NC_025559	Neomys fodiens	17260	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	123	AGCCAAGAATAGAGTGCT TGACTGAATTAGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAC ATAAACTAAAATATTCCT AATTTAATGGTAATACGT ATTAGAGGAGATAA
NC_025521	Scolopax rusticola	16984	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGCTGGACAATACAAGC CTACTTTAAACTGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAGGC TACAATCATCATAATACAT AATACGAATTAAAGCTGA AGACGAGGTAA
NC_025516	Mustela erminea	16471	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	122	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCA ACACACACAAACACTACA TAATAAAATATACCCAAA GCAAGAGGAGACAA
NC_025500	Fulica atra	17029	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGGGAGATAAGAATGCC CCCTTAAACTCGGCCCTGG AGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCTTCACAGCCC CCAACACCTGTAACATAAC ACGCCACCGGGCCAAAG ACGAGGTAA
NC_024821	Passer montanus	16887	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	125	AAGCGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCTCTCGCAGGC GCCCCCCCCCCCCCATA AATTAATAAGCTATCCAG CCGAAGATGAGGTAA
NC_024922	Netta rufina	16625	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCAGGATAATAAAGCC CGCTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC CACACTCCCACATAACTA ATACCACCAAATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_021749	Martes martes	16486	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	CGCTTA CCTTGT TACGAC	1	123	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCG ATACATTCAACCATTACAT AATACAACTAAACTAAA GCAAGAGGAGATAA
NC_024750	Tadorna tadorna	16604	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGACAATAAAGCT CGCTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCATAAGC CACACCCCCACATAATTA ATACCACGTAAATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_024631	Anas acuta	16599	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGACAATAGAGCC CACTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC CACGTCCCCACATAACTA ATACCACGTAAATGCCAA

								AGATGAGGTAA
NC_024602	Aythya ferina	16616	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGATAATAGAGCC CACTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC CATACCCACATAACTA ATACCACTAAAATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_024595	Aythya fuligula	16616	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCAGGATAATAAAGCC CACTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC CATATCCACATAACTA ATACCACTAAAATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_024594	Tachybaptus ruficollis	16688	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CGCTTA CCTTGT TACGAC	1	119	AAGTGGACAATACAGTC CTCTTTAAGCTGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACCAAACCCTATAACTAA TACCCACACCAGCTGAAG ATGAGGTAA
NC_021621	Ficedula albicollis	16787	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGCGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC GACCAACACACCCTATAC CTAATAAGCCATTCAGCT GAAGATGAGGTAA
NC_024087	Aquila chrysaetos	17332	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGTGGGACAATAAAGCC CTACTTAAGCCGGCCCTG AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCGCAAGC CATAACCCATCTATAACTA ATAACCCAACCTAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_024048	Fringilla montifringilla	16807	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC GCCCCCTACCCCATAAAT TAATAAGCTATTACGCCG AAGAGGAGGTAA
NC_024107	Cecropis daurica	17949	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAAAGGGAAAATCGAGCC CTTTTAAAGACGGCCCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGC AACCAATTACCCCATAAAC TAATACGCTTCCAGCCA AAGAGGAGGTAA
NC_023981	Egretta garzetta	17361	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAACAGGATAATAAAGCC TGCTTTAAACTGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAAGCT GCTAGTCCCAATAATTAAT ACTACATCAAGCCAAAGA TGAGGTAA
NC_023969	Aix galericulata	16605	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAATGAGATAATAAAGCC CATTTAAGCCGGCCCTAG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCC ACACTCCACATAACTAA TACCCTAAACATGCTAAA GATGAGGTAA
NC_023946	Ciconia nigra	17795	AAGGCGG ATTTAGC	0	CACTTA CCTTGT	0	120	AAGAGGGATCATAAAGCC CCCTTTAAACCGGCCCTGG

			AGTA		TACGAC			GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAAGCT ATTAAACCACTATAACTA ATACCCCAACAGCCAAA GACGAGGTAA
NC_022452	Anas crecca	16601	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGCGGGATAATAAAGCC CGCTTTAAGCCGGCCCTA GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC CACACCCCACTATAACTA ATACCACGTAAATGCCAA AGATGAGGTAA
NC_020425	Alauda arvensis	17018	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	125	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTAG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAGC GACCCCCCCCCCCCCATA AATTAATAAGTTTCCCAGC CAAAGAGGAGGTAA
NC_020684	Capreolus capreolus	16358	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	125	AACTAAGAATAGAGTGCT TAGTTGAATTAGGCAATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAAATA GCAAAATACATTTAAATTT ATTTATACGTATAAACCAT ATGAGAGGAGACAA
NC_020643	Martes foina	16530	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	123	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCG ATACATTTAACCATTACAT AATGCAAACCTAACTTAA GCAAGAGGAGATAA
NC_020639	Mustela nivalis	16512	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	122	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCA ATACACCCAAACACTACA TAATAAACTCACTCAAA GCAAGAGGAGACAA
NC_020638	Mustela putorius	16523	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	123	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATA AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGCA ACACACTCAAATACTACA TAATAAAAGTAAACCTAA AGCAAGAGGAGACAA
NC_020577	Grus grus	16649	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGTGGGATAATAATGCC CTCTTTAAACCGGCCCTGG GGCACGTACACACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACAGATTCTCATAAATAA TTACACTAATTAGCCAAA GACGAGGTAA
NC_011818	Accipiter gentilis	18266	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	118	AAATGGGATAATAAAGCC CTATTTAAGCTGGCCCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCGTAGGCC ATAAACCCCACTAACTAT AGCCTATACTGCCAAAGA TGAGGTAA
NC_016428	Apodemus agrarius	16263	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	124	AATTAAGAATAGAGAGCT TAGTTGAATTGAGCAATG AAGTACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAACTA AATAAACTAACTATACA TAATTCATAAACAAAATTT

								ACGAGAGGAGATAA
NC_016191	Rhinolophus ferrumequinum	16839	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	CGCTTA CCTTGT TACGAC	1	125	AACCAAGAACAAAGAGCT TGGTTGAATTAGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAAATAT AAAGGTACCACCCAAACC TATTAACACGTACCCACA ACATGAGAGGAGATAA
NC_015810	Garrulus glandarius	16930	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGAGAGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGC GACCAAACCCCTTAATAC ATTAATACGCTACTCAGCT AAAGAGGAGGCAA
NC_015807	Nycticorax nycticorax	17829	AAGGCGG ATTTAGT AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCAGGACAATAGAGCC TTCTTTAAACTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACTAACTTAATAGTTAAT ACAGCACCCAGCCGAAGA TGAGGTAA
NC_015790	Triturus cristatus	16564	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	AACTTA CCATGT TACGAC	2	118	AAAAGAAAAAGAGCGTT CTTTTAAACCGGCAATGG AGCGCGCACACACCGCCC GTCACCTCCTCAAGAACT ATTAGATATTAAATAAAC AAAGAAGAAAAAGAAG AAGAGGCAA
NC_015484	Plecotus auritus	16900	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	128	AATTAAGAATAGAGTGCT TAATTGAATCCGGCCATG AGGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAA AAAATATTAATTACTACCT AAAATATAAATAATATTA ACTTATGAGAGGAGATAA
NC_015236	Gallinula chloropus	17027	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGGGGGACAAGAATGCC CCCTTAAACCCGGCCCTG GAGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCAGGCC CCCAATATCCATAACTAA CACGCCCACTAGGCCAAA GATGAGGTAA
NC_015200	Pica pica	16939	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGTGGGACTATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCGCAAGC GACCCAAACCCTAATTAC ATTAATACGCTACTCAGCT AAAGAGGAGGCAA
NC_015198	Spinus spinus	16828	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCCCTGG GACACATACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAGGCG CCCCCCCCCCCCATAAAT TAATAAGCTATCCAGCCA AAGATGAGGTAA
NC_014046	Otis tarda	16849	AAGGCGG ATTTAGA AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGCGGGATAATTAAGCC CTCTTTAAACCGGCCCTGG GGTACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACCAGCACCCATAATTAA TGCACACTCCAGCTGAAG ATGAGGTAA
NC_007704	Cervus elaphus	16357	AAGGAGG ATTTAGC	1	TGCTTA CCTTGT	2	125	AACTAAGAATAGAGTGCT TAGTTGAAGTAGGCCATG

			AGTA		TACGAC			AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAG GCACAGTACACTCAAATT TATTTGCACGTATTAATCA TATGAGAGGAGACAA
NC_013700	Nyctereutes procyonoides	16713	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	125	AACTAAGAATAGAGAGCT TAGTTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTGA CAAAACCAAAGCCACAAC CATATTAACCAAACCAAA ACACAAGAGGAGACAA
NC_007691	Cygnus columbianus	16728	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGTGGGACAATAGAGCC TACTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAGCT ATATCCACATAACTAAT ACCATTAACACGCTAAAG ATGAGGTAA
NC_002197	Ciconia ciconia	17347	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	120	AAGGGGGATAATAAAGCC CCCTTTAAACTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCATAAGCT ACCAAACCACCATACCTA ATACCCCCACCAGCCGAA GATGAGGTAA
NC_002391	Talpa europaea	16884	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	125	AATTAAGAATAGAGCGCT TAATTGAATAAGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAC CAACGCCAAACACTATAC ATAATTAACCGTAATAA GTATGAGAGGAGATAA
NC_013834	Cervus nippon	16434	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	125	AACTAAGAATAGAGTGCT TAGTTGAATTAGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAG GTACAATACACTCAAACCT TATTTACACGTATTAATCA TATGAGAGGAGATAA
NC_012772	Platalea leucorodia	16715	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGAGAGATAATAGAGCT CTCTTTAAGTCGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACAAACCTTTATAACTAAT ACCCAAATTAGCTGAAGA TGAGGTAA
NC_011307	Falco tinnunculus	17663	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGCAGGACAATGTTAAG CCTACTTTAAGTCGGCCCT GAGGCACGTACATACCGC CCGTCACCTCCTCACAAG CCACCAATCCTAAATAAC TAATCCGCTACTATGGCCA AAGATGAGGTAA
NC_011196	Anser anser	16738	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGTGGGACAATAGAGCC TACTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAGC CACATCCACATAACTAA TACCATAAATACGCTGAA GATGAGGTAA
NC_011125	Meles meles	16442	AAGGTGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	122	AATTAAGAATAGAGAGCT TAGTTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAG CATACCAAGCATTACAT AATAAAATTACATTAAGA

								CAAGAGGAGATAA
NC_010227	Acrocephalus scirpaceus	17903	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	123	AAGTGGGACAATCGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GACACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGC GACCCCCCCCCCATAA ATTAATAAGTTATCCAGCC AAAGATGAGGTAA
NC_010228	Sylvia atricapilla	17937	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAGTGGGAGCAGAGAGCC CTCTTTAAGCCGGCTCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGC GCCCCCCCCCCCCATACCT TAATAAGCCATTACAGCCG AAGAGGAGGTAA
NC_009258	Bombina variegata	18551	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TACTTA CCATGT TACGAC	2	118	AAAAGAAACAATAGTGTT CTTTTTAAACTGGCCCTGG GGCGCGCACACACCGCCC GTCACCTCTTCAACTAGA ACTGATATATTTCTAAAAAC ATAAAACGAGTACAAGAA GAGGTAA
NC_008550	Pandion haliaetus	17864	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	122	AAACAGGATAATAAAGCC CAATTTAAGCTGGCCCTG AGGCACGTACATACCGCC CGTCACCTCCTCACAAGC TACAACCTCTTAGATAAC TAACACACCCAAAAGCTG AAGATGAGGTAA
NC_008540	Apus apus	17037	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGAAGGATAATAAAGCC ACCTTTAAACTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCAAAAAGCT ACAACACCCAACATACCT AATTTCTTAAGTACTGCTAA GATGAGGTAA
NC_008434	Vulpes vulpes	16813	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	126	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAA TAAGACTGAGGCCATAAA CATATTAAGTACATCAA AACACGAGAGGAGATAA
NC_008328	Lacerta viridis	17156	AAGGTGA ATTTAGC AGTA	2	CGCTTA CCGTGT TACGAC	2	122	AACTAGATAAGAGAGTCT ATTTTAAACAACGCTCTGGG ACGCGTACACACCGCCCG TCACCTCCTCAAAACAAC ATAAACTAACTACTTTTA TAAATCAAAAAAGTTAAA CAGAGGAGGCAA
NC_008140	Podiceps cristatus	16134	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CGCTTA CCTTGT TACGAC	1	119	AAGCGGAACAATACAGTC CCCTTTAAGTTGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCTCCTCACAAGCT ACAAAATCCCATAACTAA TATCTACATCAGCTGAAG ATGAGGTAA
NC_008092	Canis lupus	16729	AAGGAGG ATTTAGT AGTA	2	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	124	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCACCTCCTCAAGTAA TAAGACACAACCATAACC ATATTAAGTAACTAAAA CACAAGAGGAGACAA
NC_008064	Microtus rossiaemeridionalis	16283	AAGGAGG ATTTAGT	2	TGCTTA CCTTGT	2	124	AATTAAGAATAGAGAGCT TAATTGAATAGAGCAATG

			AGTA		TACGAC			AAGTACGTACACACCGCC CGTCACCCTCCTCAAACCTA AATAAACGAAAACCTATAC ATAATTACATCAAATTTTT ACGAGAGGAGATAA
NC_004539	Anser albifrons	16737	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AAGTGGGACAATAGAGCC TACTTTAAGCCGGCCCTGG GGCACGTACATACCGCCC GTCACCCTCCTCAAAGC CACATCCCACATAACTAA TACCATAAATACGCTGAA GATGAGGTAA
NC_003712	Arenaria interpres	16725	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	121	AAGCGGGACAATATAAGC CCCCTTAAGCTGGCCCTG GGGCACGTACATACCGCC CGTCACCCTCCTCACAAGC TACACTCACATAATACCTA ATACAATCCCTAGCTGAA GATGAGGTAA
NC_004028	Lepus europaeus	17734	AAGGAGG ATTTAGC AGTA	1	TGCTTA CCTTGT TACGAC	2	124	AATTAAGAATAGAGTGCT TAATTGAACAAGGCCATG AAGCACGCACACACCGCC CGTCGCCCTCCTCAAGTAC TGAATATTAATTATAGTTA ATTCTGAACAAGCAGGT ATAAGAGGAGATAA
NC_003128	Buteo buteo	18674	AAGGCGG ATTTAGC AGTA	0	CACTTA CCTTGT TACGAC	0	119	AACTGGGACAATAAAGCC CTATTTAAGTTGGCCCTGA GGCACGTACATACCGCCC GTCACCCTCCTCGCAGGCT ATACCCCCACATAACTAA TAACCCACTATGCCAAAG ATGAGGTAA

Anexa 3. Date cu referire la speciemenle de microtine din Moldova
înregistrate în baza de date globală *Barcode of Life Data Systems*

Process ID	Record ID	Sequence ID	Species name	Region	Country	Identification method	Authors
TERVM 001-23	16986180	17881601	Microtus arvalis	Piatra Alba	Moldova	CYT B sequencing	Victor Sitnic, Victoria Nisteanu, Gerald Heckel
TERVM 002-23	17064964	17913161	Microtus arvalis	Horesti			
TERVM 003-23	17064965	17913162	Microtus rossiaemeridionalis	Horesti			
TERVM 004-23	17064966	17913163	Microtus rossiaemeridionalis	Horesti			
TERVM 005-23	17064967	17913254	Microtus rossiaemeridionalis	Horesti			
TERVM 006-23	17064968	17913255	Microtus arvalis	Horesti			
TERVM 007-23	17064970	17913274	Microtus arvalis	Horesti			
TERVM 008-23	17064973	17913275	Microtus arvalis	Chisinau suburb			
TERVM 009-23	17530961	18430628	Microtus rossiaemeridionalis	Malcoci			
TERVM 010-23	17530962	18430629	Microtus rossiaemeridionalis	Malcoci			
TERVM 011-23	17530963	18430630	Microtus rossiaemeridionalis	Malcoci			
TERVM 012-23	17530964	18430631	Microtus rossiaemeridionalis	Malcoci			
TERVM 013-23	17530965	18430632	Microtus rossiaemeridionalis	Malcoci			

Anexa 4. Acte de implementare



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA
I.P. UNIVERSITATEA PEDAGOGICĂ DE STAT „ION CREANGĂ” DIN CHIȘINĂU
FACULTATEA BIOLOGIE ȘI CHIMIE

MD-2009, Chișinău, str. Drumul Viilor, 26a, Tel.: (+373) 280536, e-mail: bio_chimie@upsc.md

Nr. 289 din 06.06.2023

Act de implementare

Prin prezentul, se confirmă că rezultatele științifice obținute și recomandările elaborate în cadrul tezei de doctor în științe biologice a Dlui **Victor SÎTNIC** intitulată **„Abordări bioinformatică în cercetarea diversității vertebratelor terestre în Republica Moldova”** sunt implementate în procesul didactic teoretic și experimental la specialitățile *Biologie, Ecologie, Biologie și Chimie, Chimie și Biologie, Biologie aplicată*, la realizarea tezelor de licență și masterat din cadrul catedrei Biologie Animală a Facultății Biologie și Chimie a Universității Pedagogice de Stat „Ion Creangă” din Chișinău.

Decanul facultății Biologie și Chimie,
Dr., conf. univ.



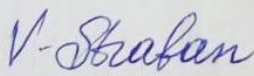
Nicolai ALUCHI

CERTIFICAT

Nr. 1

din 02.05.2023

Prin prezenta certificare confirm că rezultatele științifice obținute de dl Victor SÎTNIC în teza de doctor în biologie „*Abordări bioinformatică în cercetarea diversității vertebratelor terestre în Republica Moldova*” au fost utilizate în calitate de suport metodologic pentru analiza datelor cu privire la biodiversitatea microbiomului colonic uman în cadrul proiectului transfrontalier interinstituțional (IRO Iași, România - IMSP Institutul Oncologic, Republica Moldova) „*Changes in human colonic microbiome in antibiotic generated stress*”, cod proiect 2SOFT/1.2/105, acronim COLONSTRESS. Proiectul, finanțat de Uniunea Europeană, s-a desfășurat în perioada anilor 2020-2022 și a avut la bază secvențierea și analiza metagenomică a ADN-ului microbial.


Șefa laboratorului științific
„Biologia cancerului”

Cercetător coordonator COLONSTRESS

dr.șt.biol., conf. cercet.

Valentina STRATAN



MINISTERUL MEDIULUI
AL REPUBLICII MOLDOVA



МИНИСТЕРСТВО
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

AGENȚIA „MOLDSILVA”
Întreprinderea de Stat
Rezervația naturală „PRUTUL DE JOS”
MD-5320, r. Cahul, s. Slobozia Mare,
str. Nuferilor nr. 1
e-mail: prutuldejos@moldsilva.gov.md

АГЕНСТВО „MOLDSILVA”
Государственное Предприятие
„PRUTUL DE JOS”
MD-5320, г. Кагул, с. Словокия Маре
ул. Нуферилор нр. 1
e-mail: prutuldejos@moldsilva.gov.md

Nr.80 din 05.06.2023

ACT DE IMPLEMENTARE

Prin prezenta, se atestă că recomandările și metodele de cercetare a biodiversității descrise în cadrul tezei de doctor în biologie a dlui Victor SÎTNIC cu titlul „*Abordări bioinformatică în cercetarea diversității vertebratelor terestre în Republica Moldova*” sunt implementate în Î.S. Rezervația Naturală ”Prutul de Jos” în scopul studierii unor specii de vertebrate. Tehnicile moleculare descrise în lucrare sunt necesare pentru identificarea speciilor rare și pe cale de dispariție, diferențierea speciilor criptice, genotipare și diferențierea între hibrizi și liniile pure, monitorizarea vectorilor bolilor infecțioase, s.a.

Director
Î.S. Rezervația naturală
„PRUTUL DE JOS”



Gheorghe Vasilica



MINISTERUL MEDIULUI
AL REPUBLICII MOLDOVA
AGENȚIA „MOLDSILVA”
Întreprinderea de Stat
Rezervația Naturală
„PĂDUREA DOMNEASCĂ”
MD-4900, or. Glodeni, str. Saharov, 4
Tel. +373-249-249-98, fax +373-249-249-98
e-mail: padurea.domneasca@moldsilva.gov.md

МИНИСТЕРСТВО
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА
АГЕНСТВО „МОЛДСИЛВА”
Государственное предприятие
Природный заповедник
„Рăдуреа Домнеаскă”
MD-4900, or. Glodeni, str. Saharov, 4
Tel. +373-249-249-98, fax +373-249-249-98
e-mail: padurea.domneasca@moldsilva.gov.md

Nr. 844 din 15.08 2023

ACT DE IMPLEMENTARE

Prin prezenta, se atestă că recomandările și metodele de cercetare a biodiversității descrise în cadrul tezei de doctor în biologie a dlui Victor SÎTNIC cu titlul „Abordări bioinformatică în cercetarea diversității vertebratelor terestre în Republica Moldova” sunt implementate în Rezervația Naturală „Pădurea Domnească” în scopul studierii unor specii de vertebrate terestre. Tehnicile moleculare descrise în lucrare au fost utilizate pentru identificarea speciilor rare și pe cale de dispariție, diferențierea speciilor criptice, genotipare și diferențierea între hibrizi și liniile pure.

Au fost efectuate cercetări de genotipare a mistreților prin izolarea ADN-ului genomic a trei probe colectate pe teritoriul rezervației. Testarea efectuată a permis identificarea formei homozigote a alelei sălbatice E⁺ a genei MC1R la mistreț și s-a stabilit prezența formei pure a speciei *Sus scrofa*.

Directorul rezervației
„Pădurea Domnească”

Serghei Bucătari

Anexa 5. Certificate și diplome





This certificate is presented to

Victor Sîtnic

for the successful participation in "QuantStudio™ 5 Dx Real-Time PCR System" training course

TRAINER

Vladimir Sokolov

Field Application

Scientist

Life Sciences Solutions

DATE/LOCATION

12 Jan 2018 Chisinau



CONSILIUL
JUDEȚEAN
MUREȘ



MUZEUL JUDEȚEAN MUREȘ
MAROS MEGYEI MŰZEUM
SECȚIA DE ȘTIINȚELE NATURII

CERTIFICAT DE PARTICIPARE

Se certifică faptul că

domnul drd. VICTOR SÎTNIC

a participat la

CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ ANIVERSARĂ

**60 DE ANI DE MUZEOLOGIE ÎN DOMENIUL
ȘTIINȚELOR NATURII LA MUZEUL JUDEȚEAN MUREȘ**

Tîrgu Mureș

31 octombrie – 2 noiembrie 2018



Soós Zoltán

Manager, Muzeul Județean Mureș



STATEMENT OF ACCOMPLISHMENT

#8120747

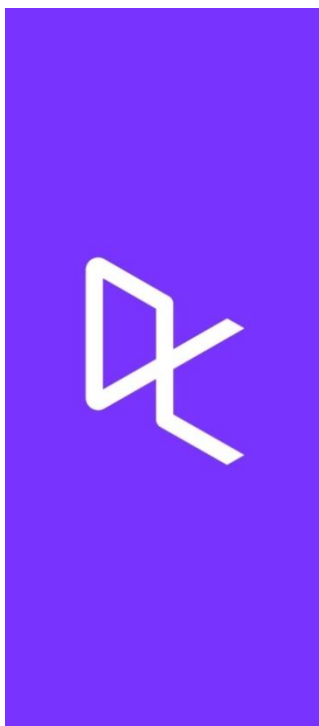
HAS BEEN AWARDED TO

Victor Sitnic

FOR SUCCESSFULLY COMPLETING

Introduction to Python

COMPLETED ON
Jul 01, 2020



STATEMENT OF ACCOMPLISHMENT

#174,107

HAS BEEN AWARDED TO

Victor Sitnic

FOR SUCCESSFULLY COMPLETING

R Programming Track

COMPLETED ON
SEP 10, 2020



Martijn Theuvsen, CEO





ATTENDANCE CERTIFICATE

We hereby declare that **Victor Sitnic** attended online at 28 horas of the the Climbats Training School Course - **Molecular Analysis of Trophic Interactions** - organized by Cost Action 18107 - Climate Change and Bats: from Science to Conservation, from 20th to 24th of September 2021, coordinated by Vanessa Mata (CIBIO-InBIO) and Owen Wangenstein (UiT The Arctic University of Norway).

September 24, 2021


Vanessa Mata
(CIBIO-InBIO)



EBCG '22 School

Certificate of completion

This is to confirm that **Victor Sitnic** has successfully completed the East European Bioinformatics and Computations Genomics School courses including:

- Methods for phylogenetic analysis and viral evolution
- Human Genome Diversity in Population and Evolutionary Context
- Bioinformatics as a career option: How to get started
- Translational Bioinformatics: application in medicine and public health
- State of the art algorithms used in genome sequence analysis


Vasili Braga
COR Director


Serghei Mangul
EBCG School Coord.

September 21 - October 14
Chişinău, Mediacor





CERTIFICAT

Nº CIC-IX 018

Se atestă că



SÎTNIC Victor

a participat la a IX-a ediție a
Conferinței științifico-practice internaționale INSTRUIRE PRIN CERCETARE PENTRU
O SOCIETATE PROSPERĂ, cu lucrarea „, ADN-UL DE MEDIU – INSTRUMENT DE
MONITORIZARE A DIVERSITĂȚII VERTEBRATELOR TERESTRE”,

se certifică cu 4 credite

Rector al UST,
Eduard COROPCEANU



19 – 20 martie 2022

DATA



The National Conference with international participation

**„LIFE SCIENCES IN THE DIALOGUE OF GENERATIONS:
CONNECTIONS BETWEEN UNIVERSITIES, ACADEMIA AND
BUSINESS COMMUNITY”**



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

presented to

Sitnic Victor

for participated during this conference.

Academician Maria DUCA



Chair of the Organizing Committee



September 29-30, 2022, Chisinau, Republic of Moldova

DIPLOMĂ DE GRATITUDINE

SE CONFERĂ



Domnului Victor Sîtnic

CERCETĂTOR ȘTIINȚIFIC

PENTRU ACTIVITATEA ÎN DOMENIUL ZOOLOGIEI ȘI CU PRILEJUL ANIVERSĂRII DE
60 DE ANI DE LA FONDAREA INSTITUTULUI DE ZOOLOGIE



Profesor
Director al Institutului de Zoologie

Laurenția Ungureanu

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnatul, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat, sunt rezultatul propriilor cercetări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

SÎTNIC Victor

Data: 23 august 2023

Semnătura 

CURRICULUM VITAE

Informații personale



Victor SÎTNIC

Adresă: str. Vasile Alecsandri 27A, MD-4839, Stăuceni, Moldova

Mobil: (+373) 69424263

Email: sitnic.md@gmail.com

Sex: Masculin

Data nașterii: 22/05/1985

Naționalitate: Republica Moldova, România

Experiența profesională

2017 – Prezent

Cercetător științific

Institutul de Zoologie, Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău

Activități și responsabilități principale: cercetarea diversității vertebratelor terestre din Moldova cu utilizarea metodelor bioinformatică și molecular biologică.

2017 – Prezent

Cercetător științific

IMSP Institutul Oncologic, Chișinău

Activități și responsabilități principale: analiza datelor molecular genetice.

2015–2016

Cercetător științific stagiar

Laboratorul de bioinformatică, Universitatea Academiei de Științe, Chișinău

Activități și responsabilități principale: analiza datelor molecular biologică.

2010 – 2014

Cercetător științific stagiar

Institutul de Zoologie, Academia de Științe din Moldova, Chișinău

Activități și responsabilități principale: cercetarea biochimiei veninului de viperă.

2009 – 2010

Manager de vânzări

NITECH SRL, Chișinău

Activități și responsabilități principale: vânzare aparatură de laborator.

Educație și formare

2007–2008

Master în Biologie (Biologie umană și animală)

Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău

2002–2007

Licențiat în Biologie (Biochimie și biologie moleculară)

Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău

Aptitudini și competențe

Limba maternă
Limbi străine cunoscute

Română
Engleză, rusă

Autoevaluare

Înțelegere		Vorbire		Scriere
Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	Exprimare scrisă
B2	C1	B2	B2	C1
C1	C1	B2	B2	B2

Engleza

Rusa

Competențe și aptitudini de
utilizare a calculatorului
Competențe și abilități sociale
Competențe și
aptitudini tehnice
Permis de conducere

Windows, Ubuntu, OBITools , Limbajul R,
Bioconductor, Cytoscape, Microsoft Office.
Comunicare deschisă cu colegii, evitarea și aplanarea conflictelor.
Utilizarea echipamentului performant în laboratorul
de biologie moleculară și pe teren.
Categorii B.

Informații suplimentare

Bursa de excelență a guvernului Republicii Moldova (2011-2012)
Bursa de excelență a Federației Mondiale a Oamenilor de Știință (2020-2021)
Cursuri în domeniul bioinformaticii și biologiei moleculare
Peste 50 publicații în țară și peste hotare
Participare în mai multe proiecte științifice naționale și transfrontaliere
Cca 25 participări la evenimente științifice naționale și internaționale
Coautor a două brevete de invenție
Membru al Societății de Biochimie și Biologie Moleculară din Moldova