

Diversitatea genetică

Subpopulațiile de sturioni anadromi diferă în ceea ce privește calendarul de migrație, timpul petrecut în râuri, locurile unde se reproduc, cerințele habitatelor specifice fiecărui stadiu de viață din ciclul de dezvoltare (Nelson et al. 2013). Informații despre diversitatea genetică intraspecifică sunt foarte importante pentru identificarea subpopulațiilor pentru a fi gestionate ca unități de management distincte (Krieger and Fuerst 2009). Conservarea diversității genetice a unei specii necesită înțelegerea tuturor acestor aspecte complexe cât și un management adecvat de exploatare în consecință (Nelson et al. 2013).

Managementul adecvat trebuie să țină cont de structura genetica (unități reproductive) ale unei populații astfel că aceste acțiuni să nu aibă efecte negative asupra acesteia (Miller and Kapuscinski 2003). De exemplu, pentru populațiile de sturioni din Marea de Azov, selecția pentru programele de populare a femelelor de păstrugă și nisetră care migrau primăvara devreme pentru reproducere, a dus la scurtarea în mai puțin de 15 ani a perioadei de reproducere naturală de la câteva luni la doar două săptămâni, în aprilie și mai (Chebanov et al. 2002).

Este cunoscut că sturionii dunăreni (morunul, nisetrul, păstruga) migrează pentru reproducere din Marea Neagră în fluviu în grupuri separate: de toamnă și de primăvară (Antipa 1909, Shubina et al. 1989). Comportamente de migrație distincte pot indica segmente de populație diferite (Waples et al. 2001) care necesită măsuri de conservare speciale / separate în unități de management distincte.

Studiile noastre recente de diversitate genetică la populațiile de morun și păstrugă, bazate pe analize PCR-RFLP a regiunii de control a ADN-ului mitocondrial, au identificat prezența a 4 haplotipuri la morun și că migrația puilor de morun spre mare se realizează în grupuri succesive (Onăra et al. 2014) iar la păstrugă existența unei structurări a populației și a producerilor succesive în același an (Holostenco et al. 2013).

Datele de literatură indică faptul că juvenilii speciilor de sturioni anadromi din Dunărea inferioară migrează către mare în primul lor an de viață și se hrănesc aproape de gurile de vărsare a Dunării (Antipa 1909).

Studiile recente au evidențiat sectorul nordic al zonei marine a României (în special Zătoane, Sahalin, Sf. Gheorghe și Sulina) ca habitat de hrănire pentru puii, juvenilii și subadultii de păstrugă, morun și nisetră, zonă folosită preponderent de păstrugi primăvara iar de moruni toamna (Maximov et al. 2014), aceasta distribuție spațială și temporală (Holostenco et al. 2013, Maximov et al. 2014) sugerând existența unei interdependențe a dinamicii speciilor de sturioni și a dinamicii disponibilității faunei de fund în zonele Zătoane, Sahalin, Sf. Gheorghe și Sulina.

Analizele de diversitate genetică prin metoda PCR-RFLP a regiunii *D-loop* din ADNmt, au evidențiat, în zonele de hrănire menționate mai sus, existența a 3 haplotipuri la morun din cele 4 identificate

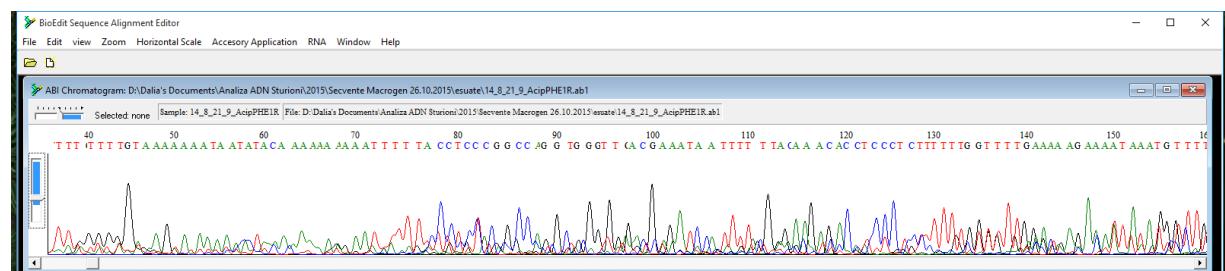
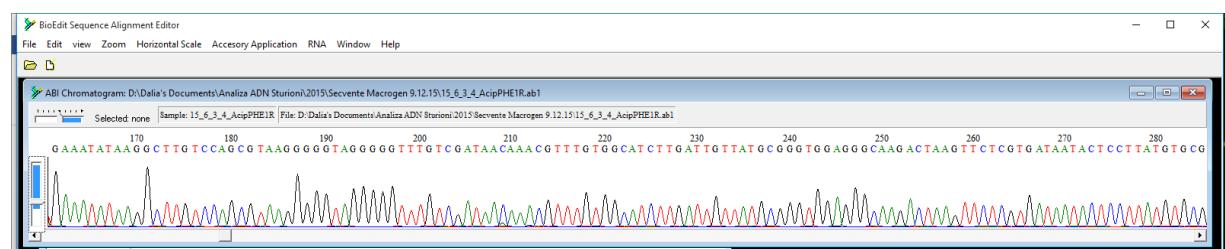
anterior în Dunărea Inferioară iar la păstrugă 7 haplotipuri din cele 11 identificate în Dunărea Inferioară, cu cea mai mare diversitate genetica în zonele Sahalin- Zătoane (6 haplotipuri din cele 7 identificate în sectorul nordic al zonei marine a României). Dată fiind variabilitatea considerabilă identificări la nivel de ADNmt și faptul că păstrugile migrează în Dunăre primăvara devreme, vara și toamna (Holostenco *et al.* 2012), diferențierea acestor subgrupuri din punct de vedere genetic este esențială pentru un management adecvat a acestor subpopulații.

Având în vedere importanța zonelor de hrănire din zonele Golfului Musura și Sahalin Zătoane în România precum și a zonelor de hrănire și iernare cunoscute în NW Marii Negre (Ucraina), acest studiu are ca scop investigarea diversității genetice a exemplarelor capturate în aceste zone cunoscute ca habitate esențiale pentru sturioni pentru a identifica eventuale subgrupări în structura genetică a populațiilor. În plus, analiza diversității genetice a sturionilor a ținut cont de existența puilor și juvenililor de sturioni populați în Dunăre începând cu anul 2005.

Pentru studiul diversității genetice a fost aleasă regiunea *D-loop* din ADNmt. ADNmt este prezent în mii de copii în fiecare celulă iar regiunea *D-loop*, datorită ratei mari de mutații poate fi folosită cu succes în studiul diversității genetice la nivel populațional (*Doukakis et al.* 2005).

În urma secvențierii directe a regiunii *D-loop* au rezultat un număr de 188 de secvențe de nucleotide de morun, 128 de nisetru și 135 de păstrugă.

Dintre aceste secvențe, unele au prezentat calitate slabă, fiind contaminate sau existând produși PCR nespecifici datorați degradării accentuate a ADN-ului. Diferența dintre o secvență de nucleotide cu rezoluție bună și una contaminată sau provenind dintr-o probă degradată, este ilustrată următoare.



Cromatogramă reprezentând o secvență de nucleotide cu rezoluție bună (sus) și una contaminată sau provenind dintr-o probă degradată (jos).

În urma alinierii secvențelor de nucleotide utilizând Clustal W (BioEdit), s-a constatat faptul că o parte dintre probele analizate au fost eronat clasificate sau contaminate în timpul prelevării. Alte secvențe de nucleotide prezintau numeroase erori (diferențe) comparative cu marea majoritate a secvențelor, motiv pentru care au fost excluse din studiu. Codurile acestor secvențe se regăsesc în Tabel 1.

Tabel. 1. Probele de sturioni reclasificate sau eliminate din studiu din cauza numărului mare de erori în secvența de nucleotide. B reprezintă morun, G – nisetru, S-păstrugă

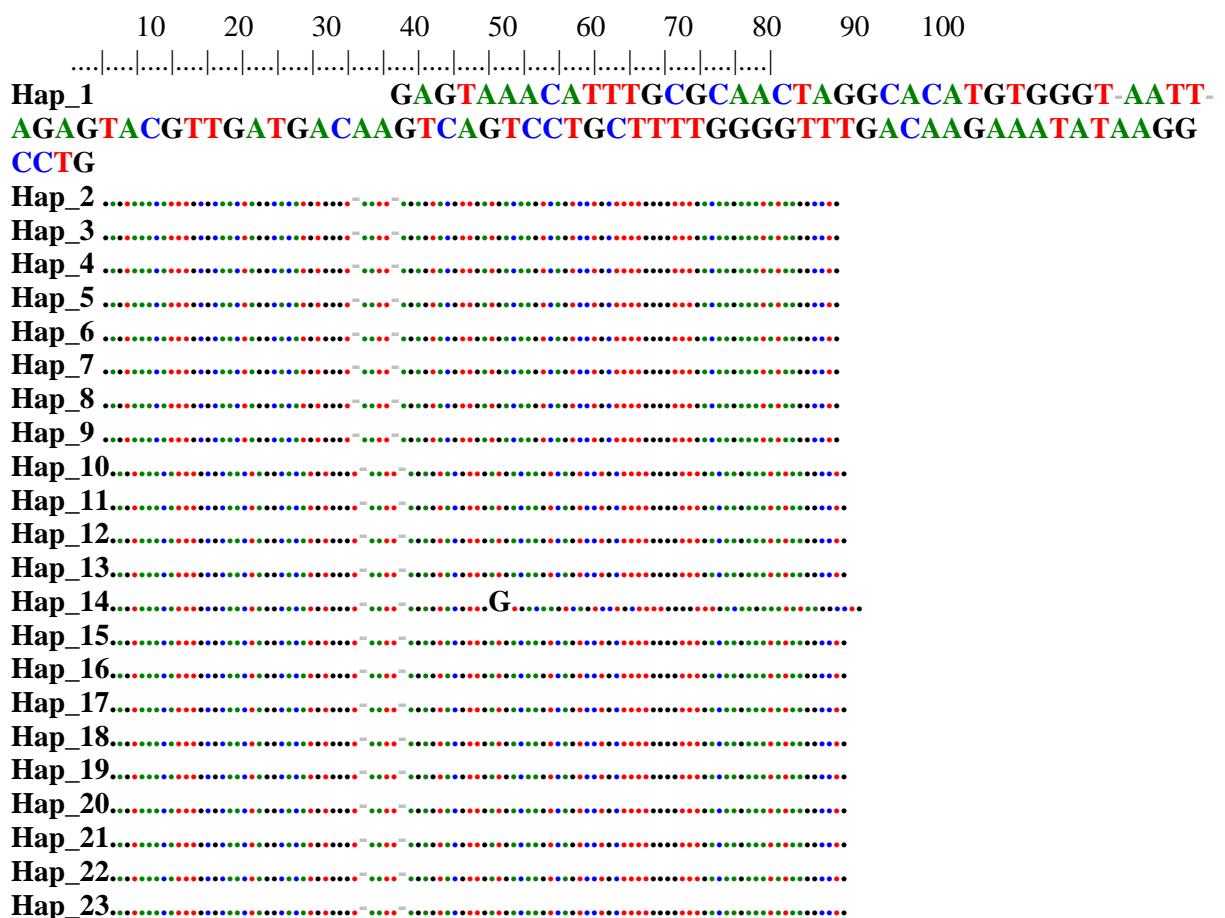
Cod proba	Specie înregistrată	Reclasificate după secvențiere / probe contaminate	Eliminate din analiza secvențelor (Nr. mare de erori)
14_4_3_2	B	<i>A. baeri</i> sau <i>A. gueldenzaedtii - baerilike</i>	nu
14_4_3_3	B	<i>A. baeri</i> sau <i>A. gueldenzaedtii - baerilike</i>	nu
14_4_3_4	B	<i>A. baeri</i> sau <i>A. gueldenzaedtii - baerilike</i>	nu
14_4_3_5	B	<i>A. baeri</i> sau <i>A. gueldenzaedtii - baerilike</i>	nu
15_7_3_7	G	<i>A. baeri</i> sau <i>A. gueldenzaedtii - baerilike</i>	nu
14_6_1_23	G	B	nu
14_8_18_2	S	B	nu
14_7_1_2	G	S	nu
14_7_6_1	G	S	nu
14_7_2t_2	G	S	nu
14_7_1_2	G	S	nu
14_7_6_1	G	S	nu
14_7_8_2	G	S	nu
14_7_9_3	G	S	nu
14_8_12_4	B		da
14_7_4v_16	B		da
14_7_3v_9	S		da
14_7_4d_1	S		da
14_7_4d_2	S		da
14_8_21_1	S		da
14_8_21_2	S		da
14_8_21_9	S		da
14_8_21_16	S		da
14_8_22_8	S		da
15_8_25_5	S		da
14_8_4_9	G		da

14_8_8_14	G		da
14_8_9_12	G		da
14_8_12_14	G		da
15_7_2_9	G		da

Morun

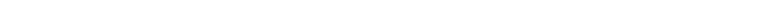
Analiza secvențelor de nucleotide s-a realizat folosind un număr de 183 de secvențe de nucleotide, provenind de la 166 de pui și subadulți sălbatici și 17 exemplare populate în cadrul Programului de Populare de Susținere a Dunării cu pui de sturioni.

Cele 183 de secvențe de nucleotide reprezintă un număr de 37 de haplotipuri (Fig. 7), care diferă între ele prin 66 de substituții și 4 inserții – deletii.



Hap_8
Hap_9
Hap_10
Hap_11
Hap_12
Hap_13 C
Hap_14
Hap_15
Hap_16
Hap_17 G
Hap_18
Hap_19 G.
Hap_20
Hap_21
Hap_22
Hap_23 C
Hap_24 G.
Hap_25
Hap_26 C A
Hap_27 C
Hap_28 A C
Hap_29 G.
Hap_30 G.
Hap_31 C C
Hap_32 G.
Hap_33 G.
Hap_34 C
Hap_35
Hap_36
Hap_37

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500



Hap_1 TGGTACCTCTAACATTAATCAGATGCCAGTAGTAGCTTATTATGGGGAAATAACTGT
TGATGGACTTGAATAGGAGCCAGATGTTAGTAATAATTCACT
Hap_2 ..T.....A.....G.....A.....
Hap_3A.....
Hap_4 ..T.....A.....CC.....
Hap_5A.....
Hap_6A.....
Hap_7A.....
Hap_8 ..T.....A.....A.....
Hap_9A.....G.....A.....
Hap_10A.....
Hap_11
Hap_12 ..T.....A.....A.....
Hap_13 ..T.....A.....G.....A.....
Hap_14A.....
Hap_15 ..T.....A.....A.....
Hap_16 ..T.....A.....A.....
Hap_17 ..T.....A.....CC.....
Hap_18A.....
Hap_19 ..T.....A.....CC.....
Hap_20 ..T.....A.....A.....

Phylogenetic tree showing the evolutionary relationships between 33 haplotypes (Hap_1 to Hap_33). The tree is rooted at the bottom and branches upwards. Each haplotype is represented by a horizontal line with colored dots representing genetic markers. The markers are colored according to their sequence: A (green), T (red), C (blue), and G (black). The tree shows a clear separation into two main clades: one containing Hap_1 through Hap_18, and another containing Hap_19 through Hap_33. Hap_1 is the root of the tree. The markers are numbered along the x-axis from 510 to 600.

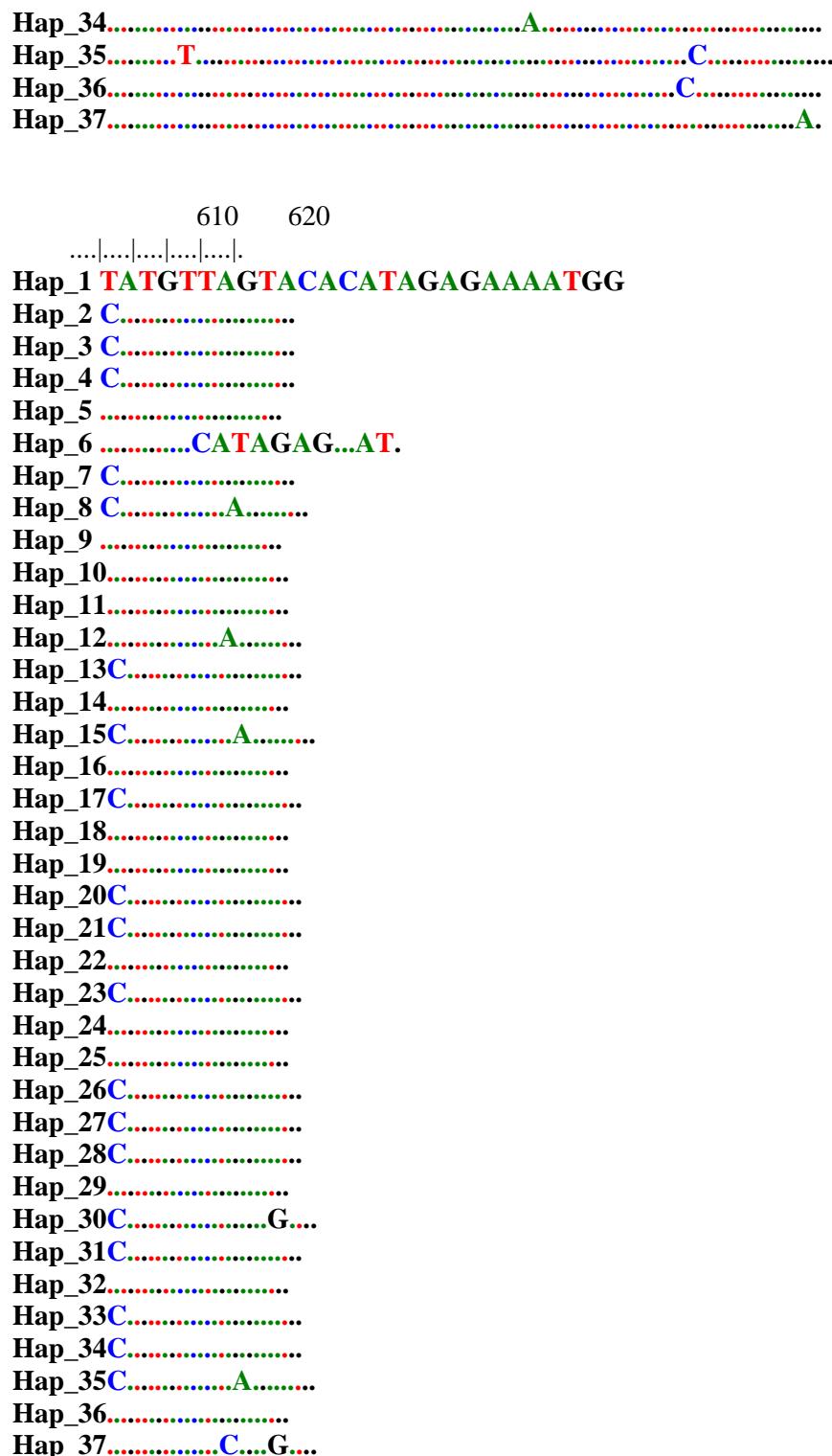


Fig. 43. Aliniere folosind programul Clustal W a secvențelor pentru regiunea D-loop reprezentând 37 de haplotipuri identificate în cele 183 de probe de pui și juvenili de morun analizate. Numerele reprezintă poziția ocupată în aliniamentul realizat cu Clustal W. Siturile identice sunt indicate prin simbolul „·”, iar gap-urile (deletiile) sunt indicate prin simbolul „-“.

Tabel 2. Indicii diversității moleculare la cele 183 de secvențe D-loop obținute de la exemplarele morun analizate(Output Arlequin software).

=====

== Molecular diversity indices : (All_Seqs)

=====

Samplesize : 183
No. of haplotypes : 37
Deletionweight : 1.0
Transitionweight : 1.0
Transversionweight : 1.0
Allowedlevel of missing data : 5.0 %
Number of observedtransitions : 55
Number of observedtransversions : 11
Number of substitutions : 66
Number of observedindels : 4
Number of polymorphicsites : 68
Number of observedsiteswithtransitions : 55
Number of observedsiteswithtransversions : 11
Number of observedsiteswithsubstitutions : 65
Number of observedsiteswithindels : 4
Number of observednucleotidesites : 623
Number of usablenucleotidesites : 623

Nucleotidecomposition (Relative values)

C : 15.39%

T : 31.14%

A : 27.57%

G : 25.90%

Total :100.00%

Gradul de înrudire între cele 37 de haplotipuri identificate la morunii inclusi în studiu este ilustrat în Fig. 8.

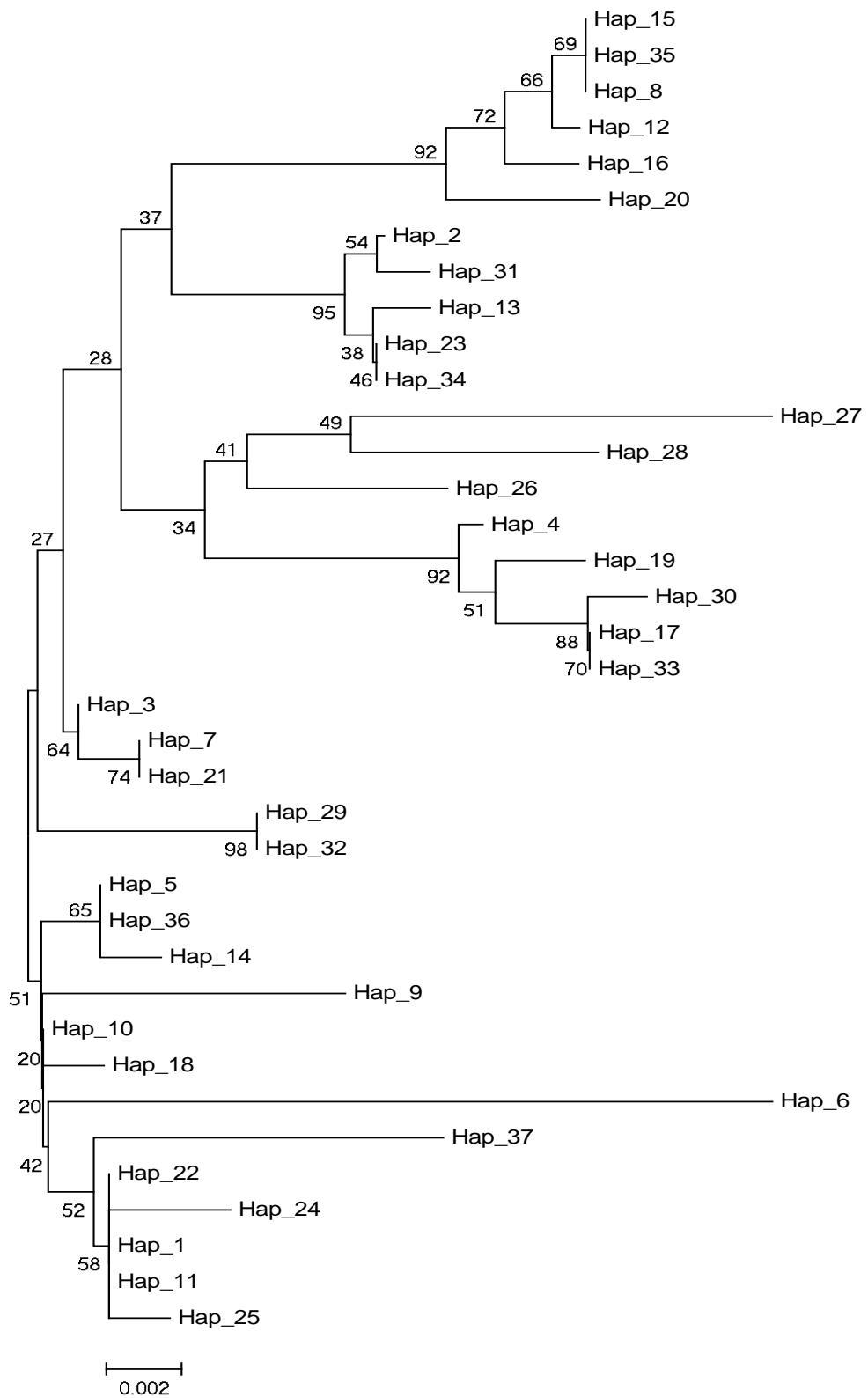


Fig. 44: Arbore filogenetic ilustrând relațiile de înrudire a haplotipurilor *D-loop*, din ADNmt la morunii analizați (N=183), realizat prin metoda NeighborJoining pe baza secvențelor de nucleotide

Aceste 37 de haplotipuri au frecvențe diferite în cadrul eșantionului populației analizate, regăsindu-se în proporții diferite din punct de vedere spațial (Fig. 45).

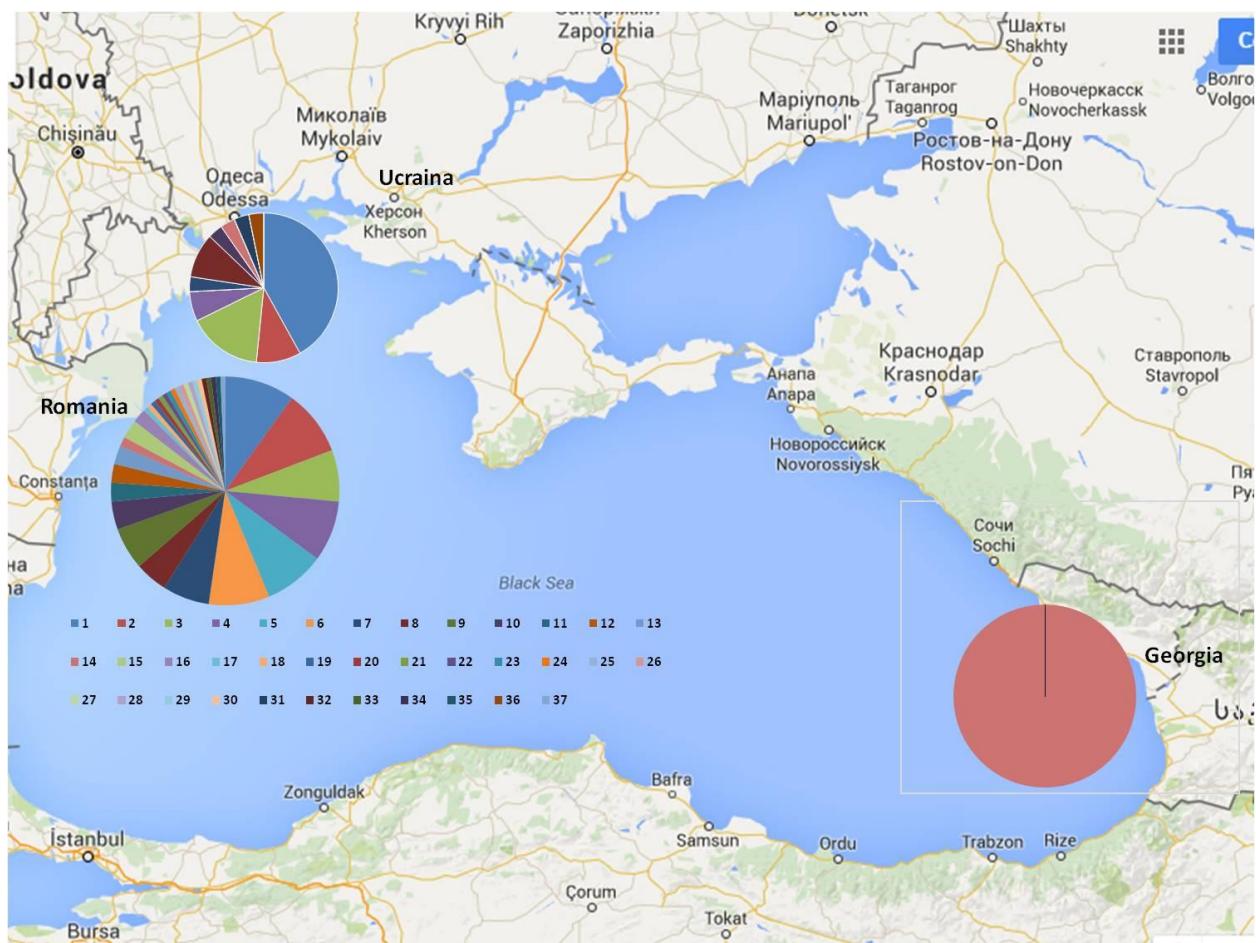


Fig. 45: Numărul și frecvența haplotipurilor *D-loop* la morun identificate în prezentul studiu (Romania N=151, Ucraina N=31, Georgia N=1).

De asemenea, se observă faptul că numărul de haplotipuri identificate în grupul de probe de la morunii populați este foarte redus deoarece acești pești provin dintr-un număr mic de femele ce au fost utilizate pentru reproducere controlată în crescătorii (Tabel 3).

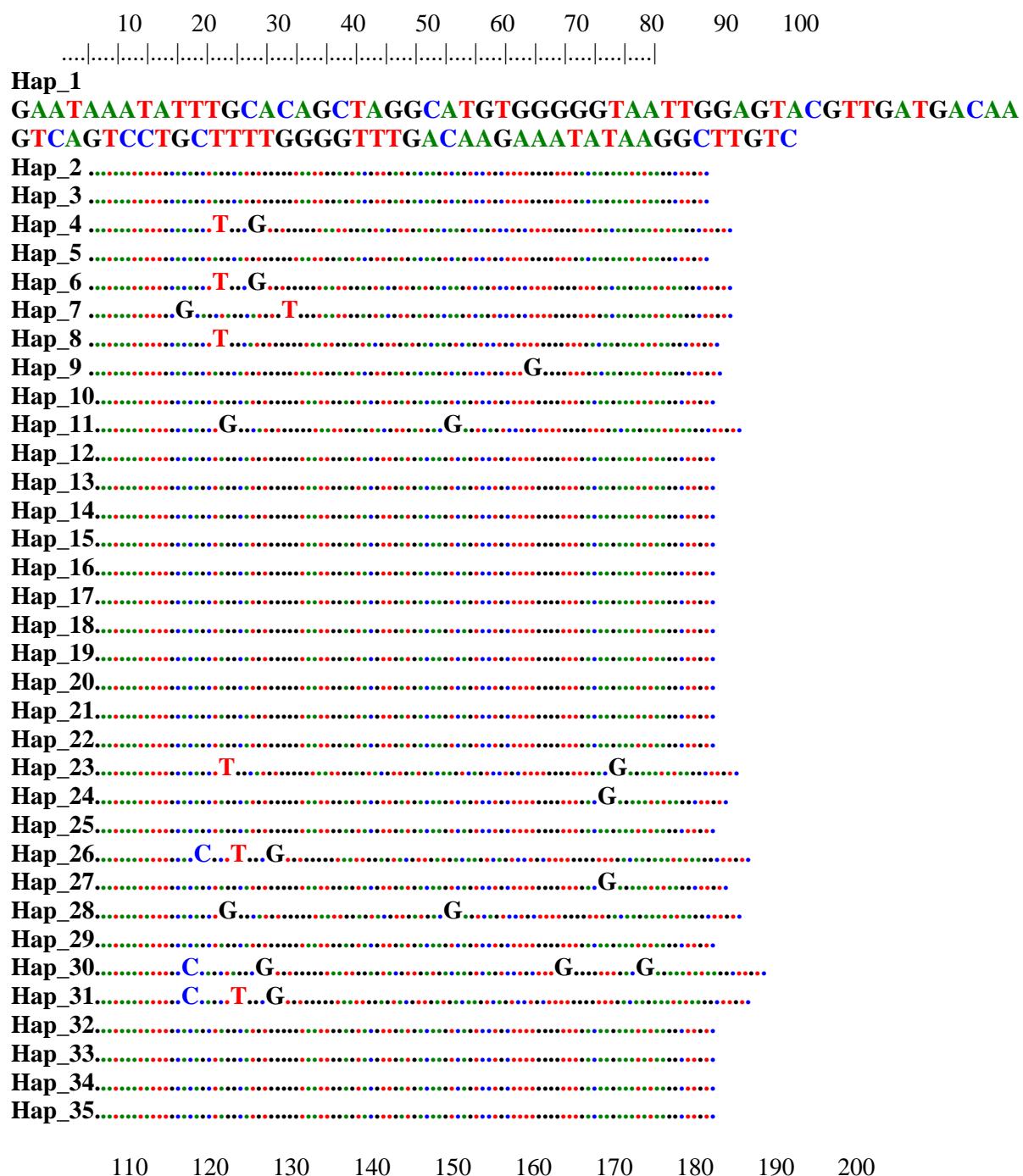
Tabel 3. Numărul de moruni sălbatici și populați incluși în studiu din fiecare zonă geografică și numărul de haplotipuri identificat.

Proveniența probelor	Moruni sălbatici	Nr haplotipuri moruni sălbatici	Moruni populați	Nr haplotipuri moruni populați
Romania	140	37 /37	11	3/37
Ucraina	25	10 /37	6	1/37
Georgia	1	1 /37	0	0/37
Total	166		17	

Nisetru

Analiza secvențelor de nucleotide s-a realizat folosind un număr de 117 de secvențe de nucleotide, provenind de la 60 de pui și subadulți sălbatici și 57 exemplare populate în cadrul Programului de Populare de Sustinere a Dunării cu pui de sturioni.

Cele 117 de secvențe de nucleotide reprezintă un număr de 35 de haplotipuri (Fig. 10), care diferă între ele prin 124 de substituții și 8 inserții – deletii (Tabel 4).



Hap_14	A	CC	A	A	G	T	G	GTGA
Hap_15			A		C	T		
Hap_16						G		C
Hap_17						G		C
Hap_18						G		C
Hap_19					T	T		T
Hap_20					T	T		
Hap_21								
Hap_22					T	T		T
Hap_23								
Hap_24	T			C	G	T	TG	
Hap_25		G		T	T	T		A
Hap_26		G		T	T	T		TC
Hap_27						G	T	C
Hap_28						G		C
Hap_29				T		T		
Hap_30				T	T	T		T
Hap_31								
Hap_32					T		T	
Hap_33					T	G	T	C
Hap_34	T			C	G	T	TG	
Hap_35					T	CT	T	T

Sequence logo showing the distribution of nucleotides (A, T, C, G) across positions 410 to 500 for 35 haplotypes. The x-axis represents positions 410 to 500. The y-axis lists haplotypes from Hap_29 at the top to Hap_35 at the bottom. Colored dots represent the frequency of each nucleotide at each position. A red box highlights a conserved motif 'CCT' at positions 410-430 for Hap_29 through Hap_35.

A horizontal number line starting at 510 and ending at 600. The numbers are placed above the line, and there are tick marks below the line at intervals of 10 units.

Hap_1
TTATGAAACTCCACAGTTATTGTCCTCATCTCATTAATTCTATGTTCCAGACAGAC
AAGAATGTTCGGCTTACTACACATCATGGTTCAGGAAATG

Hap_2**T.G**.....**C**.....**T**.....**G.T**.....
Hap_3**TTG**.....**T**.....**T**.....**G**.....
Hap_4
Hap_5**TTG**.....**C**.....**T**.....**GA**.....
Hap_6**TTG**.....**C**.....**T**.....**GA**.....
Hap_7**T**.....**T**.....**T**.....**GA**.....
Hap_8
Hap_9
Hap_10**CTAG**.....**C**.....**T.CG**.....**G**.....
Hap_11**A.A**.....**A**.....**T**.....
Hap_12**TTG**.....**C**.....**C.A**.....**CT**.....
Hap_13**T.A.C**.....**C.T**.....**T**.....**T.TC**.....**G.A**.....
Hap_14**T.A.C**.....**CCT**.....**T**.....**T.TC**.....**G.A**.....
Hap_15
Hap_16**TTG**.....**C**.....**T.G**.....**G**.....
Hap_17**TTG**.....**C**.....**T**.....
Hap_18**TTG**.....
Hap_19**TG**.....**T.A.T**.....**TG.T**.....
Hap_20**TTG**.....**C**.....
Hap_21
Hap_22**TG**.....**T.A.T**.....
Hap_23
Hap_24**TT**.....**C**.....**T**.....
Hap_25**CTAG**.....**C**.....
Hap_26**CTAG**.....**C**.....
Hap_27**CTTG**.....**C**.....**T**.....
Hap_28**TTG**.....
Hap_29**TTG**.....
Hap_30**T.G**.....
Hap_31
Hap_32**T.G**.....
Hap_33**TTG**.....
Hap_34**TT**.....
Hap_35**T.G**.....

610 620
.....|.....|.....|.....|..
Hap_1 **ACATGTTAGATCACATAGAGATAATGG**
Hap_2
Hap_3
Hap_4
Hap_5**C**.....
Hap_6**C**.....
Hap_7
Hap_8
Hap_9**T**.....
Hap_10**C**.....
Hap_11
Hap_12 **T**.....
Hap_13 **G**.....
Hap_14 **G**.....
Hap_15**A**.....

Hap_16.T.....
Hap_17.....
Hap_18.....
Hap_19.....
Hap_20.....A.....
Hap_21.....
Hap_22.....
Hap_23.....
Hap_24.....A.....
Hap_25.....C.....
Hap_26.....C.....
Hap_27.....
Hap_28.....
Hap_29.....A.....
Hap_30.....
Hap_31.....
Hap_32.....
Hap_33.....
Hap_34.....A.....
Hap_35....C.....

Fig. 47. Aliniere folosind programul Clustal W a secventelor pentru regiunea D-loop reprezentând 35 de haplotipuri identificate în cele 117 de probe de pui și juvenili de nisetră analizate. Numerele reprezintă poziția ocupată în aliniamentul realizat cu Clustal W. Siturile identice sunt indicate prin simbolul „·”, iar gap-urile (deletiile) sunt indicate prin simbolul „-“.

Tabel 4. Indicii diversității moleculare la cele 117 de secvențe D-loop obținute de la exemplarele de nisetră analizate (Output Arlequin software).

```
=====
== Molecular diversity indices : (All_Seqs)
=====

Samplesize          : 117
No. of haplotypes : 35
Deletionweight    : 1.0
Transitionweight   : 1. 0
Transversionweight : 1.0
Allowedlevel of missing data      : 5.0 %
Number of observedtransitions     : 95
Number of observedtransversions   : 29
Number of substitutions         : 124
Number of observedindels        : 8
Number of polymorphicsites      : 117
Number of observedsiteswithtransitions : 93
Number of observedsiteswithtransversions : 29
```

Number of observedsiteswithsubstitutions : 110

Number of observedsiteswithindels : 8

Number of observednucleotidesites : 625

Number of usablenucleotidesites : 625

Nucleotidecomposition (Relative values)

C : 17.06%

T : 30.34%

A : 28.76%

G : 23.84%

Total :100.00%

Gradul de înrudire între cele 35 de haplotipuri identificate la nisetrii inclusi în studiu este ilustrat în

Fig. 11.

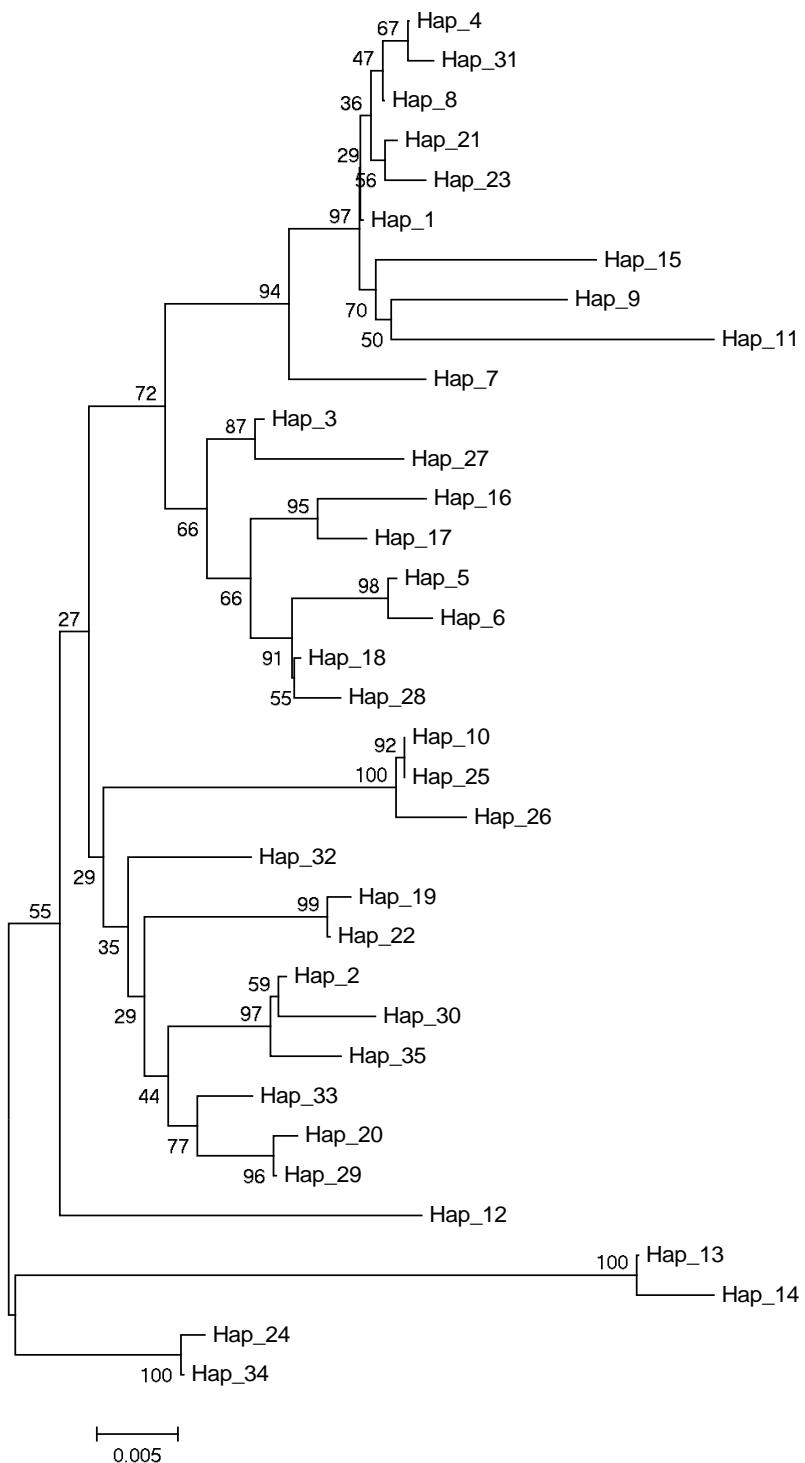
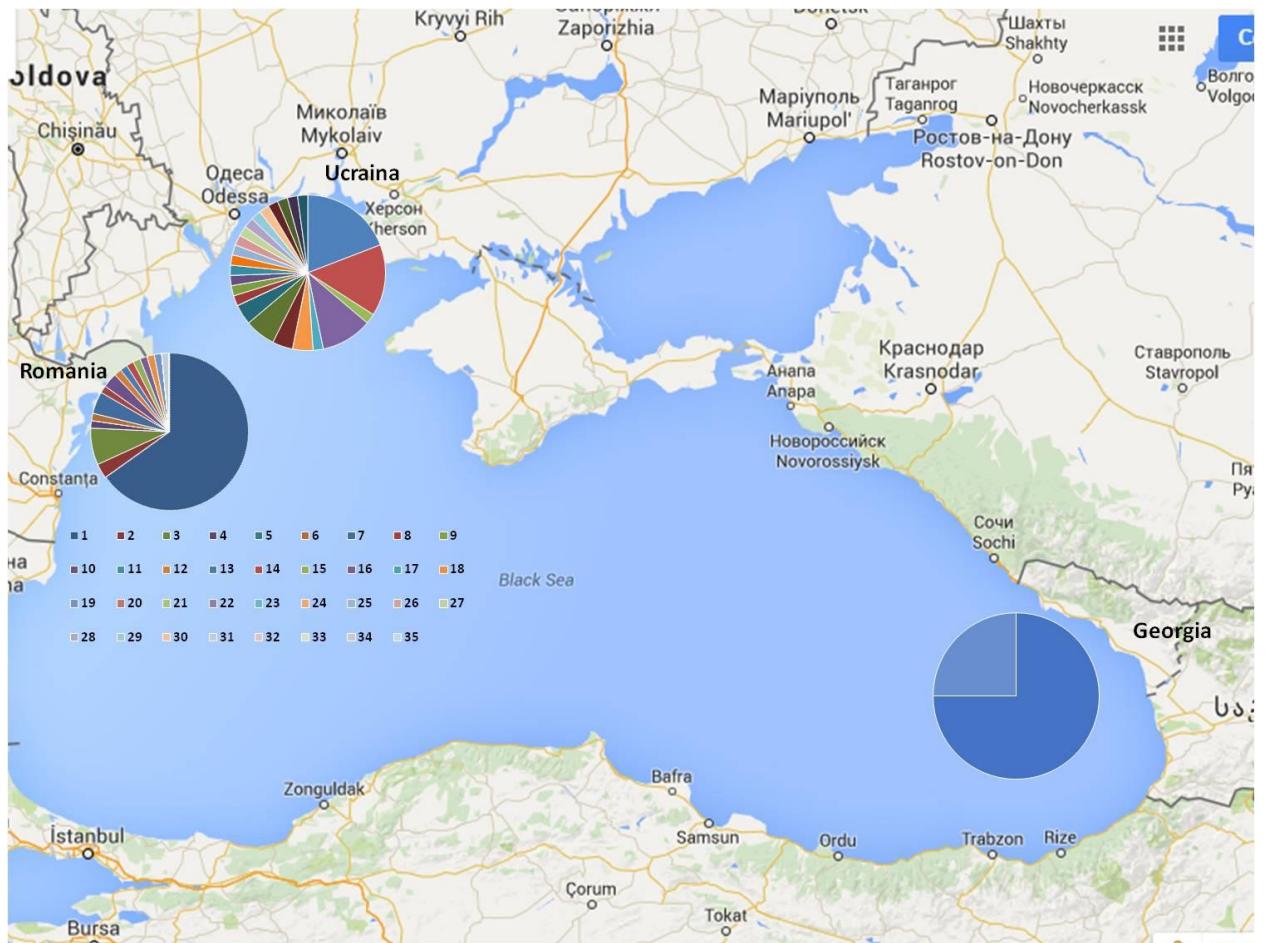


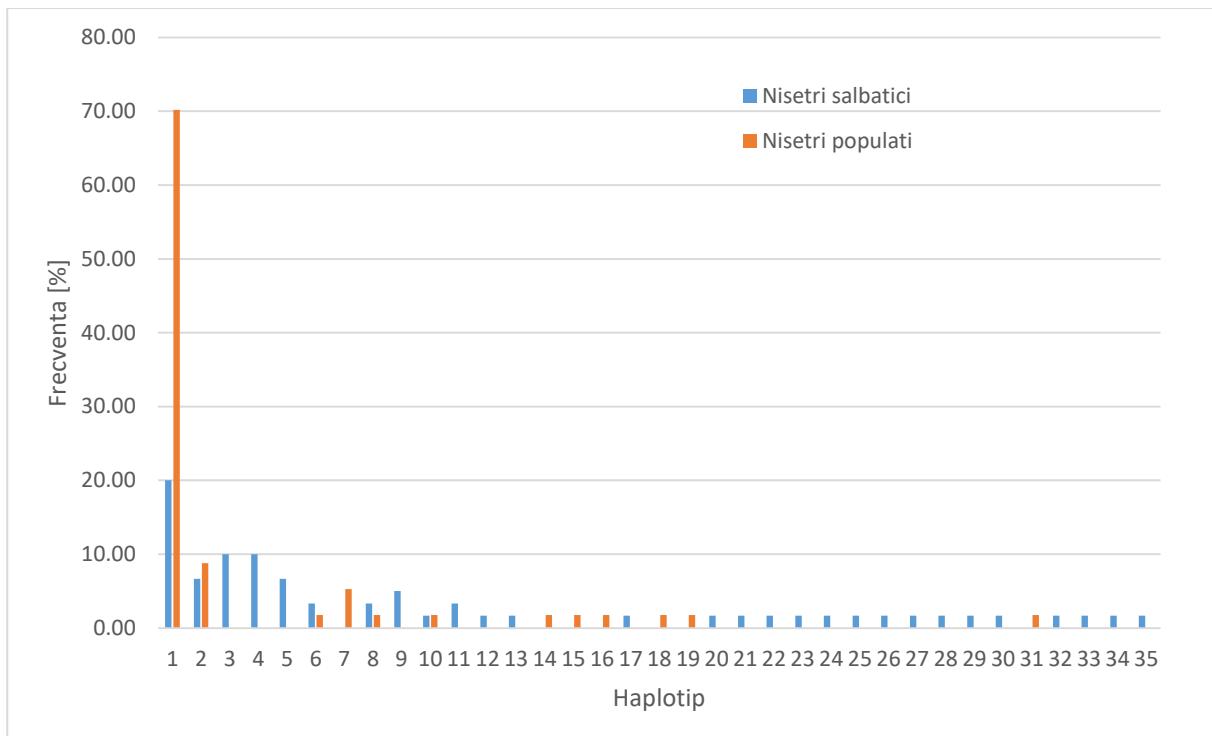
Fig. 48. Arbore filogenetic ilustrând relațiile de înrudire a haplotipurilor *D-loop*, din ADNmt la nispetrii analizați (N=117), realizat prin metoda NeighborJoining pe baza secvențelor de nucleotide

Aceste 35 de haplotipuri au frecvențe diferite în cadrul eșantionului populației analizate, regasindu-se în proporții diferite din punct de vedere spațial (Fig. 49) cât și ca pondere între grupurile de pești sălbatici și populați (Fig. 50).



Numărul și frecvența haplotipurilor *D-loop* la nisetrui identificate în prezentul studiu (Romania N=66, Ucraina N=47, Georgia N=4).

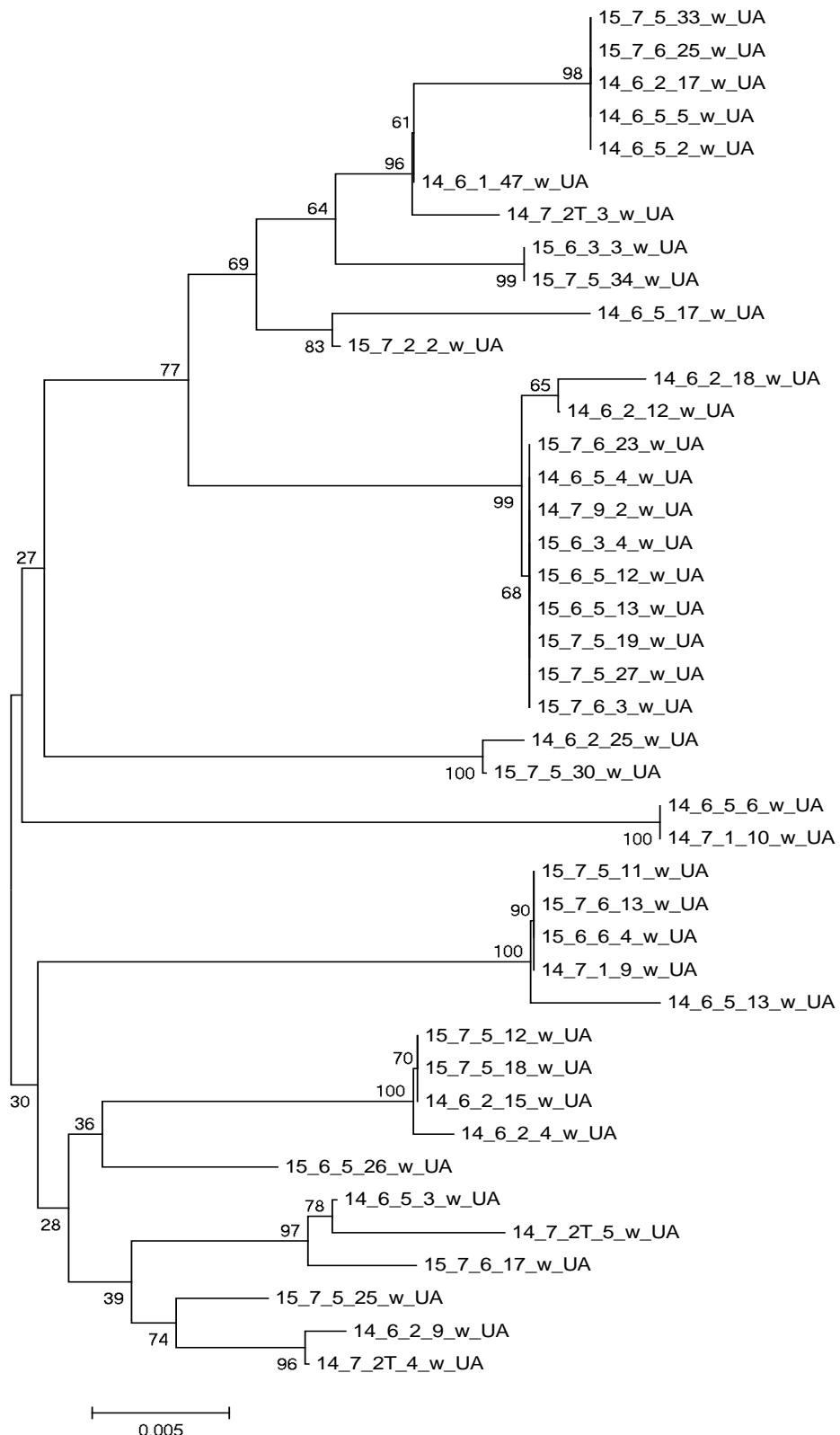
Se constată faptul că nisetrii capturați în NW Mării Negre au o diversitate genetică mult mai mare decât cei capturați la gurile de vărsare ale Dunării. Acest lucru se datorează numărului mare de juvenili și subadulții de nisetrui populați, 53 dintr-un total de 66, prezenti în zona de pescuit experimental din apropiere de Sf. Gheorghe și care provin dintr-un număr limitat de părinți, respectiv de haplotipuri (10 haplotipuri). 70% dintre nisetrii populați au același haplotip, determinând o reducere a diversității genetice în ansamblul populației.



Numărul și frecvența haplotipurilor *D-loop* identificate la nisetrii sălbatici (N=60) comparativ cu cei populați (N=57)

Analizând separat exemplarele sălbaticice de nisetru captureate în Ucraina (N=46), se constată structurarea lor în două mari grupuri, reprezentând în total de 24 de haplotipuri (Fig. 51).

Printre probele primite din Georgia și înregistrate ca moruni, au fost identificate 4 probe, 14_4_3_2, 14_4_3_3, 14_4_3_4, 14_4_3_5, cărora li se adaugă o probă din Ucraina, 15_7_3_7, care prezintă numeroase mutații punctiforme comparative cu celelalte sevențe de nisetru (Fig. 52).



Arbore filogenetic ilustrând relațiile de înrudire a secentelor de nucleotide *D-loop*, din ADNmt la nisetrii sălbatici din Ucraina analizați (N=46), realizat prin metoda NeighborJoining

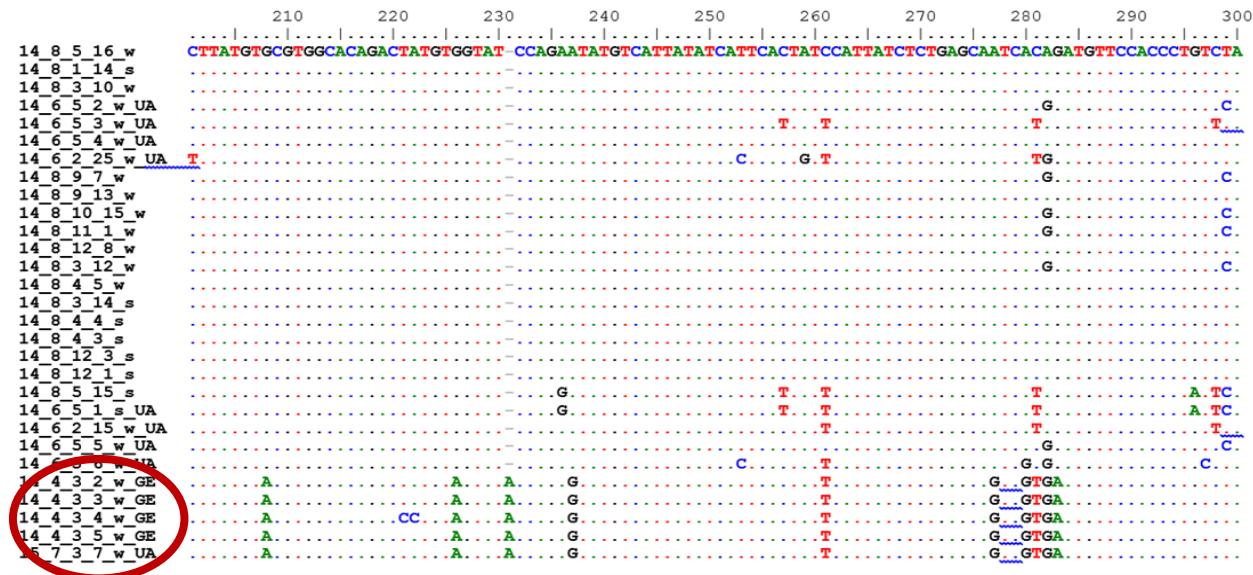
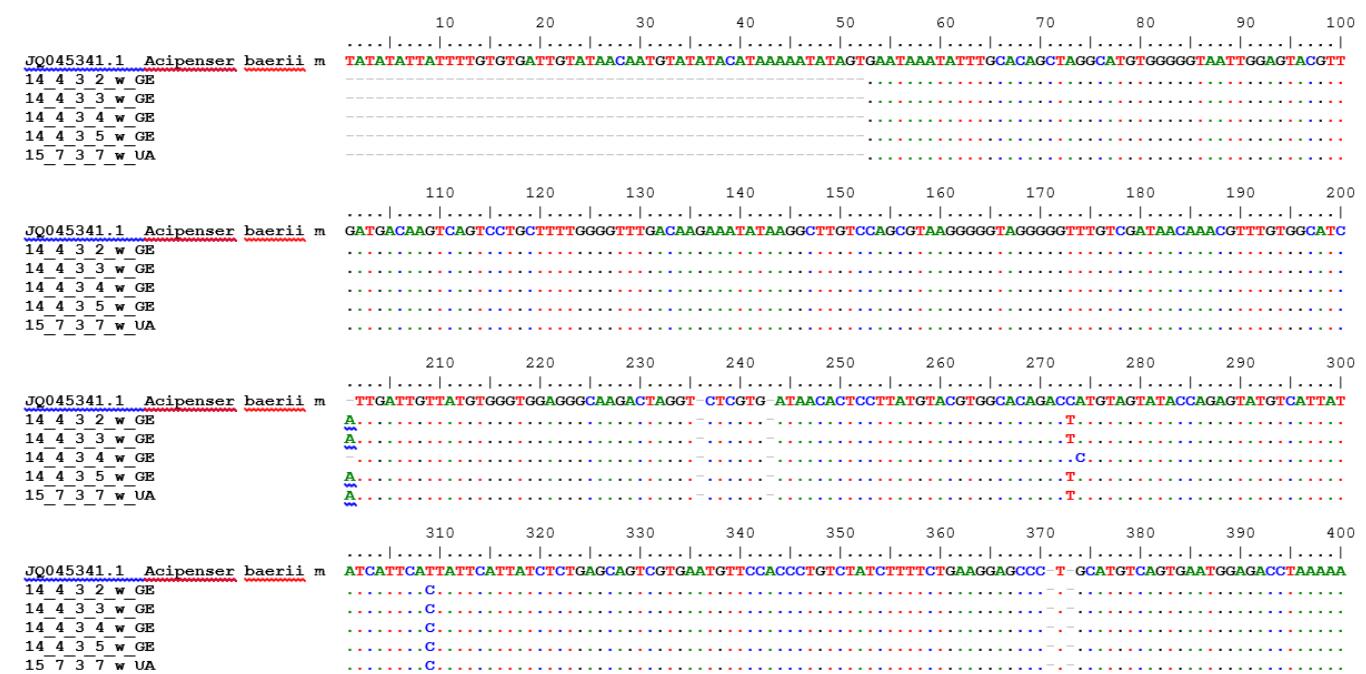


Fig. 52. Aliniere folosind programul Clustal W a unor secvențelor pentru regiunea D-loop de la pui și juvenili de nisetră analizate. Numerele reprezintă poziția ocupată în aliniamentul realizat cu Clustal W. Situsurile identice sunt indicate prin simbolul „·”, iar gap-urile (deletiile) sunt indicate prin simbolul „-“. Literele denotă mutații punctiforme. Probele încadrate cu roșu au fost identificate ca *A. baeri*.

Comparând aceste secvențe cu secvența complete a ADNmt de la *A. baeri*, înregistrată în GenBank cu numărul de acces JQ045341, se constată o similitudine de 99 % (Fig. 53), fapt ce confirma datele din literatura (Birstein et al., 2000; Jenneckens et al., 2000; Doukakis et al., 2005; Rastorguev et al., 2008; Rastorguev et al., 2013) care semnalează la nisetră existența unei genealogii mitocondriale similare sturionilor siberieni (*A. baeri*).



Aliniere folosind programul Clustal W a unor secentelor pentru regiunea D-loop de la pui și juvenili de nisetru analizate. Numerele reprezintă poziția ocupată în aliniamentul realizat cu Clustal W. Siturile identice sunt indicate prin simbolul „·”, iar gap-urile (deletiile) sunt indicate prin simbolul „-“. Literele denotă mutații punctiforme. Probele încadrate cu roșu au fost identificate ca *A. baerii*. Acipenserbaeriimochondrion, complete genomeGenBank: JQ045341.1

Există mai multe explicații cu privire la originea fenomenului "baerii - like" la nisetru. Unii autori presupun că a rezultat prin eliberarea accidentală a unor exemplare de *A. baerii* din crescătorie în fluviul Volga (Jenneckens et al., 2000), în timp ce alții sugerează că atât mitotipul - baerii cat și mitotipul majoritar *A. gueldenstaedtii* sunt ancestrale (Birstein et al., 2000). Totuși, *A. persicus* nu prezintă mitotipuri "baerii - like" (Rastorguev et al., 2008). De asemenea, este posibil ca hibridizarea dintre siberian și nisetru în timpul glaciațiunii Pleistocenului să fi condus la introgradia ADN-ului siberian mitochondrial, ca urmare a modificărilor considerabile în distribuția speciilor, care au avut loc în acea perioadă (Rastorguev et al., 2013).

Cu toate acestea, coloritul închis al tegumentului și al scuturilor (Fig. 54) la cele 5 exemplare având haplotip D-loop "baerii - like" indică faptul că aceste exemplare ar putea fi într-adevăr *A. baerii* scăpați dintr-o crescătorie sau hibrizi cu *A. baerii* eliberați în mare.



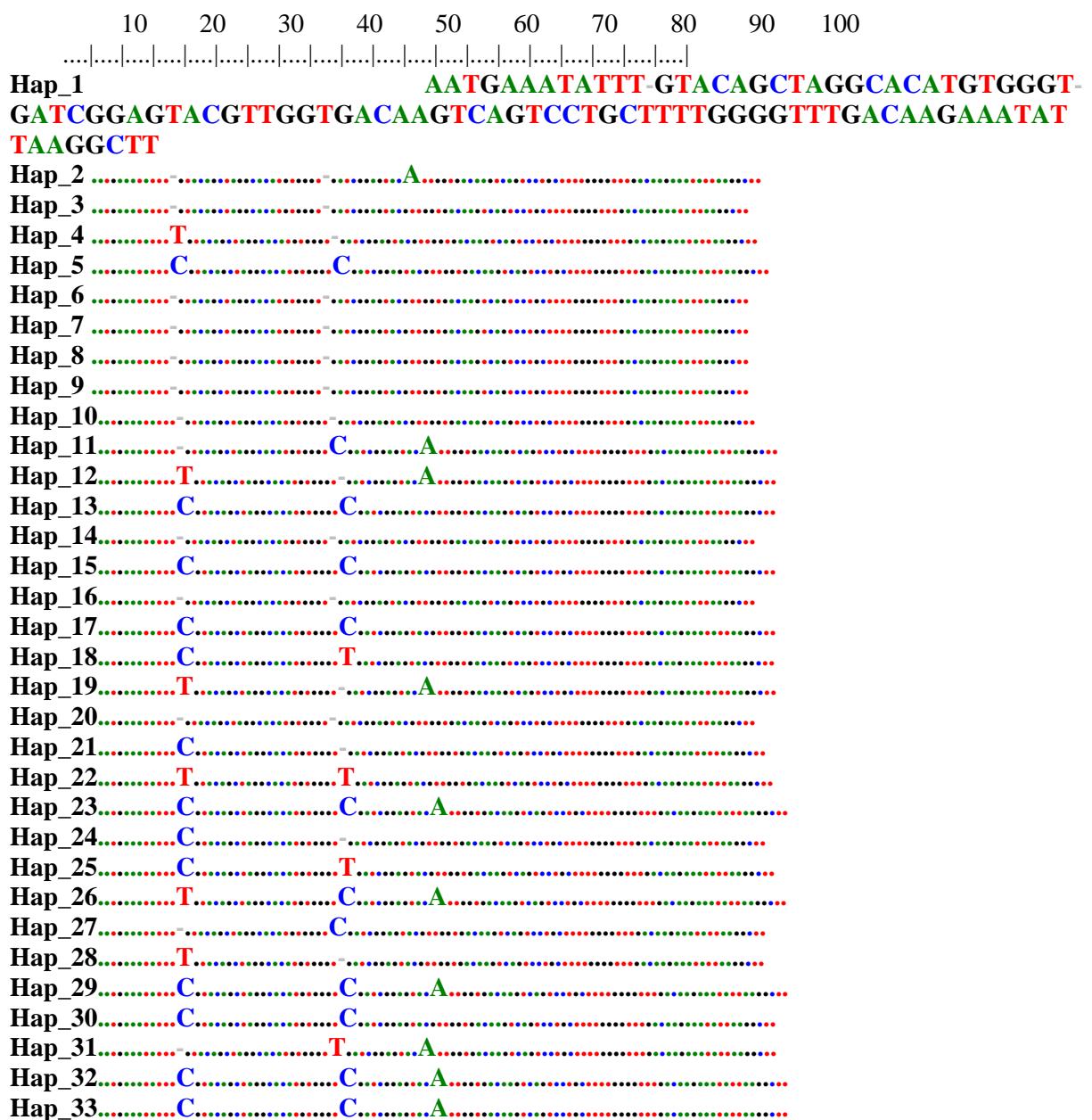
Exemplar de sturion capturat în Ucraina, având haplotip "baerii - like"

Pentru a stabili mai exact proveniența acestor pești sunt necesare analize suplimentare pe baza ADN-ului nuclear (analiza microsateliților).

Păstruga

Analiza secventelor de nucleotide s-a realizat folosind un număr de 125 de secvențe de nucleotide, provenind de la 114 de pui și subadulți sălbatici și 11 exemplare populate în cadrul Programului de Populare de Susținere a Dunării cu pui de sturioni.

Cele 125 de secvențe de nucleotide reprezintă un număr de 57 de haplotipuri (Fig. 55), care diferă între ele prin 68 de substituții și 3 inserții – deletii (Tabel 5).



Hap_34.....
 Hap_35..... A
 Hap_36..... C
 Hap_37..... T T
 Hap_38..... T
 Hap_39.....
 Hap_40.....
 Hap_41.....
 Hap_42.....
 Hap_43..... A
 Hap_44..... A
 Hap_45.....
 Hap_46.....
 Hap_47.....
 Hap_48.....
 Hap_49..... T T
 Hap_50.....
 Hap_51.....
 Hap_52.....
 Hap_53..... T T T
 Hap_54..... T
 Hap_55..... C
 Hap_56.....
 Hap_57.....

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

Hap_1
GTCCGGTGTAAAGGGGGTAGGGGGTTTCGATAAGGAACGTTATAAACATTATGT
GTGAGGGAGAAAGGACCAGGCCTCGTGAAAACACTCCTCATGTA
 Hap_2,
 Hap_3,
 Hap_4 T T A . C,
 Hap_5 A,
 Hap_6,
 Hap_7,
 Hap_8,
 Hap_9,
 Hap_10 A,
 Hap_11,
 Hap_12,
 Hap_13,
 Hap_14,
 Hap_15,
 Hap_16,
 Hap_17,
 Hap_18,
 Hap_19,
 Hap_20,
 Hap_21 C,
 Hap_22 C,
 Hap_23,
 Hap_24,
 Hap_25,
 Hap_26,

Hap_27.....
Hap_28.....
Hap_29.....
Hap_30.....
Hap_31.....
Hap_32.....
Hap_33.....
Hap_34.....
Hap_35.....
Hap_36.....
Hap_37.....
Hap_38.....
Hap_39..... C
Hap_40.....
Hap_41..... A.C..... A
Hap_42.....
Hap_43.....
Hap_44.....
Hap_45.....
Hap_46..... A.C..... A.T.....
Hap_47..... A.....
Hap_48.....
Hap_49.....
Hap_50.....
Hap_51..... A.....
Hap_52.....
Hap_53.....
Hap_54.....
Hap_55.....
Hap_56..... TC.....
Hap_57.....

Sequence alignment of 19 haplotypes (Hap_1 to Hap_19) across a genomic region from 210 to 300. The top x-axis shows positions 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, and 300. The bottom x-axis shows the same positions with dots. Each haplotype is represented by a horizontal line of colored dots (A, T, C, G). A red 'T' at position 212 is present in Hap_1, Hap_2, Hap_3, Hap_4, Hap_5, Hap_6, Hap_7, Hap_8, Hap_9, Hap_11, Hap_12, Hap_13, Hap_15, Hap_16, Hap_17, Hap_18, and Hap_19. A blue 'C' at position 252 is present in Hap_6, Hap_8, Hap_9, Hap_12, Hap_14, and Hap_19.

Hap_20.....T
Hap_21.....T
Hap_22.....G
Hap_23.....T
Hap_24.....
Hap_25.....T
Hap_26.....
Hap_27.....
Hap_28.....
Hap_29.....
Hap_30.....C..C
Hap_31.....
Hap_32.....
Hap_33.....
Hap_34.....
Hap_35.....C
Hap_36.....
Hap_37.....
Hap_38.....
Hap_39.....G
Hap_40.....
Hap_41.....C...G.....T
Hap_42.....
Hap_43.....C
Hap_44.....
Hap_45.....
Hap_46.....C...T.....T
Hap_47.....
Hap_48.....
Hap_49.....
Hap_50.....A
Hap_51.....C
Hap_52.....
Hap_53.....
Hap_54.....C
Hap_55.....
Hap_56.....T
Hap_57.....

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

Hap_1
GTAGAGCTTGATATGTCATGAATGGAGACCCAAAAGATAAAAAATACCAAATGCT
GGTGGGGTTCTGGCATGTTGTGAGCGTGGGCCTATGGTACTTC
Hap_2 ..
Hap_3 ..
Hap_4 .. A .. C ..
Hap_5 ..
Hap_6 ..
Hap_7 ..
Hap_8 ..
Hap_9 .. G .. C ..
Hap_10 ..
Hap_11 ..
Hap_12 ..

Hap_13.....
Hap_14.....
Hap_15.....
Hap_16.....
Hap_17.....
Hap_18.....
Hap_19.....
Hap_20.....
Hap_21..... A
Hap_22.....
Hap_23.....
Hap_24..... G
Hap_25.....
Hap_26..... C
Hap_27.....
Hap_28.....
Hap_29..... C
Hap_30.....
Hap_31..... C
Hap_32.....
Hap_33..... C
Hap_34.....
Hap_35.....
Hap_36.....
Hap_37.....
Hap_38..... G
Hap_39.....
Hap_40.....
Hap_41..... G
Hap_42.....
Hap_43.....
Hap_44..... C
Hap_45..... A
Hap_46..... A..... G..... A..... C.....
Hap_47.....
Hap_48.....
Hap_49..... C.....
Hap_50.....
Hap_51.....
Hap_52.....
Hap_53..... G.....
Hap_54..... A.....
Hap_55.....
Hap_56..... G.....
Hap_57.....

A horizontal number line starting at 410 and ending at 500. The numbers are placed above the line, and there are tick marks below the line at intervals of 10 units.

Hap_1
TAACATTAATCAGATGCCAGTGGCGACCTGATTATGGGGAGATAACTATCAATGGA
CCTGAAAATAGGAACCCAGATGCCAGTAATAGTTTCAGTTATGGAAT
Hap_2 A C
.....

Hap_3.....A
Hap_4.....A
Hap_5.....
Hap_6.....A
Hap_7.....
Hap_8.....A
Hap_9.....A
Hap_10.....
Hap_11.....A
Hap_12.....A.....C
Hap_13.....
Hap_14.....A
Hap_15.....
Hap_16.....A.....
Hap_17.....A.....A..
Hap_18.....
Hap_19.....A
Hap_20.....A.....
Hap_21.....A.....A..
Hap_22.....A.....T
Hap_23.....A.....C
Hap_24.....A.....T
Hap_25.....A.....
Hap_26.....A.....
Hap_27.....A.....
Hap_28.....
Hap_29.....A.....
Hap_30.....A.....
Hap_31.....A.....
Hap_32.....A.....
Hap_33.....A.....
Hap_34.....A.....A..
Hap_35.....A.....
Hap_36.....
Hap_37.....A.....
Hap_38.....A.....T
Hap_39.....A.....T
Hap_40.....A.....
Hap_41.....A.....C.....A..
Hap_42.....A.....
Hap_43.....A.....
Hap_44.....A.....
Hap_45.....A.....
Hap_46.....A.....A..
Hap_47.....
Hap_48.....
Hap_49.....A.....G.....C
Hap_50.....
Hap_51.....
Hap_52.....A.....
Hap_53.....A.....T
Hap_54.....A.....
Hap_55.....
Hap_56.....
Hap_57.....

Hap_30.....
 Hap_31.....G.....C.....G.....
 Hap_32.....G.....C.....G.....
 Hap_33.....G.....C.....G.....
 Hap_34.....C.....
 Hap_35.....G.....C.....G.....
 Hap_36.....C.....
 Hap_37.....CT.....C.....G.....
 Hap_38...G.....C.....A.....G.....
 Hap_39.....G.....C.....G.....
 Hap_40.....C.....G.....
 Hap_41.....G.....T.....GC.....
 Hap_42.....CT.....C.....G.....
 Hap_43.....C.....G.....C.....G.....
 Hap_44.....G.....C.....G.....
 Hap_45.....G.....C.....G.....
 Hap_46.....C.....T.....T.....G.....GC.....
 Hap_47.....C.....
 Hap_48.....C.....A.....T.....
 Hap_49.....C.....G.....C.....G.....
 Hap_50.....C.....G.....
 Hap_51.....C.....G.....
 Hap_52.....G.....C.....T.....G.....G.....
 Hap_53...G.....C.....A.....G.....
 Hap_54.....C.....
 Hap_55.....C.....A.....T.....
 Hap_56.....C.....G.....
 Hap_57.....C.....G.....

610
....|....|....|...
Hap_1 **TTCACATAGAGATAATGG**
 Hap_2
 Hap_3
 Hap_4C..
 Hap_5
 Hap_6
 Hap_7
 Hap_8
 Hap_9
 Hap_10
 Hap_11
 Hap_12
 Hap_13
 Hap_14
 Hap_15
 Hap_16
 Hap_17
 Hap_18
 Hap_19
 Hap_20**C**.....
 Hap_21
 Hap_22
 Hap_23
 Hap_24

Hap_25C.....
Hap_26.....
Hap_27.....
Hap_28.....
Hap_29.....
Hap_30.....
Hap_31.....
Hap_32.....
Hap_33.....
Hap_34.....
Hap_35.....
Hap_36.....
Hap_37.....
Hap_38.....
Hap_39.....
Hap_40.....
Hap_41.....
Hap_42.....
Hap_43.....
Hap_44.....
Hap_45.....
Hap_46.....
Hap_47.....
Hap_48.....
Hap_49.....
Hap_50.....
Hap_51.....
Hap_52.....
Hap_53.....
Hap_54.....
Hap_55.....
Hap_56.....
Hap_57.....

Aliniere folosind programul Clustal W a secvențelor pentru regiunea *D-loop* reprezentând 57 de haplotipuri identificate în cele 125 de probe de pui și juvenili de păstrugă analizate. Numerele reprezintă poziția ocupată în aliniamentul realizat cu Clustal W. Siturile identice sunt indicate prin simbolul „·”, iar gap-urile (deletiile) sunt indicate prin simbolul „-“.

Indicii diversității moleculare la cele 117 de secvențe *D-loop* obținute de la exemplarele de nisetru analizate (Output Arlequin software).

```
=====
== Molecular diversity indices : (All_Seqs)
=====

Samplesize          : 125
No. of haplotypes : 57
Deletionweight     : 1.0
Transitionweight    : 1.0
Transversionweight  : 1.0
Allowedlevel of missing data : 5.0 %
```

Number of observedtransitions : 62
Number of observedtransversions : 6
Number of substitutions : 68
Number of observedindels : 3
Number of polymorphicsites : 70
Number of observedsiteswithtransitions : 62
Number of observedsiteswithtransversions : 6
Number of observedsiteswithsubstitutions : 67
Number of observedsiteswithindels : 3
Number of observednucleotidesites : 618
Number of usablenucleotidesites : 618

Nucleotidecomposition (Relative values)

C : 16.32%

T : 30.64%

A : 28.60%

G : 24.44%

Total :100.00%

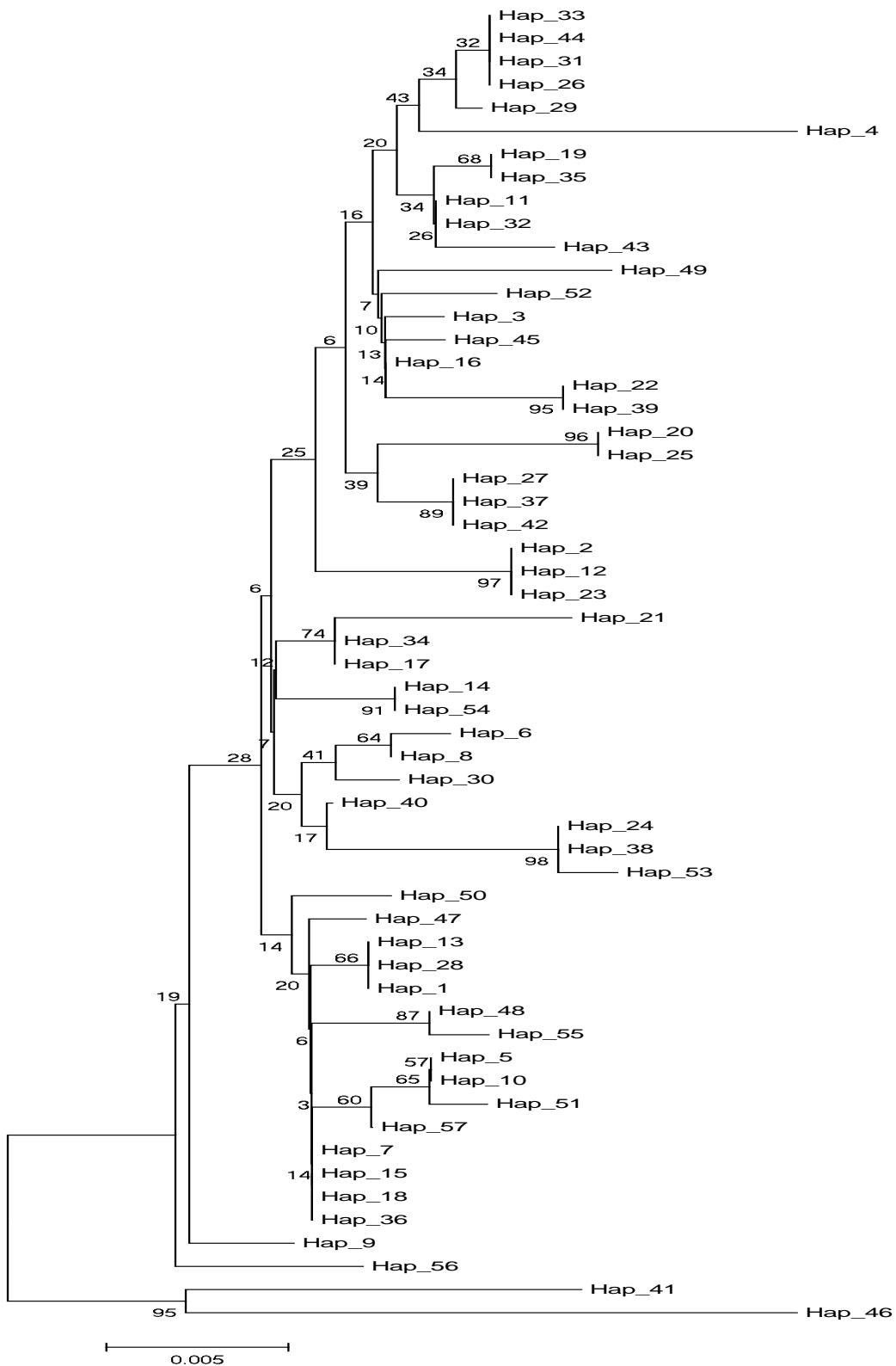


Fig. 56. Arbore filogenetic ilustrând relațiile de înrudire a haplotipurilor *D-loop*, din ADNmt la păstrugi (N=125), realizat prin metoda NeighborJoining pe baza secvențelor de nucleotide

Aceste 57 de haplotipuri au frecvențe diferite în cadrul eșantionului populației analizate, regăsindu-se în proporții diferite din punct de vedere spațial.

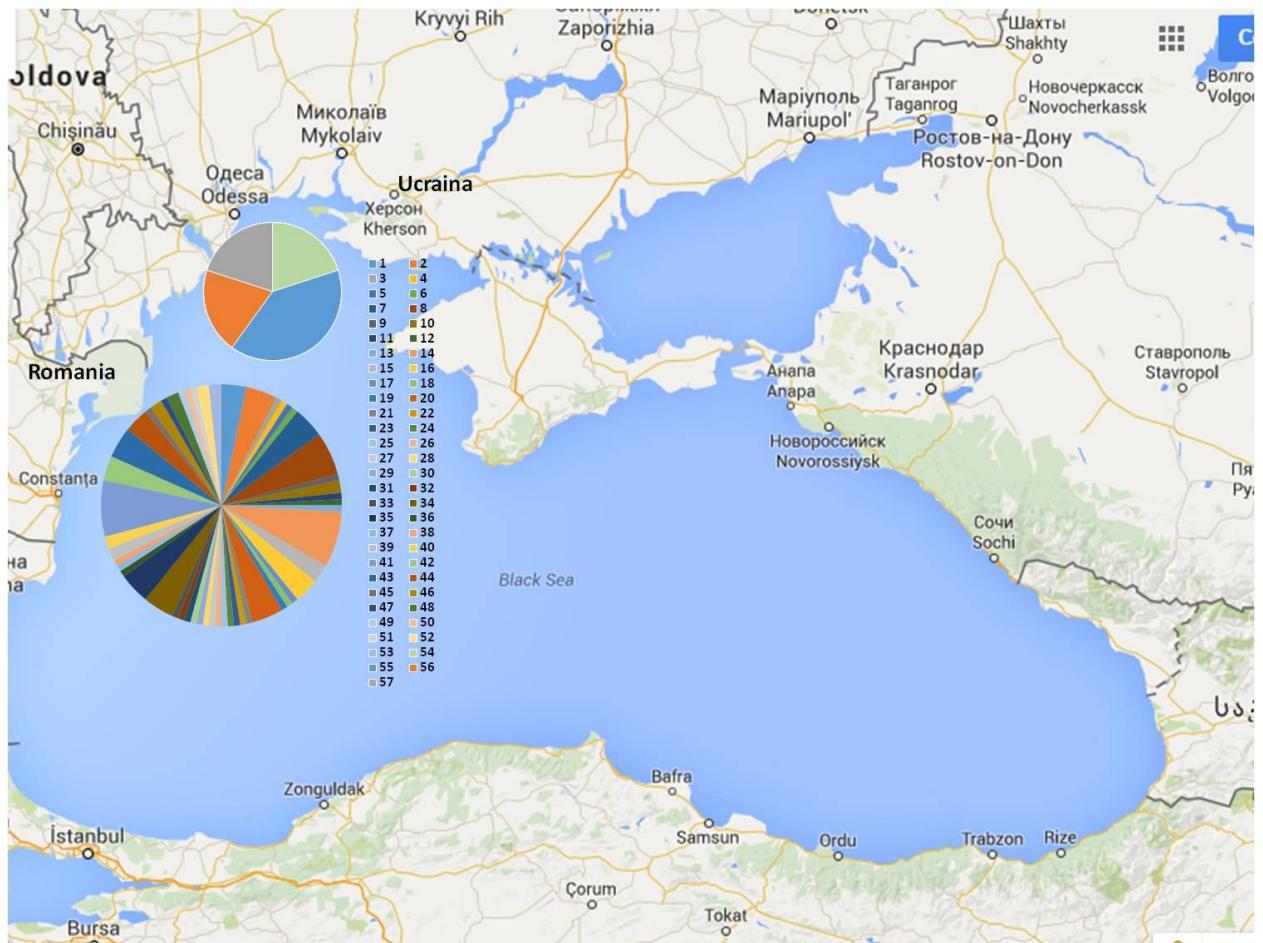


Fig. 57. Numărul și frecvența haplotipurilor *D-loop* la păstrugă identificate în prezentul studiu (Romania N=120, Ucraina N=5).