UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
DEPARTAMENTUL BIOLOGIE ȘI ECOLOGIE

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 597/599:591.5(478)(043.3)

SÎTNIC VICTOR

ABORDĂRI BIOINFORMATICE ÎN CERCETAREA DIVERSITĂȚII VERTEBRATELOR TERESTRE ÎN REPUBLICA MOLDOVA

165.02. Zoologie

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU 2023

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de Vertebrate Terestre al Institutului de Zoologie și Departamentului Biologie și Ecologie, Universitatea de Stat din Moldova

Conducător de doctorat:
NISTREANU Victoria, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător.

Referenți oficiali:

BUȘMACHIU Galina, doctor habilitat în biologie, conferențiar cercetător, Universitatea de Stat din Moldova
GALEA-ABDUȘA Daniela, doctor în biologie, Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie „Nicolae Testemiţanu”

Membri ai consiliului ştiinţific specializat:

CRIVOI Aurelia, doctor habilitat în biologie, profesor universitar, Universitatea de Stat din Moldova – *preşedinte*
LARION Alina, doctor în biologie, conferenţiar cercetător, Universitatea de Stat din Moldova – *secretar ştiinţific*
DERJANSCHI Valeriu, doctor habilitat în biologie, profesor cercetător, Universitatea de Stat din Moldova
CÎRLIG Tatiana, doctor în biologie, conferențiar universitar, Universitatea Pedagogică de Stat „Ion Creangă” din Chișinău
MOLDOVAN Anna, doctor în biologie, Universitatea de Stat din Moldova

Susținerea va avea loc la data de 28 noiembrie 2023, ora 14^{00}, în ședința consiliului de susținere publică a tezei de doctor din cadrul consorțiului național administrat de Universitatea de Stat din Moldova (https://usm.md), Blocul de Biologie, sala de ședințe 352, str. Academiei 1, mun. Chișinău.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Națională a Republicii Moldova, Biblioteca USM, pe pagina web a ANACEC (https://www.anacec.md) și pe pagina web a USM (https://usm.md).

Rezumatul a fost expediat la data 27 octombrie 2023.

Secretar științific al Consiliului științific specializat
Larion Alina, doctor în științe biologice,
conferențiar cercetător

Conducător științific,
Nistreanu Victoria, doctor în științe biologice,
conferențiar cercetător

Autor,
Sîtnic Victor

© Sîtnic Victor

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII 4
INTRODUCERE 7
1. SINTEZA BIBLIOGRAFICĂ 7
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE 7
2.1. Instrumente și metode bioinformatice 7
2.2. Metode de colectare și prelucrare primară a materialului biologic în teren 10
2.3. Metode de biologie moleculară 11
3. DESIGNUL PRIMERILOR PENTRU METABARCODARE ȘI GENOTIPAREA CU ENZIME DE RESTRICȚIE 12
3.1. Designul și testarea *in silico* a primerilor pentru metabarcodare 12
3.2. Testarea *in vitro* a acoperirii taxonomice pentru noii primeri 13
3.3. Genotiparea speciei *Sus scrofa* în baza polimorfismului genei *MC1R* 13
4. ANALIZA FILOGENETICĂ ȘI MODELAREA DISTRIBUȚIEI SPECIILOR 15
4.1. Analiza filogenetică a secvențelor genei *CYTB* la speciile de microtine 15
4.2. Modelarea distribuției speciilor cu utilizarea algoritmului Bioclim 21
CONCLUZII GENERALE 23
RECOMANDĂRI PRACTICE 24
BIBLIOGRAFIE (SELECTIVĂ) 25
PUBLICAȚII LA TEMA TEZEI DE DOCTORAT 27
ADNOTARE 31
ANNOTATION 32
АННОТАЦИЯ 33

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. 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. În prezent 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. Monitorizarea diversității VT folosind doar metode tradiționale este în general laborioasă și dificilă, astfel în prezent există tendințe tot mai pronunțate de aplicare a instrumentelor bioinformatice și a tehnicilor moleculare în scopul identificării taxonomice și studierii distribuției speciilor. Deși în ultimii 15-20 de ani în baza de date globală *BOLD Systems* au fost depozitate peste 400 barcoduri moleculare ale diferitor specii de plante și animale din Republica Moldova, din totalul acestor înregistrări în anul 2022 existau doar două barcoduri ale speciilor de vertebrate terestre [23]. De asemenea abordările ce țin de metabarcodare și modelare a distribuției speciilor (SDM) sunt aplicate pe larg de către cercetătorii din întreaga lume, totuși, în Republica Moldova monitorizarea biodiversității cu utilizarea acestor instrumente se află încă în stadiu incipient.

Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare. Starea actuală a VT în Republica Moldova scoate în evidență unele provocări și amenințări care afectează populațiile acestor specii. 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. Pierderea și fragmentarea habitatului din cauza factorilor antropici duc la scăderea resurselor de hrană și afectează zonele de reproducere pentru speciile din fauna terestră iar schimbările climatice au de asemenea un impact negativ prin modificarea distribuției și disponibilității resurselor. De asemenea, există riscul introducerii speciilor invazive care pot afecta echilibrul ecologic și pot concura cu speciile native pentru resursele disponibile. Toți acești factori contribuie la reducerea populațiilor din fauna sălbatică și la diminuarea diversității biologice în ansamblu. Pentru a proteja vertebratele terestre și pentru a conserva biodiversitatea în Republica Moldova, este necesară utilizarea metodelor moderne de biomonitoring și aplicarea unor măsuri eficiente de gestionare a habitatelor naturale. Abordările care au la bază analiza ADN-ului și modelarea distribuției speciilor reprezintă instrumente importante în evaluarea diversității faunistice și în dezvoltarea strategiilor eficiente de conservare însă în țara noastră acestea sunt insuficient aplicate pentru cercetarea vertebratelor terestre, motivul principal fiind lipsa protocoalelor experimentale și a echipamentului de laborator.

Metodologia cercetării științifice. Metodele utilizate în activitatea de cercetare au fost diferențiate în: metode bioinformatice, metode de colectare și prelucrare primară a materialului biologic în teren, metode de biologie moleculară.

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

Au fost stabilite următoarele **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.

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* [19]. 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 microtinele studiate fac parte din linia filogenetică estică. 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 VT din țara noastră în baza unor metode de cercetare optimizate care s-au aplicat în premieră pentru studierea diversității vertebratelor terestre din Moldova.

Semnificația 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 bioinformatice. 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. Relevanţa 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. Rezultatele obținute au fost implementate în cadrul unor rezervații naturale din țara noastră precum Prutul de Jos și Pădurea Domnească, iar metodele moleculare optimizate pe parcursul studiului sunt utilizate în activitatea de cercetare a laboratorului de Vertebrate Terestre al Institutului de Zoologie, USM. 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 bioinformatice optimizate permit analiza filogenetică a populațiilor și modelarea distribuției speciilor. Metodele și tehnicile de cercetare descrise în lucrare pot servi ca suport în procesul didactic pentru instituțiile de învățământ cu profil biologic.

Aprobarea rezultatelor științifice. Materialele tezei au fost prezentate și aprobate la diferite conferințe științifice naționale și internaționale.

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetărilor sunt reflectate în 19 lucrări științifice.

Structura tezei. Teza este scrisă în limba română, compartimentată tradițional în foaie de titlu, foaie privind dreptul de autor, cuprins, adnotare în limbile română, engleză și rusă, lista tabelelor, figurilor și abrevierilor, introducere, 4 capitole, concluzii, recomandări, 169 surse bibliografice, anexe, declarație cu privire la asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

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

CONȚINUTUL TEZEI

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.

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.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Pentru realizarea cercetărilor propuse au fost utilizate atât instrumente bioinformatice, tehnici de biologie moleculară cât și metode de colectare și prelucrare primară a materialului biologic în teren. În cele ce urmează sunt prezentate abordările și metodele aplicate pentru realizarea prezentei lucrări.

2.1. Instrumente și metode bioinformatice. În scopul realizării designului și testării *in silico* a primerilor pentru metabarcodare au fost utilizate softurile *ecoPrimers* [24], *ecoPCR* [10] și *OBITools* [4]. 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 (Fig. 2.1). Baza de date cu mitogenomurile de referință a fost creată cu utilizarea platformei *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* [25] și conține 174 genomuri mitocondriale (un genom per specie). Aceasta a fost obținută în urma verificării individuale în baza de date globală *RefSeq* a 337 specii de vertebrate terestre din fauna Republicii Moldova.

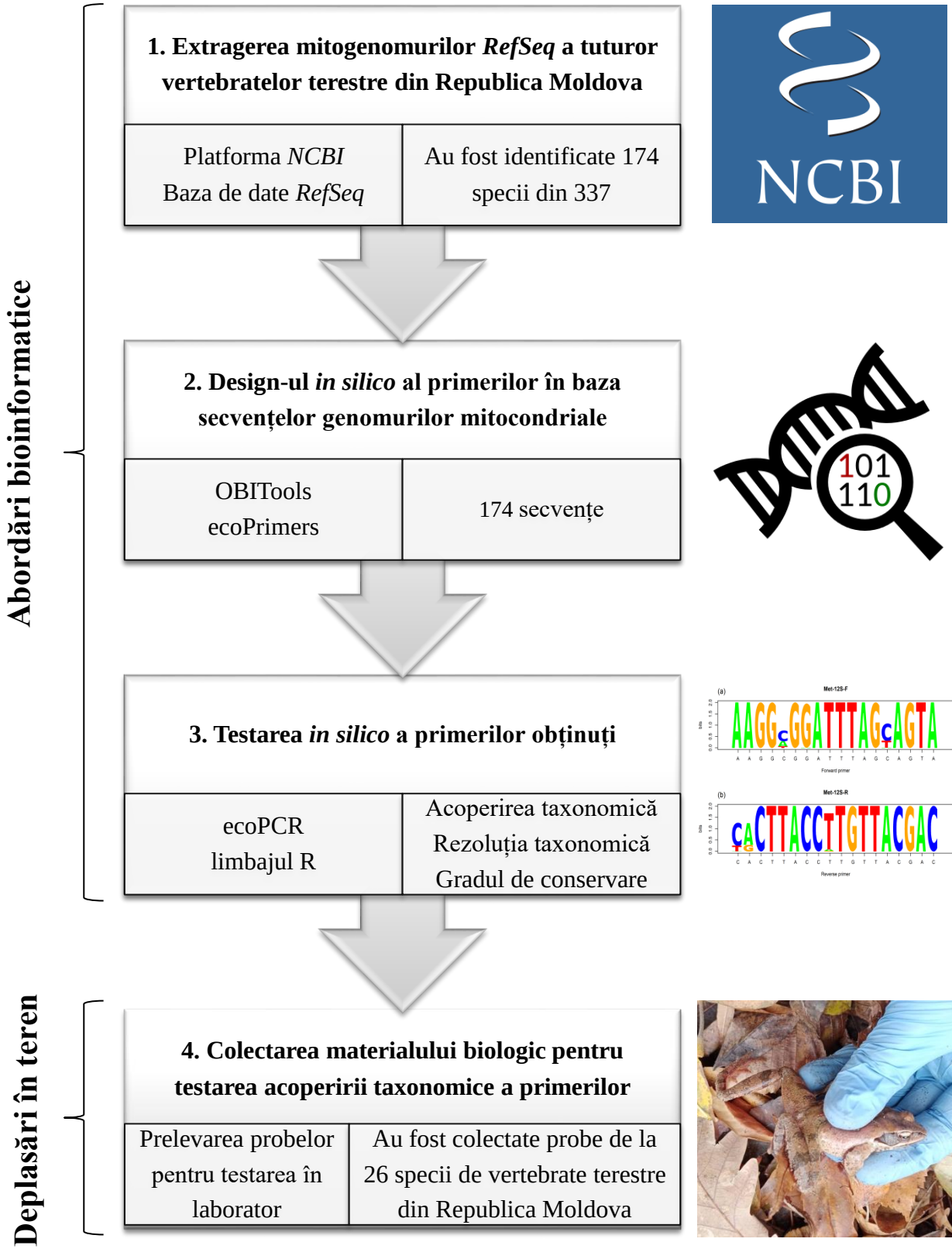


Fig. 2.1.A. Etapele de design și testare a primerilor pentru metabarcodare

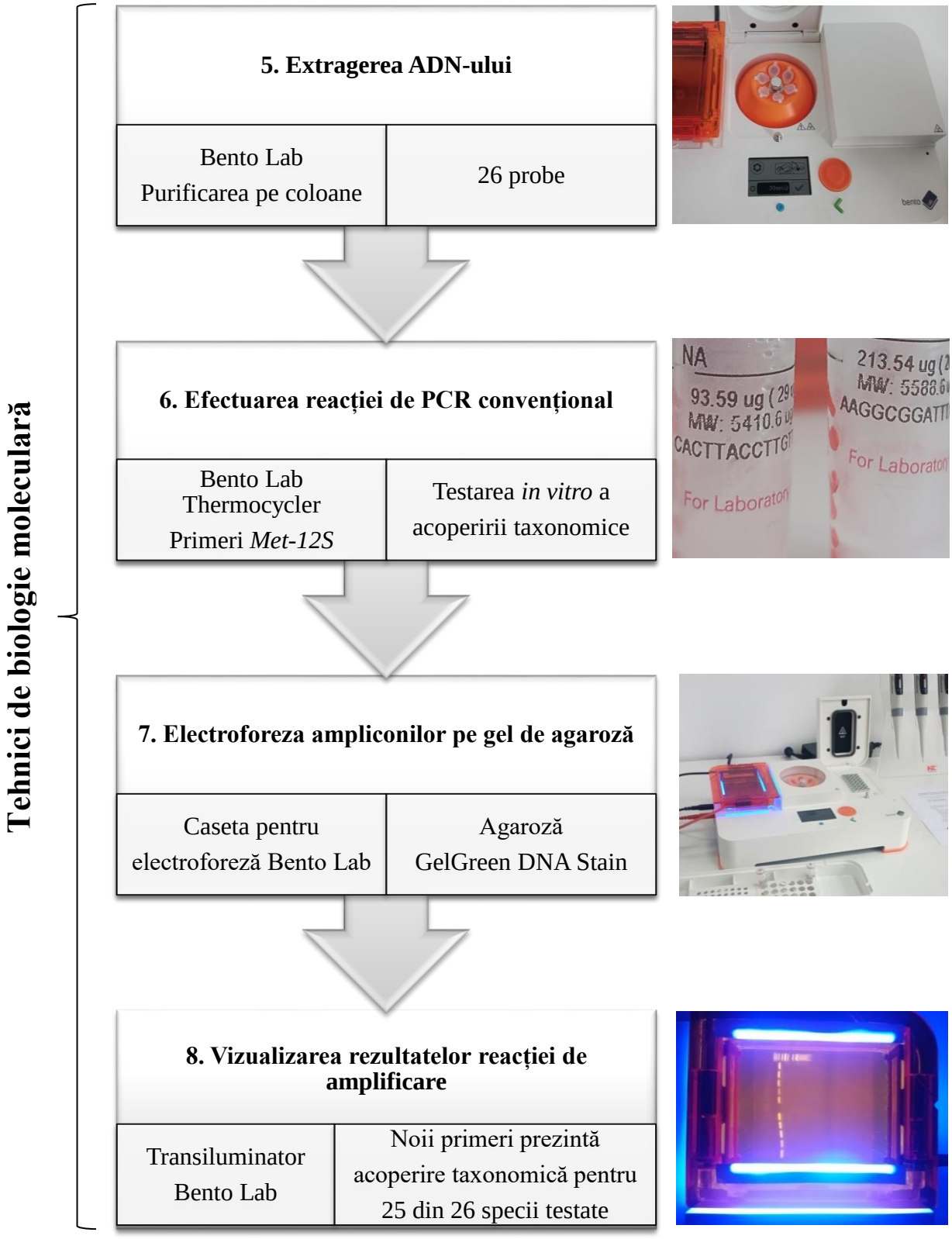


Fig. 2.1.B. Etapele de design și testare a primerilor pentru metabarcodare

Pentru descrierea suplimentară a proprietăților primerilor obținuți a fost utilizat instrumentul online de analiză a secvențelor oligonucleotidice *PrimerROC* [17]. Evaluarea gradului de conservare a primerilor și reprezentarea grafică au fost efectuate cu ajutorul limbajului *R* [22] și a librăriilor *ROBITaxonomy* [2], *ROBITools* [3], *ROBIBarcodes* [1]. Analiza filogenetică și modelarea distribuției speciilor au fost de asemenea realizate în mediul *R*.

2.2. Metode de colectare și prelucrare 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 probelor 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. În cadrul cercetărilor efectuate tipurile de probe prelevate au variat (de la tampon bucal și calamusul penelor până la piele, mușchi și organe interne) în funcție de obiectivele propuse, speciile studiate, starea animalelor (vii sau moarte) etc (Tabelul 2.1).

Tabelul 2.1. 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 *in vitro* 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	*Sus scrofa*	19	Țesut muscular, piele
Secvențierea genei *CYTB* la microtine	Secvențiere Sanger, Institutul de Ecologie și Evoluție a Universității din Berna, Elveția	*Microtus arvalis*, *Microtus levis*	13	Ficat, coadă

Deoarece unele vertebrate terestre pot fi vectori de transmitere a diferitor zoonoze precum leptospiroza sau rabia, în procesul de colectare a probelor este necesară respectarea

măsurilor de securitate biologică. Prelevarea 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 [12, 20, 28]. 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.

Materialul biologic a fost colectat de la animale vii, animale moarte identificate sporadic sau vânate (în cazul păsărilor și mamiferelor mari) și de la animale colectate cu capcane (în cazul mamiferelor mici). Speciile de amfibieni și reptile au fost capturate manual. 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% și păstrate la -20 °C până la extragerea ADN-ului.

2.3. 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, electroforeza pe gel de agaroză și secvențierea prin metoda *Sanger* (secvențierea a fost efectuată la Institutul de Ecologie și Evoluție a Universității din Berna, Elveția). Pentru prima dată în Republica Moldova a fost utilizat instrumentul mobil *Bento Lab* pentru extragerea, amplificarea și vizualizarea ADN-ului (Fig. 2.2).



Fig. 2.2. 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.

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

3.1. Designul și testarea *in silico* a primerilor pentru metabarcodare. Barcodurile sunt markeri genetici standardizați care servesc pentru identificarea taxonomică a speciilor [5, 14]. Proprietățile acestora sunt optimizate anume pentru acest scop și nu întrunesc neapărat cerințele unui metabarcod care permite identificarea mai multor specii simultan adesea în baza unui ADN de calitate joasă. Pe de altă parte, metabarcodurile sunt secvențe scurte de ADN care pot fi utilizate pentru identificarea simultană a zeci sau chiar sute de specii, tehnicile de metabarcodare având un potențial enorm pentru biomonitoringul diferitor tipuri de ecosisteme. Un exemplu interesant de aplicare a experimentelor de metabarcodare în ecosistemele terestre este limitarea așa numitelor fenomene *Birdstrike Hazards* din preajma aeroporturilor [8]. 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 faunistice [8, 16, 29]. Pentru realizarea prezentului obiectiv au fost identificate toate speciile de vertebrate terestre care fac parte din fauna Republicii Moldova și au genomul mitocondrial inclus în baza de date globală *RefSeq.* Astfel, grupul țintă a fost format din 174 specii care includ 38 specii de mamifere, 127 specii de păsări, 4 specii de reptile și 5 specii de amfibieni. Noua pereche de primeri a fost creată în baza analizei mitogenomurilor taxonilor din grupul țintă cu algoritmul *ecoPrimers* (AAGGCGGATTTAGCAGTA - forward și CACTTACCTTGTTACGAC - reverse). Ulterior, testarea *in silico* a acestora a fost realizată cu utilizarea programului *ecoPCR* și a prezentat o acoperire taxonomică pentru 171 de specii din 174 (98,28%), respectiv o rezoluție taxonomică de 148 specii din 171 (86,55%). Performanța demonstrată a fost superioară în comparație cu a primerilor universali *12S-V5* utilizați pentru metabarcodarea vertebratelor.

3.2. Testarea *in vitro* a acoperirii taxonomice pentru noii primeri. 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. Astfel, din 26 taxoni analizați a fost amplificat ADN-ul a 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*. Toți ampliconii s-au încadrat în intervalul de dimensiune așteptat și nu au existat amplificări nespecifice sau formare de dimeri (Fig. 3.1).

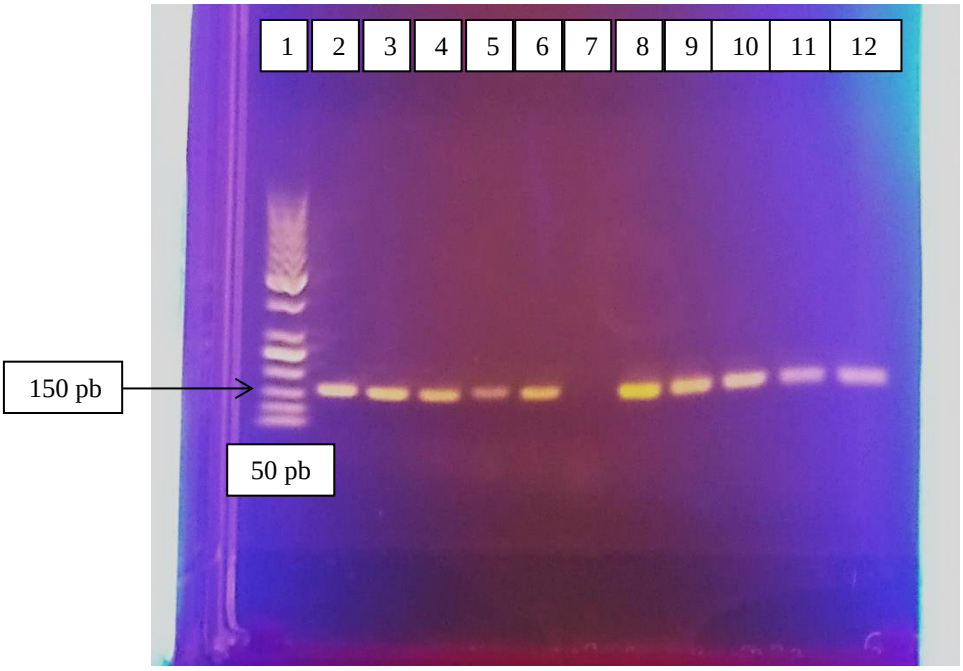


Fig. 3.1. Electroforegrama ampliconilor obținuți cu noii primeri pentru metabarcodare

(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)

Evaluarea în laborator a confirmat capacitatea noilor primeri de a amplifica secvențele așteptate de metabarcod, obținându-se benzi clare în regiunea 150-170 pb fără formarea produșilor secundari.

3.3. 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. Hibridizarea între mistreț și porcul domestic crește gradul de invazivitate și afectează integritatea genetică și potențialul de adaptare al mistreților [11, 27]. Deoarece astfel de hibrizi de cele mai multe ori nu pot fi identificați morfologic, există mai multe metode și tehnici moleculare pentru diferențierea acestora de liniile pure, o astfel de metodă fiind și

genotiparea în baza fragmentării ADN-ului cu enzime de restricție (RFLP-PCR). O țintă potrivită pentru aplicarea tehnicilor RFLP-PCR este gena *MC1R* care reglează sinteza melaninei la multe mamifere și păsări jucând un rol central în procesul de pigmentare. Alelismul multiplu al acestei gene poate fi observat fenotipic prin diversitatea pigmentării pielii la porci. În prezent, gradul de hibridizare al mistreților din fauna Republicii Moldova este necunoscut, motivul principal fiind lipsa protocoalelor experimentale de laborator care ar permite identificarea specimenilor hibrizi.

La această etapă a cercetărilor ne-am propus optimizarea și aplicarea metodei RFLP-PCR în scopul diferențierii hibrizilor 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. În rezultatul analizei celor 19 probe au fost identificate 3 genotipuri (Fig. 3.2): $E^{+}/\ E^{+}$ (mistreț pur, 13 probe), E^{PD2}/e (porc domestic, 5 probe) și E^{+}/e (mistreț hibrid, 1 probă).

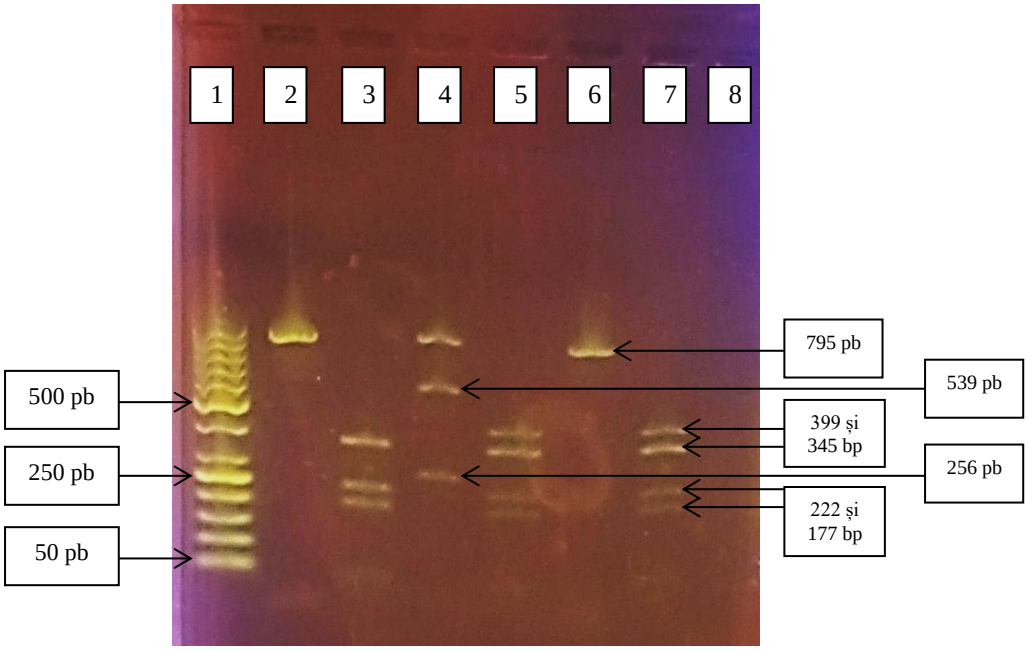


Fig. 3.2. Electroforegrama genotipurilor identificate

(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)

În fig. 3.3 sunt prezentate în plan comparativ electroforegramele obținute la digestia *in silico* și *in vitro* a alelei sălbatice E^{+}.

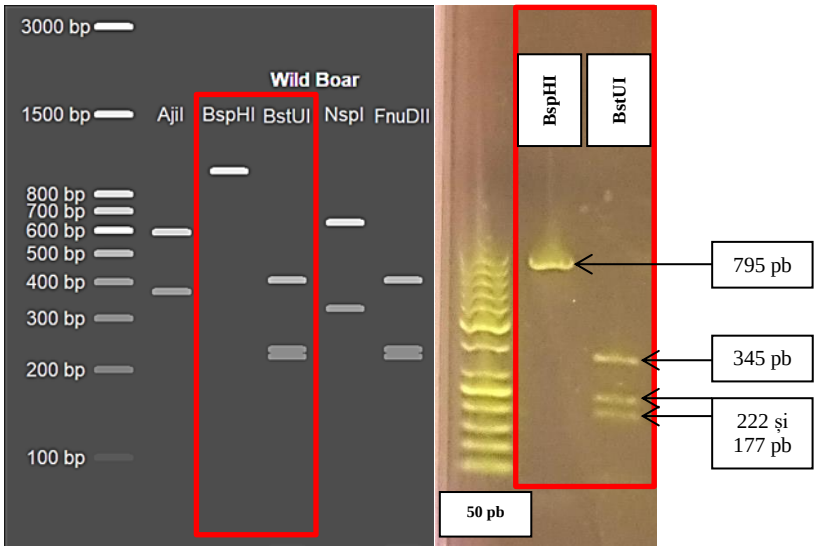


Fig. 3.3. Benzile electroforetice obținute la liniile pure de mistreț (E^+) în urma digestiei ampliconilor *MC1R* cu enzimele de restricție BspHI și BstUI (*in silico* – stânga, *in vitro* – dreapta)

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 în urma reacției convenționale de PCR (795 pb). În figura 3.3 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* [21] 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 bioinformatice 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. În ce privește studiile de genotipare a mistreților din Republica Moldova, acestea ar eficientiza determinarea gradului de hibridizare în populații, prevenirea focarelor de boli infecțioase (ex. pesta porcină africană) și elaborarea măsurilor adecvate de conservare.

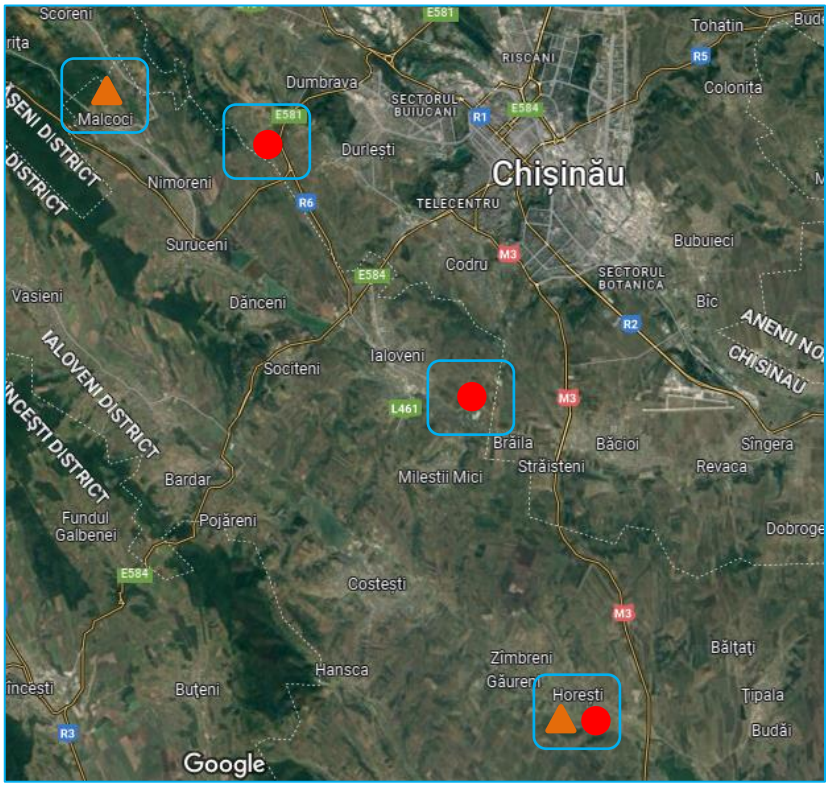
4. ANALIZA FILOGENETICĂ ȘI MODELAREA DISTRIBUȚIEI SPECIILOR

4.1. Analiza filogenetică a secvențelor genei *CYTB* la speciile de microtine. 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. Astfel, pentru realizarea prezentului obiectiv 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/rossiaemeridionalis* (Șoarece răsăritean de câmp), iar întrucât acești taxoni nu pot fi diferențiați vizual și habitatul lor 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 *M. arvalis*
Horești	46.806	28.929	3 x *M. arvalis* 3 x *M. levis*
Malcoci	47.016	28.665	5 x *M. levis*
Chișinău	47.021	28.718	1 x *M. arvalis*



▲ *Microtus levis* ● *Microtus arvalis*

Fig. 4.1. Locațiile geografice de colectare a probelor

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 [6, 13]. De asemenea, există câteva linii filogenetice ale speciei *M. arvalis* 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) (Fig. 4.2) care coincide cu distribuția formei *obscurus* [13].

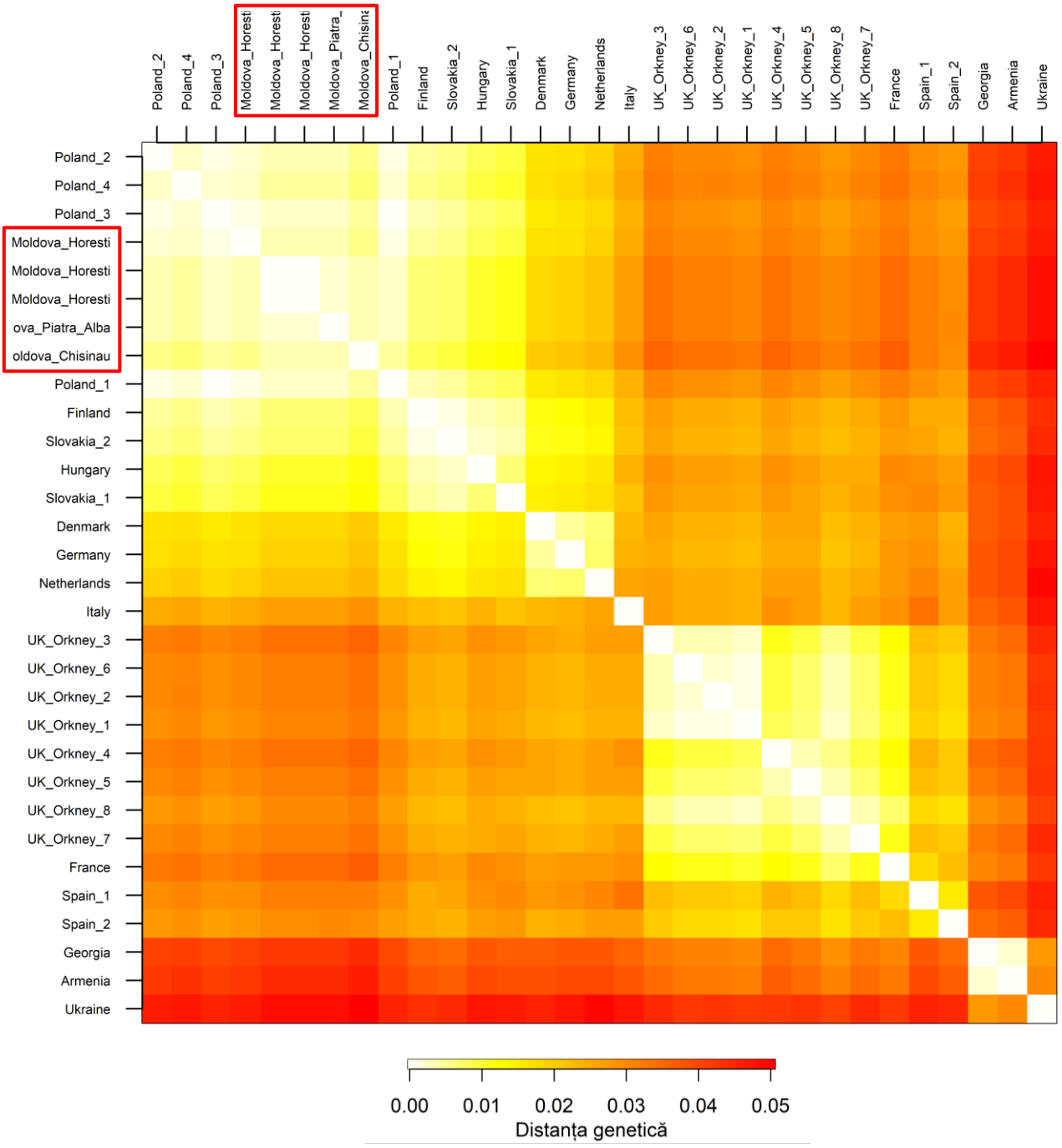


Fig. 4.2. Distanța genetică între 31 secvențe ale genei *CYTB* la specia *M. arvalis*

În figurile 4.2 și 4.3 sunt prezentate rezultatele obținute în urma analizei filogenetice pentru cinci secvențe ale genei *CYTB* de la specimene de *M. arvalis* din Moldova și 26 secvențe *CYTB* extrase din GenBank [7, 25]. Astfel, au fost analizate 31 secvențe care cuprind toate liniile filogenetice menționate 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.

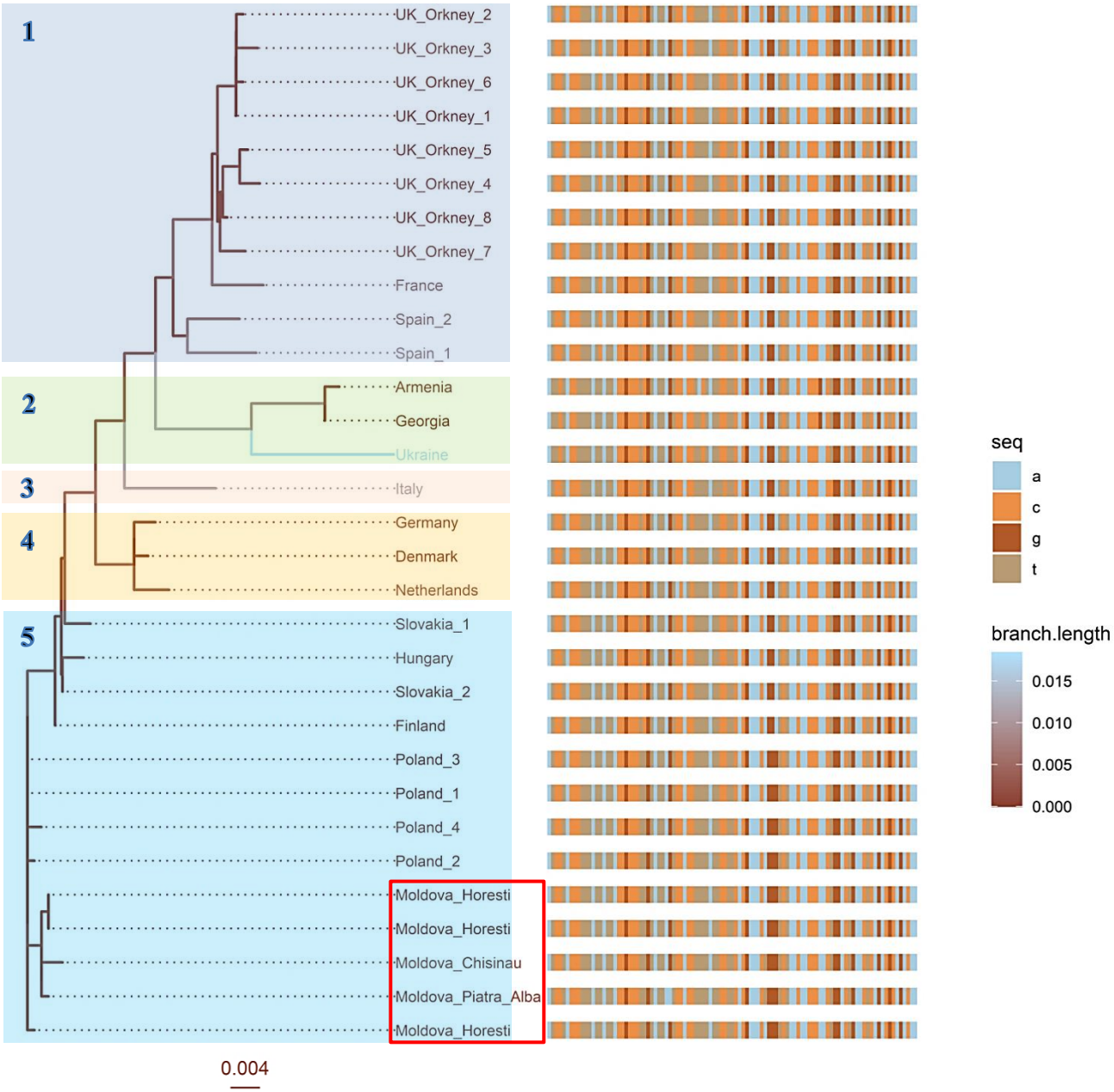


Fig. 4.3. Arborele filogenetic obținut din secvențe ale genei *CYTB* la specia *M. arvalis*

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

Conform datelor obținute în urma analizelor bioinformatice secvențele studiate au format 5 clustere asociate celor 5 linii filogenetice descrise anterior, specimenele analizate din Moldova aparținând liniei filogenetice estice. 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).

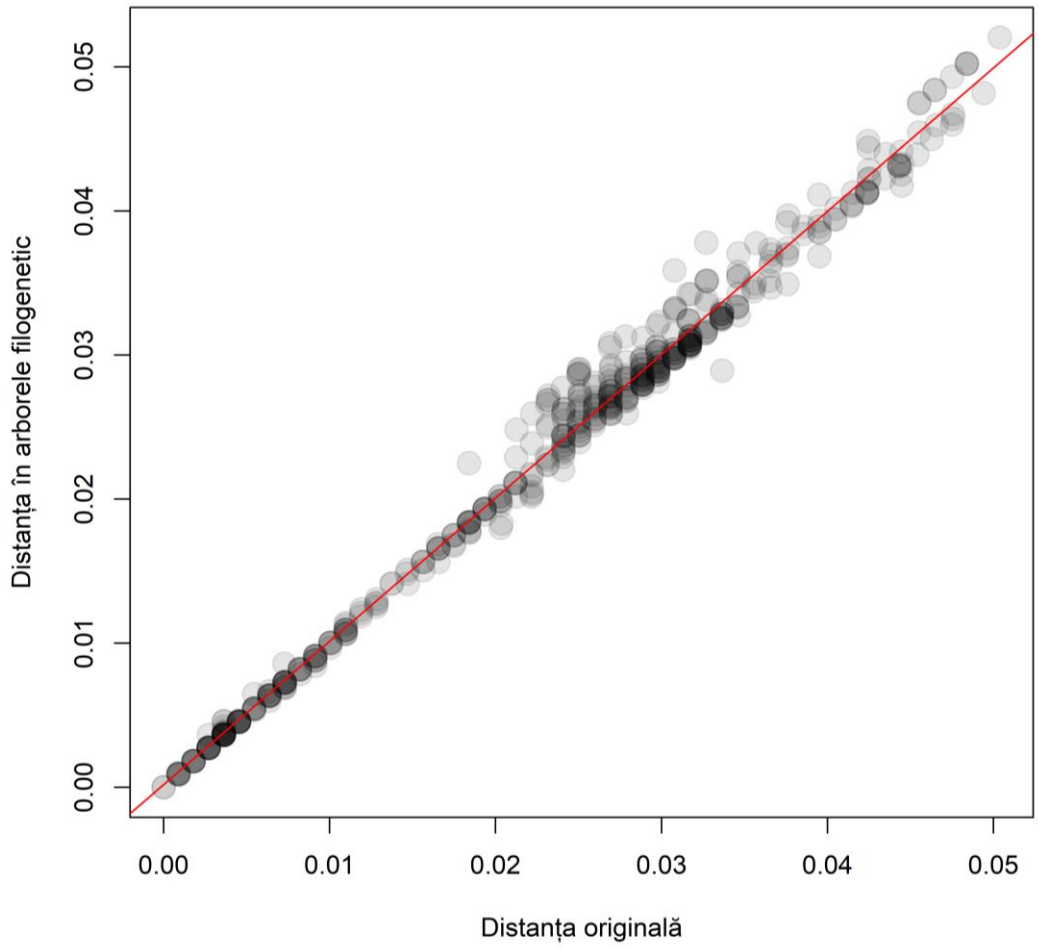


Fig. 4.4. Corelația dintre distanța prezentată în arborele filogenetic și distanța originală

Coeficientul cofenetic de corelație are o valoare de 0,99 ceea ce demonstrează o calitate înaltă a filogeniei obținute, arborele construit având o reprezentare corectă a distanțelor genetice. Cât privește filogenia obținută în baza secvențelor de *M. arvalis* și *M. levis* din Moldova aceasta este prezentată în Fig. 4.5.

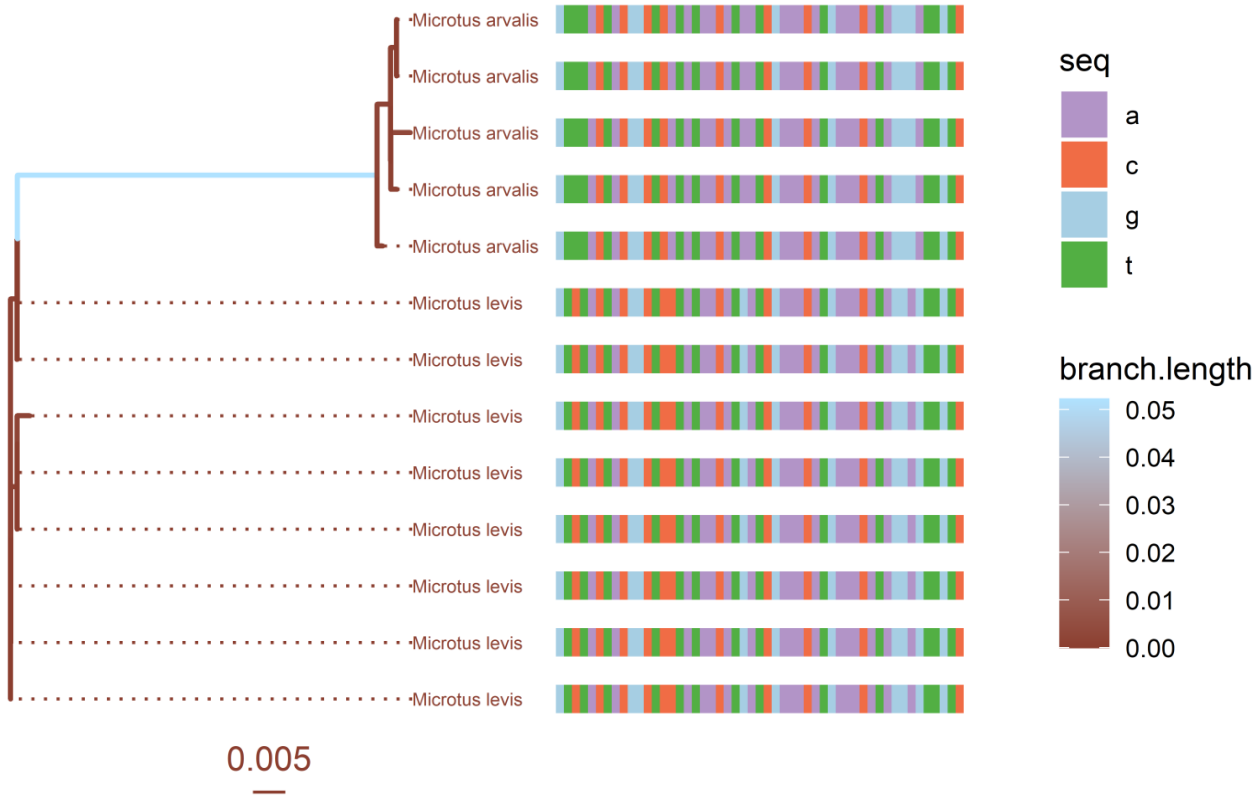


Fig. 4.5. Arborele filogenetic construit în baza secvențelor obținute de la microtine din Republica Moldova

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 speciilor de microtine

Parametru	Valoare
Numărul speciilor	2
Numărul secvențelor analizate	13
Dimensiune secvențe	1106 pb
Numărul site-urilor de variație	44
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 celor două specii 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 taxoni. Deși habitatul acestor două specii din Moldova se suprapune și există contact între populații, la exemplarele studiate nu au fost observați indici ai amestecului genetic 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* [26].

4.2. Modelarea distribuției speciilor cu utilizarea algoritmului Bioclim. 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) [15]. 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 [32]. În cercetarea de față algoritmul Bioclim a fost aplicat pentru modelarea distribuției unor specii rare de șerpi din Republica Moldova.

Elaphe sauromates (conform clasificării mai vechi – *Elaphe quatuorlineata sauromates*, șarpe cu patru dungi răsăritean) este o specie rară inclusă în Cartea Roșie a Moldovei (2015) la categoria specie critic periclitată (CR) [9]. Pe teritoriul țării noastre a fost semnalată prezența câtorva populații izolate (com. pers. Vladimir Țurcanu, 2018) 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).

Cauzele principale care au dus la dminuarea și fragmentarea arealului acestei specii în Moldova sunt reducerea și degradarea habitatelor naturale [30, 31, 33]. În baza datelor despre distribuția cunoscută a șarpelui cu patru linii și a variabilelor bioclimatice asociate, a fost elaborată harta cu privire la distribuția potențială a acestei specii pe teritoriul Republicii Moldova (Fig. 4.6)

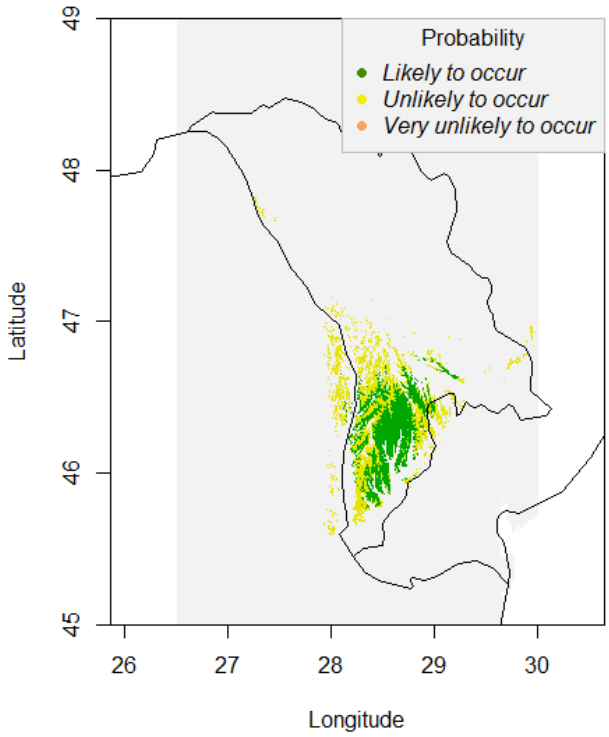


Fig. 4.6. Modelarea distribuției speciei
***Elaphe sauromates* pe teritoriul Republicii Moldova**

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 Sărata Nouă (46.5 N; 28.4 E) a fost descoperit un mascul mort, reprezentant al speciei *Elaphe sauromates* (Fig. 4.7).



Fig. 4.7. Șarpe cu patru linii răsăritean identificat la sudul țării (s. Sărata Nouă)

În Moldova ultima semnalare a 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 [9].

Vipera ursinii (vipera de stepă) este o specie de șarpe veninos inclusă în Cartea Roșie a Republicii Moldova, având statut de specie critic periclitată [Critically Endangered (CR)] [9], totuși ultima semnalare a prezenței speciei în țara noastră 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 peisagistică), însă se consideră că *V. ursinii* deja a dispărut din aceste locuri și nu mai face parte din herpetofauna țării noastre [18]. Astfel, în scopul modelării distribuției viperei de stepă pe teritoriul Republicii Moldova în calitate de date de intrare au fost utilizate locații cunoscute ale acesteia din România. Modelarea distribuției a indicat o potențială prezență a viperei de stepă în regiunea de sud a R. Moldova în zone cu silvostepă deluroasă, însă deplasările în acestă regiune nu au scos în evidență prezența speciei în țara noastră. *Vipera ursinii* 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 Habitate, Anexa I a CITES (Convention on International Trade in Endangered Species), Anexa II a Convenţiei de la Berna și Cartea Roșie a Europei [9].

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 cadrul 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* pentru genotiparea speciei *Sus scrofa* și diferențierea hibrizilor de liniile pure de mistreț.
5. În premieră, a fost secvențiată și efectuată analiza filogenetică a genei CYTB pentru 13 probe de microtine din Republica Moldova. În baza filogeniei elaborate a fost demonstrat că specimenele studiate de *Microtus arvalis* fac parte din linia filogenetică estică. Toate barcodurile moleculare ale specimenelor din Moldova au fost depozitate pe platforma globală *BOLD Systems*.
6. Modelarea distribuției unor specii rare de VT 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.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Aplicarea instrumentelor bioinformatice 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. Studierea 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 (SELECTIVĂ)

1. alpine L-Ld., ROBIBarcodes: Metabarcoding barcode database_. R package version 0.1. [online]. 2013. Disponibil: https://git.metabarcoding.org/obitools/ROBIBarcodes.
2. alpine L-Ld., ROBIBarcodes: Metabarcoding barcode database_. R package version 0.1. [online]. 2013. Disponibil: https://git.metabarcoding.org/obitools/ROBIBarcodes.
3. alpine L-Ld., ROBITools: Metabarcoding data biodiversity analysis_. R package version 0.1. [online]. 2012. Disponibil: https://git.metabarcoding.org/obitools/ROBITools.
4. Boyer, F. et al. OBITOOLS : a UNIX -inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour*. ianuarie 2016, 16(1), pp. 176–82.
5. 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.
6. 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.
7. Clark, K. et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 4 ianuarie 2016, 44(D1), pp. D67–72. Disponibil: https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276.
8. Coghlan, M.L. et al. Metabarcoding avian diets at airports: implications for birdstrike hazard management planning. *Investig Genet*. decembrie 2013, 4(1), pp. 27.
9. Comisia Naţională a Cărţii Roşii. Cartea Roșie a Republicii Moldova [online]. *Î.E.P. Ştiinţa, (Combinatul Poligr)*, 2015. pp. 492.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Hebert, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B*. 7 februarie 2003, 270(1512), pp. 313–21.
15. Hijmans, R.J., Elith, J. Species distribution modeling with R. [online] 2017. Disponibil: http://cran.nexr.com/web/packages/dismo/vignettes/sdm.pdf.
16. 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.
17. Johnston, A.D. et al. PrimerROC: accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis. *Sci Rep*. 18 ianuarie 2019, 9(1), pp. 209.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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/.
23. 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.
24. 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.
25. Sayers, E.W. et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*. 7 ianuarie 2022, 50(D1), D20–6.

26. **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.
27. **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.
28. 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.
29. Taberlet, P. et al. Environmental DNA [online]. Vol. 1. Oxford University Press, 2018 [citat 31 ianuarie 2023]. online ISBN: 9780191821387.
30. 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.
31. **Сытник, В.** Моделирование распространении 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.
32. Фокин, А. Оценка возможностей акклиматизации совок рода spodoptera в Румынии. In: *Sustainable use and protection of animal world diversity: International Symposium dedicated to 75th anniversary of Professor Andrei Munteanu*, Chișinău, Moldova. 2014, pp. 142–4. ISBN 978-9975-62-379-7. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/77277.
33. Цуркану, В. Формирование и современное распространение фауны змей Днестровско-Прутского междуречья. *Buletin Ştiinţific Revista de Etnografie, Ştiinţele Naturii şi Muzeologie*. Serie Nouă. Chișinău. 2005, nr. 2(15), pp. 73-77. ISSN 1857-0054.

PUBLICAȚII LA TEMA TEZEI DE DOCTORAT

1. Articole în reviste ştiinţifice

1.1 în reviste din străinătate recunoscute

1. SÎTNIC, V. Using R programming language for prediction of *Vipera ursinii* spatial niche in the Republic of Moldova. *Studii şi Comunicări*, 2017, Vol. 26: 65-67, Bacău, România, ISSN 1584-3416.

1.2 în reviste din Registrul Naţional al revistelor de profil

1. SITNIC, V., *In silico* validated primers for metabarcoding terrestrial vertebrate species from the Republic of Moldova. *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*, 2022, nr. 3(347), pp. 71-77. ISSN 1857-064X. DOI: 10.52388/1857-064X.2022.3.08. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/176480 **Categoria B**

2. NISTREANU, V., SÎTNIC, V., SAVIN, A., LARION, A., CALDARI, V., BURLACU, V., Diversitatea și ecologia speciilor de mamifere din Rezervația științifică „Pădurea Domnească". *Revista de Ştiinţă, Inovare, Cultură şi Artă „Akademos"*, 2023, nr. 1(68), pp. 22-32. ISSN 1857-0461. DOI: 10.52673/18570461.23.1-68.02. **Categoria B**

2. Articole în culegeri ştiinţifice

2.1 în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (peste hotare)

1. СЫТНИК, В. Ю., Моделирование распространении вида *Elaphe quatuorlineata* на территории Республики Молдова. В: *Биоразнообразие и рациональное использование природных ресурсов.* Материалы докладов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 29-30 martie 2018, Махачкала, с. 158-161. УДК: 598.162(478).

2. НИСТРЯНУ, В.Б., ЛАРИОН, А.Ф., КАРАМАН, Н.К., СЫТНИК, В., САВИН, А.И., СЫТНИК, В. Ю., Фауна и экология мелких млекопитающих стационара Хорэшть-Резень центральной части Республики Молдова. В: *Современные проблемы биологии и экологии*. Материалы докладов III Международной научно-практической конференции, г. Махачкала 4-5 марта 2021, pp75-79. ISBN 978-5-00128-638-7. CZU: 599:36/37-322/324(478) https://www.elibrary.ru/item.asp?id=46252877.

2.2 în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (Republica Moldova)

1. SÎTNIC, V. ADN-ul de mediu – instrument de monitorizare a diversității vertebratelor terestre. In: *Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă. Biologie*. Ediția 9, Vol.1, 19-20 martie 2022, Chișinău: Tipografia Universităţii de Stat din Tiraspol, 2022, pp. 98-101. ISBN 978-9975-76-389-9. CZU: 577.21:574.2+568/569

2. SÎTNIC, 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*, dedicated to the 75th anniversary from the creation of the first research subdivisions and 60th from the foundation of the Institute of Zoology. Ediția 10, 16-17 septembrie 2021, Chișinău: Institutul de Zoologie, 2021, pp. 375-378. ISBN 978-9975-157-82-7.
DOI: https://doi.org/10.53937/icz10.2021.61

3. Teze în culegeri ştiinţifice

3.1 în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (peste hotare)

1. CARAMAN, N., POSTOLACHI, V., CALDARI, V., SITNIC, V., NISTREANU, V. Mammal, reptile and amphibian fauna in forest ecosystems of Chisinau city. In: *Biology and sustainable development.* The 10th edition of the scientific symposium, program and abstracts, 8-9 noiembrie 2012, Bacău, România, pp. 25-26.

2. SITNIC, V., Intraspecific variation of the venom proteins from wild and captive *Vipera berus*, In: The Ninth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum, 22-25 noiembrie 2017, București, România, p.121.

3. SITNIC, V., Using R language and Bioclim algorithm for species distribution modelling. In: The Tenth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum, 2018, București, România, p.97.
www.czga.ro/wp-content/uploads/2020/01/CZGA2018_Book_of_Abstracts_online_edition_.pdf

4. SITNIC, V., NISTREANU, V., LARION, A., Bioinformatics algorithms - advances and applications In: *Biology and sustainable development.* The 17th edition of the scientific symposium. 5-6 decembrie 2019, Bacău, România, p. 84.

5. SITNIC, V., ȚURCANU, V., The impact of the environmental factors on body length of *Natrix tessellata* populations. In: *Biologia și dezvoltarea durabilă.* Complexul Muzeal de Științele Naturii "Ion Borcea" Bacău, ediția a XV-a, 7-8 decembrie 2017, Bacău, România, p. 53.

6. TURCANU, V., SITNIC, V., Study on the herpetofauna formation of the Prut-Nistru space. In: The Ninth International Zoological Congress of Grigore Antipa Museum, 22-25 noiembrie, 2017, București, România, p.120.
http://czga.ro/pozepagini/CZGA2017_Book_of_Abstracts_online_edition_.pdf

7. TURCANU, V., SITNIC, V., Potentially new species for the Republic of Moldova herpetofauna. In: *Biologia și dezvoltarea durabilă.* Complexul Muzeal de Științele Naturii "Ion Borcea" Bacău, ediția a XV-a, 7-8 decembrie 2017, Bacău, România p. 54.

3.2 în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (Republica Moldova)

1. SÎTNIC, V., NISTREANU, V., Rolul bioinformaticii în organizarea și integrarea datelor despre biodiversitatea organismelor. In: *Functional ecology of animals.* International symposium dedicated to the 70th anniversary from the birth of academician I.Toderas. 21 septembrie 2018, Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Zoologie, 2018, pp. 127-129. ISBN 978-9975-3159-7-5. DOI: https://doi.org/10.53937/9789975315975.24

3.3 în lucrările conferinţelor ştiinţifice naţionale cu participare internaţională

1. CARAMAN, N., NISTREANU, V., CALDARI, V., SÎTNIC, V., Speciile de rozătoare din biotopurile puternic antropizate ale localității Bacioi, mun. Chișinău. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*. 21-22 octombrie 2019, Chișinău, Republica Moldova: Tipogr. "Biotehdesign", p. 126-127.

2. SÎTNIC, 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*. 29-30 septembrie 2022, Chișinău, Republica Moldova: Moldova State University, p. 144. ISBN 978-9975-159-80-7.

3. SÎTNIC, Vv., CARAMAN, N., CALDARI, V., SÎTNIC, Vr., Density dynamics of rodent species in agrocenoses in the Republic of Moldova in 2021. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*. 29-30 septembrie 2022, Chișinău, Moldova: Moldova State University, 2022, p. 106. ISBN 978-9975-159-80-7.

4. SÎTNIC V., NISTREANU V., HECKEL G., LARION A., Sequencing and phylogenetic analysis of *Microtus arvalis* CYTB gene. In: *Natural sciences in the dialogue of generations*. 14-15 septembrie 2023, Chișinău, Moldova: Moldova State University, p. 126. ISBN 978-9975-3430-9-1. https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/189010.

ADNOTARE

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

Teza constă din introducere, 4 capitole, concluzii generale şi 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 bioinformatice 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 specimenele 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 bioinformatice 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 învățămînt 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.

SÎTNIC VICTOR

ABORDĂRI BIOINFORMATICE ÎN CERCETAREA DIVERSITĂȚII VERTEBRATELOR TERESTRE ÎN REPUBLICA MOLDOVA

165.02. Zoologie

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 26.10.2023
Hârtie offset. Tipar offset. Tirajul ex. 30
Coli de tipar: 1.0 Comanda nr. 2

Tipografia „Real Print” SRL
str. Nicolae Dimo 29/2, Chișinău, MD-2004, Republica Moldova