



MUZEUL NATIONAL DE ISTORIE NATURALA "GRIGORE ANTIPA"

Sos. Kiseleff, nr. 1, Bucuresti, sector 1, RO-011341; Telefon: (+40)-021-3128863, 312-8826; Fax: (+40)-021-3128863, 3128886; www.antipa.ro

Raport stiintific sintetic

Privind implementarea proiectului pe toata perioada de executie pana in prezent

Population genetic history of the *Sinanodonta woodiana* invasion: expansion pattern across Europe

Contract nr. 36/26.04.2013; cod proiect: PNII- RU-PD-2012-3-0479

Obiectiv:

Studiul istoriei evolutive a speciei *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* in aria invadata

1.1. Descrierea de noi resurse genetice in vederea studiului variabilitatii genetice a speciei *Anodonta (Sinanodonta) woodiana*

1.2. Colectare/izolare ADN provenit de la probe *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* din Europa si din aria nativa.

1.3. Genotiparea populatiilor de *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* din Europa

Studiul istoriei evolutive a speciei *A. woodiana* in aria invadata

1.1. Descrierea de noi resurse genetice in vederea studiului variabilitatii genetice a speciei *Anodonta (Sinanodonta) woodiana*

Anodonta (Sinanodonta) woodiana (Lea, 1834) (Scoica gigant chinezeasca sau Scoica de mlastina) este cea mai mare specie de unionid prezenta in fauna Europei. Aria sa nativa se intinde in Sud-Estul Asiei (din Sud-Estul Rusiei pana in Malaezia) dar s-a extins rapid, in ultimele decenii peste Europa, specia fiind prezenta acum si in alte parti ale lumii cum ar fi America de Sud si America de Nord (Bogan et al. 2011; Demayo et al. 2012).

Patrunderea acestei specii in Europa a fost facilitata de introducerea in crescatorii a speciilor est asiatice de ciprinide (*Ctenopharyngodon idella*, *Hypophthalmichthys molitrix*) in prioada 1963-1965. Stocurile de pesti cu care au fost populate crescatoriile erau parazitare cu glochidii, stadiul larvar al acestor scoici. Raspandirea ulterioara a acestei specii, peste intreaga Europa, pare a fi corelata cu translocarile speciilor de pesti. Comertul cu diferite specii de pesti infectate cu glochidii (Figura 1), intre regiuni tari din Europa se pare ca au facilitat raspandirea aceste specii de scoica in noi regiuni.



Figura 1. Glochidii de scoica fixate pe branhii

Caracteristicile fiziologice, ecologice si biologice ale acestei specii ii ofera anumite avantaje in comparatie cu speciile native de unionide, fapt ce poate explica succesul pe care specia l-a avut in invadarea de noi teritorii (Corsi et al. 2007).

Pana in prezent, studiile de genetica populatiilor speciei *A. woodiana* in Europa s-au efectuat cu ajutorul markerilor cu evolutie lenta, cum ar fi alozimele sau ADN-ul mitocondrial, pentru a analiza cateva populatii izolate (Nagel et al. 1996; Soroka 2005; Soroka et al. 2014).

Pentru a intelege mecanismul invaziei acestei specii, care a fost foarte rapid in Europa, sunt necesari markeri ADN cu evolutie rapida cum sunt fragmentele de ADN microsatelit. Acesti markeri sunt ideali pentru a studia aspecte importante ale geneticii populatiilor speciilor invazive cum ar fi: stabilirea cailor de invazie, timpul si numarul evenimentelor de colonizare, etc. Primii 8 markeri ADN microsateliti pentru aceasta specie au fost descrisi in 2011 (Popa et al. 2011). Cercetari recente au

demonstrat ca acest numar este insuficient pentru a putea aborda aspecte importante ale istoricului evolutiv al speciei si descrierea unui numar suplimentar de markeri se impunea pentru a putea ridica nivelul studiilor viitoare de genetica a populatiilor (Koskinen et al. 2004).

In cadrul prezentului proiect ne-am propus ca activitate descrierea de noi markeri ADN microsatelit pentru aceasta specie. Astfel, au fost descrisi 9 markeri ADN microsatelit noi pentru specia *A. woodiana*. De asemenea, au fost combinati noii markeri descrisi cu markeri existenti pentru aceasta specie in trei paneluri PCR multiplex, ce au fost optimizate, in vederea reducerii considerabile a timpului si costurilor alocate procesului de genotipare (vezi figura 2), precum si pentru a reduce riscul de contaminare a probelor datorita manipularii frecvente.

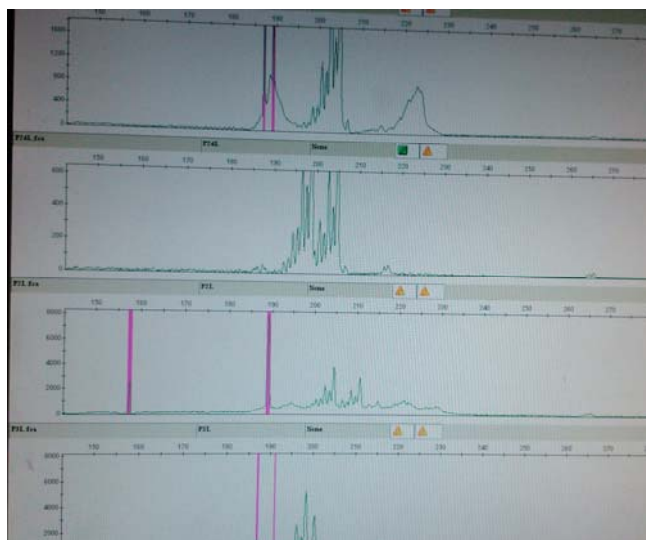


Figure 2. Electroforegrame - genotipare *A. woodiana*

Pentru identificarea celor 9 markeri ADN microsatelit a fost utilizat un protocol de imbogatire in fragmente repetitive a unei librarii genomice a speciei *A. woodiana*. Procentul total de loci polimorfici pentru specia *A. woodiana* a fost de 9.57% (din 94 de loci testati numai 9 au fost polimorfici).

Numarul relativ mic de loci polimorfici poate fi explicat prin factori intrinseci cum ar fi un numar mic de fragmente repetitive in genomul acestei specii sau structura secventelor repetitive precum si a regiunilor lor flancatoare, ce pot suferi mutatii dar si prin factori extrinseci cum este dificultatea binecunoscuta in dezvoltarea de noi markeri ADN microsateliti la moluste (McInerney et al. 2011). Markerii ADN microsatelit descrisi in aceasta etapa a proiectului prezinta un numar de alele care variaza intre 3 (loci AW 378 si AW28) si 8 (AW 570) intr-o populatie cu 27 indivizi genotipati. Aceste valori sunt in asemanatoare cu cele raportate pentru aceasta specie in cazul markerilor descrisi anterior de Popa si colab. 2011.

Cele 3 paneluri PCR multiplex care au fost optimizate vor facilita un studiu de genetica a populatiilor la scara larga pentru specia de scoica invaziva *A. woodiana*. Panelurile pentru PCR Multiplex necesita de cele mai multe ori un proces de optimizare excesiv, pentru a minimiza preamplificarile succesive, formarea dimerilor de primeri, fenomene ce pot complica si ingreuna procesul de genotipare.

In concluzie, acest nou set de markeri ADN microsateelit descrisi pentru specia *Anodonta (Sinanodonta) woodiana*, impreuna cu markeri descrisi anterior vor furniza un puternic instrument de studiu in genetica populatiilor acestei specii invazive.

1.2. Colectare/izolare ADN provenit de la probe *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* din Europa si din aria nativa.

In tabelul 1 sunt prezentate populatiile speciei *A. woodiana* analizate in cadrul prezentului proiect. Georeferentierea punctelor de colectare este reprezentata in figura 3.

Tabel 1. Provenienta populatiilor de *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* analizate in acest proiect

SAMPLES INDEX	SPECIES	COLLECTING POINT	GPS	COUNTRY	COLLECTED BY
P1- P20	<i>A woodiana</i>	Szczecin	53.425559° 14.553695°	Poland	Marianna Soroka
371-378	<i>A woodiana</i>	Budapest	47.631442° 19.106929°	Hungary	Marianna Soroka
DR1-DR30	<i>A woodiana</i>	Danube River	43.870002° 25.980742°	RO_BG	Teodora Trichkova
SW1_SW20	<i>A woodiana</i>	Vadeni, Prut River	45.355044° 28.020579°	Romania	Oana Popa
022 SW -F6	<i>A woodiana</i>	Arles	43.631440° 4.617606°	Franta	Vincent Prie
SW_A1- A3	<i>A woodiana</i>	Delaware Bay Basin	39.725889° -75.515845°	New Jersey USA	Arthur Bogan
SW_IR_1- 18	<i>A woodiana</i>	Iskar River	42.513775° 23.536434°	Bulgaria	Teodora Trichkova
PNLM 1-9	<i>A woodiana</i>	Mures River	46.148661° 21.266622°	Romania	Oana Popa
AWC2 1 -27	<i>A woodiana</i>	Kyjovka River	48.931452° 17.294615°	Cehia	Martin Reichard
M1-30	<i>A woodiana</i>	Lake Maggiore	45.919846° 8.576215°	Italy	Nicoletta Riccardi
aw 1-15	<i>A woodiana</i>	Trebonsko fishpond area	48.987874° 14.748950°	Poland	Karel Douda
AW_SD_1- 22	<i>A woodiana</i>	Danube River, Svinita	44.492684° 22.105147°	Romania	Gabi Chisamera
1-20_HU	<i>A woodiana</i>	Balaton Lake	46.732266° 17.253134°	Hungary	Oana Popa
1- 20_CR	<i>A woodiana</i>	Drava River	46.091674° 17.213192°	Croatia	Jasna Latjner
SW_P1L- 30L	<i>A woodiana</i>	Lichen	52.301223° 18.321664°	Poland	Karel Douda
AW_S1 - 28	<i>A woodiana</i>	Spytkovice	49.450929° 19.876092°	Poland	Karel Douda
SD1-SD11	<i>A woodiana</i>	Shengdong	29.462349° 106.777209°	China	Martin Reichard
N1 N27	<i>A woodiana</i>	Nanchang	29.462349° 106.777209°	China	Martin Reichard

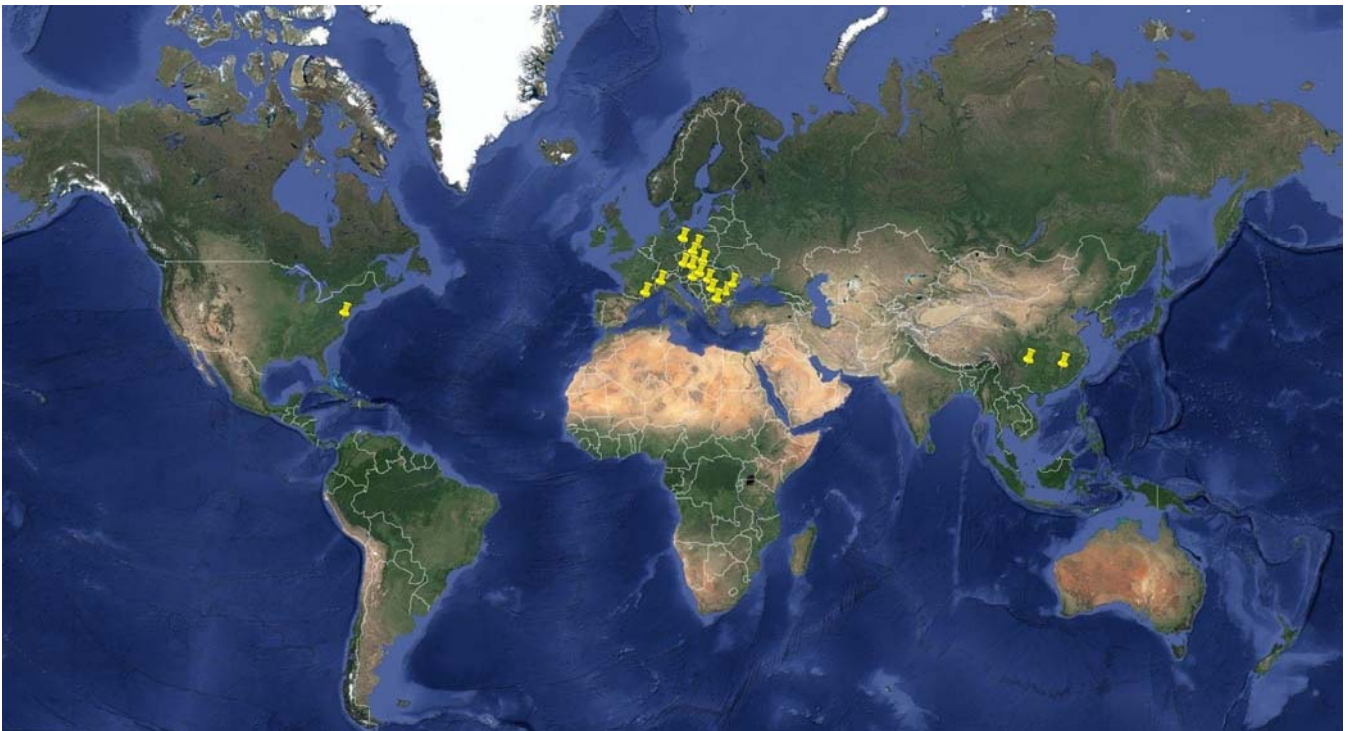


Figure 3. Distributia populatiilor de *A woodiana* studiate in cadrul prezentului proiect



Figure 4. Forme morfologice distincte ale speciei *A. woodiana* prezente in Europa

1.3. Genotiparea populatiilor de *Anodonta (Sinanodonta) woodiana* din Europa

Diversitatea genetica, privita ca nivel al biodiversitatii se refera la numarul total de caracteristici genetice din profilul genetic al acestei specii. Folosim termenul de diversitate genetica atunci cand ne referim la variabilitatea intrapopulationala si termenul de diferentiere genetica atunci cand ne referim la diveristatea interpopulationala.

Teoretic, populatiile care prezinta o diversitate genetica mare pot supravietui si pot reactiona bine cu schimbarile survenite in mediul inconjurator. Populatiile care au o diversitate genetica scazuta, sunt vulnerabile la schimbari produse in mediul inconjurator, la boli si la consangvinizare. Dupa invazie, sunt de asteptat schimbari la nivelul structurii genetice in populatiile invadatoare, ca o consecinta a numarului redus de indivizi fondatori in populatiile nou formate. O astfel de schimbare ar fi hibridizarea intre indivizi proveniti din populatiile noi si cele pre-existente in aria invadata ceea ce ar explica paradoxul genetic raportat in cazul speciilor invazive si anume presupusa pierdere a diversitatii in timpul invaziei in contrast cu fitnessul ridicat al populatiilor speciilor invazive.

In unele cazuri, ipoteza binecunoscuta a efectului de fondator si reducerea diversitatii genetice in momentul introducerii nu par a fi sustinute de date. Wares et al. (2005) a regasit ca unele specii de animale invadatoare (29 de specii analizate) retin 80% din diversitatea genetica a populatiilor din aria nativa.

Pentru a obtine date despre diversitatea genetica a populatiilor speciei *A. woodiana* in Europa si in aria nativa (China, Sud-Estul Asiei) au fost utilizati markeri de tip ADN microsatelit, care datorita proprietatilor lor pot fi utilizati pentru studiul evolutiei la scara temporala redusa a populatiilor.

Printre problemele care pot fi studiate cu acest tip de markeri se numara: extinderea sau restrangerea populatiei in trecut; fluctuatii in ceea ce priveste dimensiunile unei populatii; relatiile de tip sursa-donator intre diferite populatii; determinarea populatiilor sursa ale unor specii invazive; caile de introducere, numarul de introduceri; dimensiunea initiala a populatiei invazive; viabilitatea si variabilitatea populatiilor speciilor invazive studiate.

Datele preliminare obtinute prezinta o comparatie realizata intre trei populatii din Europa, din aria invadata si o populatie din aria nativa a scoicii. Din Europa au fost analizate probe provenite din Ungaria (Lacul Balaton), Cehia (raul Kyjovka) si Polonia (raul Odra, in apropiere de Szczecin). Populatia din aria nativa a speciei provine din China, din regiunea Nanchang. In total au fost analizate 95 de exemplare de *A. woodiana*.

Genotiparile au fost realizate utilizand platforma ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer. Dimensiunea alelelor a fost determinata cu ajutorul softului GENEMAPPER v. 5.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) si prin verificare manuala. Analizele genetice au fost realizate utilizand softurile GenAlEx 6.501 si Genepop 4.2 pentru a testa echilibrul Hardy-Weinberg pentru fiecare locus si pentru a estima numarul total de alele (NA), heterozigotie observata si asteptata (HO; HE) precum si indicele de fixare (FIS) (Peakall and Smouse 2006). FSTAT a fost utilizat pentru a testa diferentierea genetica intre populatii (pairwise Fst). Prezenta alelelor nule si a erorilor de genotipare a fost testata cu MICRO-CHECKER ver. 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004).

Populatia din aria nativa prezinta cel mai mare numar de allele private (38), fata de populatiile din Europa, care au intre 1 si 5 allele private. De asemenea, cele 4 populatii analizate au 36 de allele comune. Potrivit unor parametri ca numar total de allele, allele private, valorile heterozigotiei observata si estimate, populatiile speciei *A. woodiana* din aria invadata pare ca au pierdut o parte din diversitatea genetica a populatiilor native.

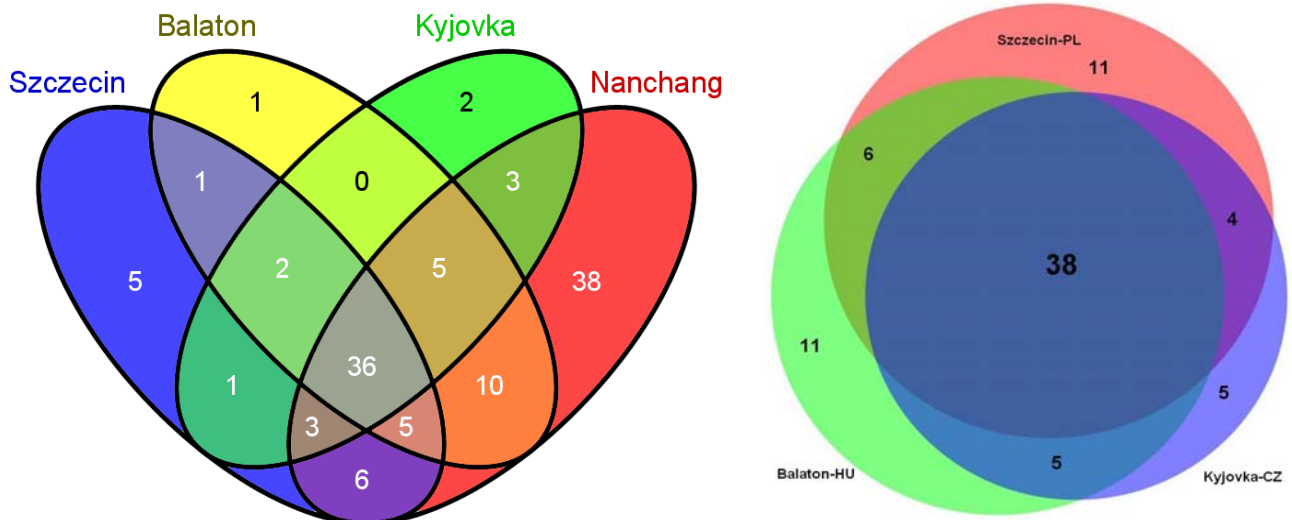


Figure 4. Distributia alelelor intre populatiile analizate

Cele 3 populatii europene ale speciei *A. woodiana* analizate au un numar de 38 de allele comune, in timp ce numarul de allele private este cuprins intre 5 (populatia din Cehia) si 11 (populatiile din Polonia si Ungaria).

Diferentierea genetica a fost testata cu ajutorul indexului Dest (Jost 2008), care inregistreaza valori lineare intre 0 (identitate completa) si 1 (diferentiere completa). Diferentierea genetica inregistrata intre populatia nativa din China si restul populatiilor europene variaza intre 0.307-0.525, valori corespunzatoare unei diferentieri genetice moderate.

De asemenea, diferentierea genetica intre populatia din aria nativa si fiecare dintre populatiile europene invazive analizate a fost mai mare decat diferentierea genetica inregistrata intre oricare dintre populatiile europene studiate.

CONCLUZII SI PLANURI DE VIITOR

C1. Cea mai ridicata diversitate genetica a fost regasita in populatia nativa din China a speciei *A. woodiana*, potrivit parametrilor analizati (numar de alele private si numar total of alele, heterozigotie observata si asteptata)

Plan de viitor: vor fi analizate maxim 5 populatii din aria nativa a speciei

C2. Datele genetice prezentate in acest raport sustin ideea ca populatiile invazive Europene si-au pierdut partial diversitatea genetica originala.

Plan de viitor: vor fi analizate datele provenite din gentiparea celor 15 populatii europene colectate in cadrul prezentului proiect.

C3. Diferentierea genetica intre populatiile native de *A. woodiana* si cele invazive, europene a fost mare mare decat cea intregistrata intre oricare dintre cele 3 populatii invazive analizate.

Plan de viitor: vor fi utilizate alte metode si softuri specializate de analiza cum ar fi STRUCTURE si/sau ABC (Approximate Bayesian Computation); va fi analizat un set de date complet, obtinut in urma analizei intregului esantion de probe prelevate in cadrul prezentului proiect, ceea ce va conduce la indeplinirea scopului final al acestui proiect si anume:

Descifrarea mecanismului genetic al invaziei speciei *Anodonta woodiana*

REFERENCES:

- Bogan AE, Bowers-Altman J, Raley ME (2011) The first confirmed record of the Chinese Pond Mussel (*Sinanodonta woodiana*) (Bivalvia: Unionidae) in the United States. *Nautilus* 125 (1):41-43
- Corsi I, Pastore AM, Lodde A, Palmerini E, Castagnolo L, Focardi S (2007) Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, *Anodonta* sp. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145 (3):413-419
- Demayo CD, May C, Cabacaba K, Tores MAJ (2012) Shell shapes of the Chinese Pond Mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) from Lawis Stream in Iligan City and Lake Lanao in Mindanao, Philippines. *Advances in Environmental Biology* 6 (4):1468-1473
- Douda K, Vrtilek M, Slavik O, Reichard M (2012) The role of host specificity in explaining the invasion success of the freshwater mussel *Anodonta woodiana* in Europe. *Biological Invasions* 14 (1):127-137. doi:10.1007/s10530-011-9989-7
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Leger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11:591 - 611
- Koskinen MT, Hirvonen H, Landry P-A, Primmer CR (2004) The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: An empirical perspective. *Hereditas* 141:61-67
- Malausa T, Gilles A, Meglécz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Delye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Male PJ, Ferreira S, JF. M (2011) Highthroughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* 11:638 – 644
- McInerney CE, Allcock AL, Johnson MP, Bailie DA, Prodoehl PA (2011) Comparative genomic analysis reveals species dependent complexities that explains difficulties with microsatellite marker development in molluscs. *Heredity* 106 (1):78-87
- Megléc E, Costedoat C, Dubut V, Gilles A, Malausa T, Pech N, Martin JF (2010) QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* 26 (3):403-404. doi:doi: 10.1093/bioinformatics/btp670
- Nagel K-O, Badino G, Alessandria B (1996) Population genetics of European Anodontinae (Bivalvia:Unionidae). *J Moll Stud* 62:343-357
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295
- Popa OP, Popa LO, Krapal AM, Murariu D, Iorgu EI, Costache M (2011) *Sinanodonta woodiana* (Mollusca: Bivalvia: Unionidae): Isolation and Characterization of the First Microsatellite Markers. *International Journal of Molecular Sciences* 12 (8):5255-5260. doi:10.3390/ijms12085255
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249
- Sarkany-Kiss A (1986) *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) a new species in Romania (Bivalvia, Unionacea) *Travaux du Museum National d Histoire Naturelle "Grigore Antipa"* XXVIII:15-17
- Soroka M (2005) Genetic variability among freshwater mussel *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae) populations recently introduced in Poland. *Zoological Science* 22 (10):1137-1144
- Soroka M, Urbanska M, Andrzejewski W (2014) Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia): origin of the Polish population and GenBank data. *Journal of Limnology* 73. doi:10.4081/jlimnol.2014.938
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538

Director proiect,

Dr. Oana Paula POPA