



# 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](http://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 perioada 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, in intreaga Europa, pare a fi corelata cu translocarile speciilor de pesti la nivel european. Comerțul cu diferite specii de pesti infectate cu glochidii, între regiuni și țări din Europa se pare că a facilitat răspandirea acestei specii de scoica în noi regiuni.



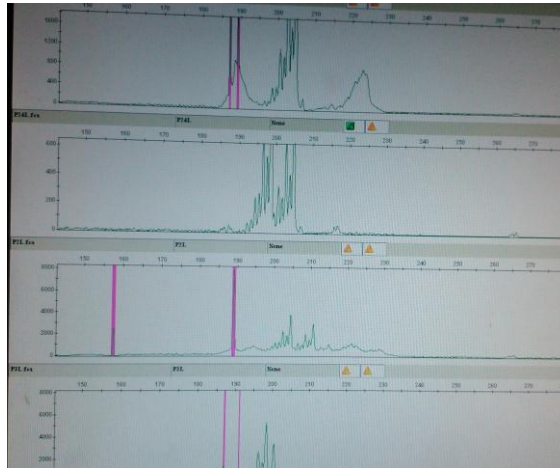
Figure 1. Glochidii de unionid atasate de branhiile pestilor

Caracteristicile fiziologice, ecologice și biologice ale acestei specii îi oferă anumite avantaje în comparație cu speciile native de unionide, fapt ce poate explica succesul pe care specia l-a avut în invadarea de noi teritorii (Corsi et al. 2007).

Studiile de genetica populațiilor speciei *A. woodiana* în Europa s-au efectuat cu ajutorul markerilor cu evoluție lentă, cum ar fi alozimele sau ADN-ul mitocondrial, pentru a analiza câteva populații izolate (Nagel et al. 1996; Soroka 2005; Soroka et al. 2014).

Pentru a înțelege mecanismul invaziei acestei specii, care a fost foarte rapidă în Europa, sunt necesari markeri ADN cu evoluție rapidă cum sunt fragmentele de ADN microsatelit. Acești markeri sunt ideali pentru a studia aspecte importante ale geneticii populațiilor speciilor invazive cum ar fi: stabilirea căilor de invazie, timpul și numărul evenimentelor de colonizare, etc. Primii markeri ADN microsateliți pentru această specie au fost descriși în 2011 (Popa et al. 2011). Cercetări recente au demonstrat că acest număr este adesea insuficient pentru a putea aborda aspecte importante ale istoricului evolutiv al speciei și descrierea unui număr suplimentar de markeri se impunea pentru a putea ridica nivelul studiilor viitoare de genetica a populațiilor (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, precum si pentru a reduce riscul de contaminare a probelor datorita manipularii frecvente.



**Figure 2. Electroforegrame ale locilor nou dezvoltati**

Pentru identificarea celor 9 markeri ADN microsatelit a fost utilizat un protocol de imbogatire in fragmente repetitive a unei librarii genomice. 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 asemanatoare cu cele raportate pentru aceasta specie in cazul markerilor descrisi anterior de Popa si colab. 2011.

Cele 3 paneluri de 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 de Multiplex PCR 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 microsatelit descrisi pentru specia *Anodonta (Sinanodonta) woodiana*, impreuna cu markeri descrisi anterior vor furniza un puternic instrument de studiu in genetica populatiilor acestei specii invazive.

**Table 1. Caracterizarea celor trei paneluri PCR multiplex pentru specia *A. woodiana* (Popa et al. 2015)**Characteristics of the three microsatellite PCR multiplexes in *A. woodiana*.

Locus	Size range	Label	Primer sequence (5'–3')	Annealing temp. (T <sub>a</sub> ) °C	Conc. (μM)
<b>PCR multiplex set 1</b>					
SW 2	132–174	FAM	F: caaaaatgaaccggacacct R: cccaaactcgtttcattgg	55 °C	0.2
SW4	195–209	VIC	F: agcgcaattaccagtggttt R: ttgattgcgatgactggaaa		0.2
SW7	193–213	PET	F: ctgccacactgcagatattgt R: aacacgttcgaaatccgagt		0.35
SW13	217–263	FAM	F: cgccatgtcaaaaatcaaag R: gccacaagcatgagatgtgt		0.35
AW 521	89–128	VIC	F: tcggattcttcatccatcatt R: tgatgatcaggaagtgaagagg		0.45
AW 536	187–195	NED	F: ccacgttcgatctgctcagtg R: tttagaanaacgagaatgtccg		0.05
					0.05
					0.1
				0.1	
<b>PCR multiplex set 2</b>					
SW3	134–164	FAM	F: tgaactgggtccaatcca R: ctcccgaagagcacaacat	55 °C	0.25
SW14	158–202	VIC	F: ccggtgttcaaggaaat R: ttttctggcgactttccac		0.25
SW15	287–325	VIC	F: aaccgacaagtcttcaata R: cagctgagtcgattaggacaga		0.35
SW18	122–200	PET	F: gtaactgtctcgtcgggtcat R: gcctcggctagacatcac		0.3
AW 238	171–195	NED	F: ccaccataatactggtcgca R: ttcatggtcgaaaacttca		0.3
AW 292	243–282	NED	F: ttcatcttaattgtgactgaa R: gttgacagtcgcttttga		0.1
					0.1
					0.1
<b>PCR multiplex set 3</b>					
AW 28	125–131	PET	F: ttggtgtagctaaggctgga R: tagcagtggaacagcgtttg	59 °C	0.1
AW 324	179–266	FAM	F: catagctcccagccaca R: gatgaatggataaacgtgatcata		0.1
AW 378	111–123	NED	F: tgggaaaactaggagacaatca R: tcgtgtgctaacaatggcc		0.1
AW 514	161–182	VIC	F: cgccatgtatagcctagcgt R: ttgatagtgcttgctgtgc		0.1
AW 570	180–222	NED	F: acgctgatgtacaatctaaga R: ggaaagacgtagctgattcattat		0.05
					0.4
					0.4
					0.4

T<sub>a</sub> annealing temperature.

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

In cadrul proiectului de cercetare au fost colectate 600 de exemplare de *A. woodiana* apartinand la 24 de populatii de pe trei continente, respectiv Europa, Asia si America de Nord. In tabelul urmator sunt prezentate populatiile analizate in proiect, in timp ce figurile 3-4 prezinta distributia geografica a acestor populatii.

Index Probe	Specie	Localitate	Coordonate GPS	Tara	Legit
PLSZ1- PLSZ20	A woodiana	Szczecin	53.425559° 14.553695°	Poland	Marianna Soroka
371-378	A woodiana	Budapest	47.631442° 19.106929°	Hungary	Marianna Soroka
DR1-DR30	A woodiana	Danube River	43.870002° 25.980742°	RO_BG	Teodora Trichkova
SW1_SW20	A woodiana	Vadeni, Prut River	45.355044° 28.020579°	Romania	Oana Popa
022 SW -F6	A woodiana	Arles	43.631440° 4.617606°	Franta	Vincent Prie
SW_A1- A3	A woodiana	Delaware Bay Basin	39.725889° -75.515845°	New Jersey USA	Arthur Bogan
SW_IR_1- 18	A woodiana	Iskar River	42.513775° 23.536434°	Bulgaria	Teodora Trichkova
PNLM 1-9	A woodiana	Mures River	46.148661° 21.266622°	Romania	Oana Popa
AWC2 1 -27	A woodiana	Kyjovka River	48.931452° 17.294615°	Cehia	Martin Reichard
M1-30	A woodiana	Lake Maggiore	45.919846° 8.576215°	Italy	Nicoletta Riccardi
aw 1-15	A woodiana	Trebonsko fishpond area	48.987874° 14.748950°	Poland	Karel Doua
AW_SD_1- 22	A woodiana	Danube River, Svinita	44.492684° 22.105147°	Romania	Gabi Chisamera
HUBA1-HUBA20	A woodiana	Balaton Lake	46.732266° 17.253134°	Hungary	Oana Popa
1- 20_CR	A woodiana	Drava River	46.091674° 17.213192°	Croatia	Jasna Latjner
SW_PIL- 30L	A woodiana	Lichen	52.301223° 18.321664°	Poland	Karel Doua
AW_S1 - 28	A woodiana	Spytkovice	49.450929° 19.876092°	Poland	Karel Doua
SD1-SD11	A woodiana	Shengdong	29.462349° 106.777209°	China	Martin Reichard
N1 N27	A woodiana	Nanchang	29.462349° 106.777209°	China	Martin Reichard
CNBA1-CNBA24	A woodiana	Baoan Lake	22.541539° 113.872242°	China	Karel Doua
CNHA1-CNHA24	A woodiana	Hangzhou	30.252862° 120.151933°	China	Karel Doua
CNJI1-CNJI24	A woodiana	Jianli	29.794495° 112.869155°	China	Karel Doua
CNPO1-CNPO24	A woodiana	Poyang Lake	29.148518° 116.322083°	China	Karel Doua

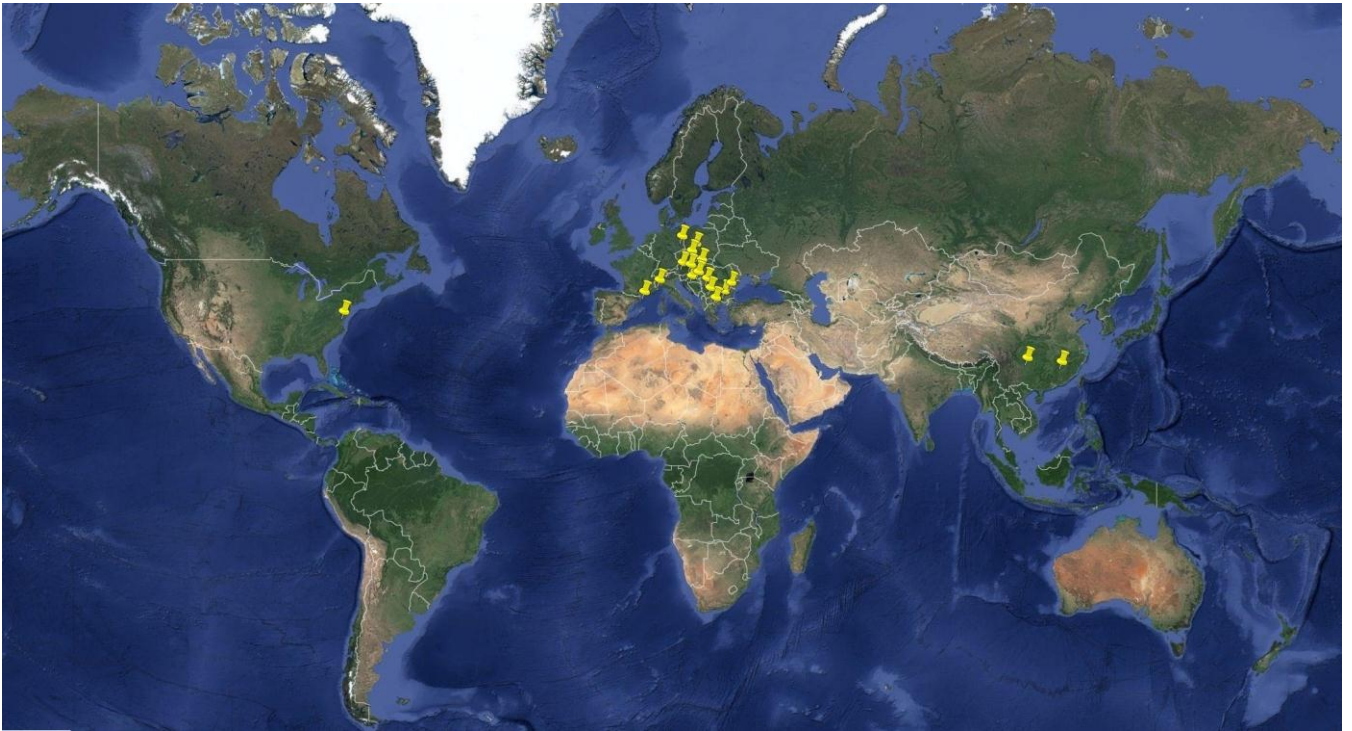


Figure 3. Distributia populatiilor de *A. woodiana* studiate in cadrul prezentului proiect



Figure 4. Distributia populatiilor de *A. woodiana* colectate din Europa, China, America de Nord

### 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 diversitatea interpopulationala.

Teoretic, populatiile care prezinta o diversitate genetica mare pot supravietui si pot interactiona 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 asteptam 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, care 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.

Genotiparile au fost realizate utilizand platforma ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer. Alelele au fost dimensionate cu ajutorul softului GENEMAPPER v. 5.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) si verificate manual. Analizele genetice au fost realizate utilizand softurile GenAlEx 6.501/Genepop 4.2 pentru a testa echilibrul Hardy-Weinberg pentru fiecare locus si pentru a estima numarul total de alele (NA), heterozigotia observata si asteptata ( $H_O$ ;  $H_E$ ) indexul de fixare (FIS) (Peakall and Smouse 2006). FSTATa fost utilizat pentru a testa diferentierea genetica intre populatii (pairwise  $F_{st}$ ). Prezenta alelelor nule si a erorilor de genotipare au fost testate cu MICRO-CHECKER ver. 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Gradul de diferentiere genetica dintre populatii a fost examinat cu ajutorul indicelui  $F_{st}$  implementat in acelasi program software. A fost calculata de asemenea distanta genetica Jost ( $J_{st}$ ) (Jost 2008). Am utilizat diagrame Van Veen pentru a reliefa distributia alelelor private si comune intre populatiile analizate.

Pentru a investiga structura genetica a speciei *A. woodiana* in Europa am utilizat un algoritm Bayesian implementat in STRUCTURE v. 2.3.3. Numarul total de clustere posibile (K) testate a avut valori

intre 1 si 23, (numarul total de populatii posibile) cu 20 repetitii independente pentru fiecare cluster posibil cu  $10^6$  iteratii Markov chain Monte Carlo (MCMC), si un burn-in initial de  $10^5$ .

Au fost genotipate 532 de exemplare apartinand speciei *A. woodiana* cu ajutorul a 17 markeri ADN microsatelit grupati in 3 paneluri PCR multiplex dupa protocolul publicat de Popa et al. 2015.

Pentru maxim 10 exemplare apartinand fiecărei populatii analizate, a fost amplificat prin PCR un fragment de 700bp apartinand genei pentru citocrom oxidaza I. Au fost utilizati primerii LCO1490, 5`-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3` si HCO2198, 5`-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3` (Folmer et al. 1994). Secventele obtinute au fost aliniat utilizand CodonCode Aligner 2.0 (CodonCode Corporation, Dedham, MA) si apoi editate manual. Secventele editate au fost aliniat apoi cu softul ClustalW, implementat in programul Mega 4 (Tamura et al., 2007) utilizand parametrii impliciti. Aliniamentele obtinute, fara ambiguitati si fara codoni stop au fost ulterior utilizate in analize.

Pentru a putea descrie modelul filogeografic al raspandirii acestei specii la nivel europeana fost efectuata o analiza de tip network prin metoda median-joining (BANDELT et al., 1999) implementata in programul NETWORK 4.2.0.1 (RÖHL, 1997).



Table 2. *A. woodiana*-diversitate genetica (Na = Mean No. of Different Alleles; Ne = Mean No. of Effective Alleles; Ho = Mean Observed Heterozygosity; He = Mean Expected Heterozygosity)

Pop		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
ROSV	Mean	21.900	7.900	4.694	1.655	0.785	0.757	0.775	-0.042
	SE	0.100	1.159	0.557	0.143	0.041	0.029	0.030	0.051
CZKY	Mean	61.200	8.100	4.023	1.520	0.715	0.700	0.706	-0.030
	SE	0.389	1.090	0.536	0.150	0.058	0.049	0.049	0.063
PLLI	Mean	36.000	8.100	4.872	1.695	0.758	0.763	0.774	0.013
	SE	0.000	0.948	0.624	0.128	0.052	0.029	0.029	0.047
ITMA	Mean	22.500	4.200	2.560	0.993	0.587	0.543	0.556	-0.038
	SE	0.167	0.593	0.357	0.131	0.072	0.059	0.060	0.096
ITPO	Mean	9.900	4.800	3.480	1.262	0.659	0.639	0.674	0.011
	SE	0.100	0.554	0.507	0.149	0.091	0.059	0.063	0.079
HUBA	Mean	20.900	7.500	4.274	1.612	0.776	0.746	0.764	-0.044
	SE	0.100	1.035	0.452	0.113	0.043	0.022	0.023	0.058
BGIS	Mean	17.900	6.900	4.768	1.641	0.797	0.759	0.780	-0.066
	SE	0.100	0.781	0.538	0.126	0.041	0.032	0.033	0.063
CNSH	Mean	10.500	6.700	4.531	1.558	0.603	0.711	0.746	0.141
	SE	0.224	0.920	0.769	0.167	0.068	0.054	0.056	0.078
CNNA	Mean	26.600	13.700	8.615	2.241	0.812	0.851	0.868	0.042
	SE	0.221	1.469	1.286	0.152	0.036	0.026	0.026	0.042
PLOP	Mean	33.700	7.100	4.054	1.522	0.682	0.722	0.733	0.045
	SE	0.153	0.900	0.487	0.121	0.040	0.030	0.031	0.059
HUDA	Mean	7.400	4.700	3.761	1.348	0.798	0.695	0.746	-0.175
	SE	0.163	0.616	0.436	0.131	0.041	0.039	0.042	0.076
FR	Mean	5.900	5.500	4.452	1.500	0.713	0.727	0.795	0.020
	SE	0.100	0.687	0.667	0.138	0.070	0.037	0.040	0.087
PLSP	Mean	27.600	6.300	3.706	1.396	0.650	0.664	0.677	0.043
	SE	0.221	0.844	0.571	0.158	0.084	0.057	0.058	0.083
HR	Mean	27.100	8.100	4.452	1.651	0.727	0.760	0.774	0.042
	SE	0.605	1.100	0.382	0.108	0.037	0.021	0.022	0.044
PLKO	Mean	25.100	7.600	3.883	1.545	0.768	0.717	0.732	-0.082
	SE	0.348	0.763	0.405	0.107	0.042	0.028	0.029	0.063
CZTR	Mean	9.800	5.800	4.106	1.539	0.788	0.746	0.787	-0.057
	SE	0.133	0.467	0.295	0.069	0.065	0.016	0.017	0.087
ROMU	Mean	8.800	6.400	3.950	1.523	0.799	0.717	0.761	-0.119

	SE	0.133	0.600	0.409	0.107	0.057	0.034	0.036	0.066
BGDA	Mean	27.400	8.300	4.884	1.724	0.733	0.764	0.778	0.036
	SE	0.452	0.831	0.560	0.114	0.052	0.032	0.032	0.060
PLSZ	Mean	20.000	7.600	4.221	1.560	0.750	0.708	0.727	-0.055
	SE	0.000	1.147	0.638	0.158	0.057	0.043	0.044	0.045
CNBA	Mean	26.900	13.800	8.619	2.196	0.792	0.827	0.842	0.030
	SE	0.100	1.837	1.568	0.195	0.032	0.038	0.039	0.044
CNHA	Mean	23.900	11.700	7.415	1.919	0.644	0.748	0.764	0.113
	SE	0.100	2.186	1.524	0.267	0.082	0.071	0.072	0.105
CNJI	Mean	24.000	8.200	4.204	1.577	0.708	0.695	0.710	-0.026
	SE	0.000	0.929	0.648	0.166	0.066	0.054	0.055	0.060
CNPO	Mean	22.600	13.000	8.574	2.176	0.700	0.834	0.853	0.155
	SE	0.748	2.017	1.516	0.195	0.057	0.034	0.035	0.076

Analiza comparativa a numarului de alele private in trei populatii europene (Szczecin, Balaton si Raul Kyjovka) precum și a unei populatii din aria nativa Nanchang – China a demonstrat ca populatia din aria nativa a prezentat cel mai mare numar de alele private (38). Populatiile cu un istoric evolutiv mai recent, cum sunt cele europene, care s-au stabilit cu aprox. 30 de ani in urma, prezinta un numar redus de alele private.

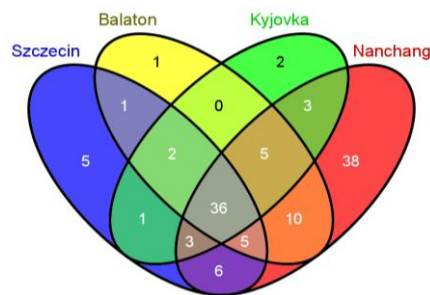


Figure 5. Venn Diagram of the alleles distribution among our populations

Analizand între ele populațiile din Europa constatăm ca numărul de alele private este oarecum uniform distribuit, cu un număr ușor crescut pentru populații precum cea din Polonia și Ungaria, țări in care aceasta scoica a fost semnalata încă de acum 30 de ani. Aceste populații sunt printre primele stabilite în Europa.

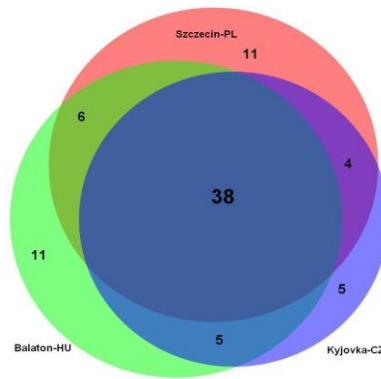


Figure 6. Venn Diagram alele private in unele populatii europene

Analiza structurii genetice a populațiilor de *Anodonta woodiana* cu algoritmul de analiza Bayesian, implementat in programul STRUCTURE 2.3.3. confirmă o fragmentare genetică puternică între populațiile din China, colorate in portocaliu pe ploturile din figura 7 si restul populatiilor europene. Modelul cu cel mai mare suport statistic (100%) a fost cel pentru K = 5. Eliminând populatiile native ale scoicii si ruland programul cu aceiasi parametri, populatia din Italia din lacul Maggiore reprezinta un cluster bine individualizat. Această populație a ridicat unele semne de intrebare asupra identificării corecte a speciei așa cum reiese din lucrarea Garnieri, Popa et al., 2014 dar in urma studiilor de ADN barcoding s-a dovedit ca este o forma atipica morfologic a speciei *Anodonta woodiana*. Probele colectate din Lacul Maggiore, Italia prezinta acelasi haplotip mitocondrial (pentru gene COI) ca si restul populatiilor europene.

K=5

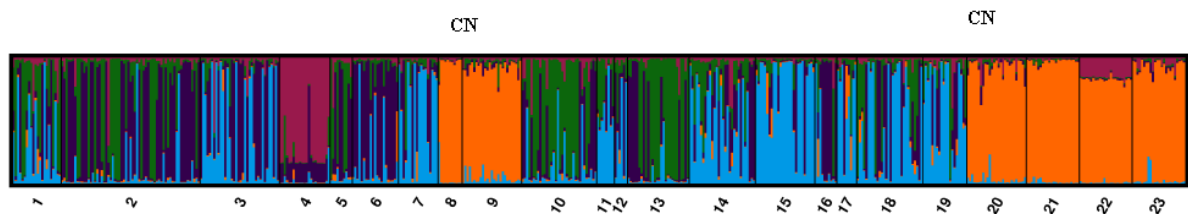


Figure 7. Structura genetica a populatiilor native si invazive de *A. woodiana*

K=10

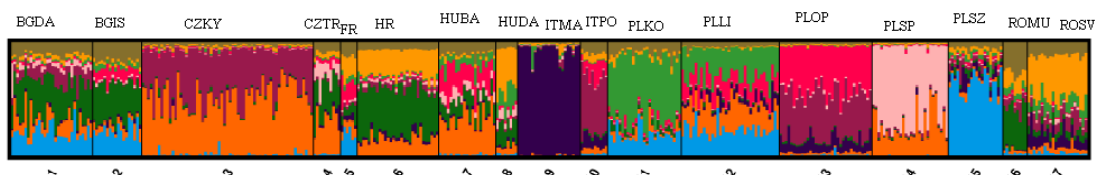


Figure 8. Structura genetica a populatiilor europene ale speciei *A. woodiana*

**Table 3. Diferentierea populatiilor de *A. woodiana* analizate.**

Anodonta woodiana_	SheetI	Pairwise Population Fst Values																					
ROSV	CZKY	PLLI	ITMA	ITPO	HUBA	BGIS	CNSH	CNNA	PLOP	HUDA	FR	PLSP	HR	PLKO	CZTR	ROMU	BGDA	PLSZ	CNBA	CNHA	CNJI	CNPO	
0.000																							ROSV
0.038	0.000																						CZKY
0.029	0.032	0.000																					PLLI
0.091	0.102	0.090	0.000																				ITMA
0.052	0.038	0.059	0.122	0.000																			ITPO
0.033	0.037	0.019	0.078	0.071	0.000																		HUBA
0.029	0.049	0.024	0.096	0.062	0.028	0.000																	BGIS
0.107	0.120	0.108	0.174	0.142	0.114	0.106	0.000																CNSH
0.044	0.061	0.038	0.109	0.085	0.043	0.044	0.075	0.000															CNNA
0.033	0.032	0.025	0.087	0.042	0.034	0.032	0.116	0.055	0.000														PLOP
0.030	0.051	0.045	0.109	0.066	0.039	0.048	0.125	0.057	0.049	0.000													HUDA
0.037	0.052	0.032	0.088	0.065	0.038	0.033	0.111	0.053	0.034	0.052	0.000												FR
0.060	0.034	0.062	0.156	0.087	0.058	0.078	0.147	0.085	0.065	0.069	0.089	0.000											PLSP
0.021	0.037	0.033	0.094	0.064	0.027	0.026	0.102	0.038	0.036	0.030	0.041	0.054	0.000										HR
0.030	0.052	0.020	0.127	0.067	0.039	0.032	0.122	0.055	0.040	0.044	0.040	0.082	0.043	0.000									PLKO
0.036	0.037	0.034	0.110	0.065	0.024	0.037	0.107	0.050	0.044	0.051	0.051	0.053	0.028	0.054	0.000								CZTR
0.038	0.069	0.045	0.136	0.078	0.054	0.035	0.126	0.063	0.050	0.055	0.048	0.100	0.037	0.035	0.049	0.000							ROMU
0.028	0.028	0.020	0.103	0.051	0.027	0.019	0.100	0.045	0.024	0.042	0.031	0.049	0.023	0.029	0.030	0.036	0.000						BGDA
0.048	0.052	0.030	0.089	0.065	0.046	0.036	0.112	0.052	0.036	0.058	0.035	0.091	0.043	0.044	0.059	0.064	0.030	0.000					PLSZ
0.050	0.056	0.039	0.103	0.069	0.047	0.040	0.074	0.022	0.045	0.059	0.046	0.089	0.037	0.058	0.050	0.061	0.040	0.040	0.000				CNBA
0.097	0.109	0.092	0.155	0.124	0.099	0.098	0.049	0.057	0.096	0.107	0.101	0.135	0.086	0.106	0.104	0.117	0.091	0.088	0.054	0.000			CNHA
0.093	0.110	0.085	0.128	0.134	0.090	0.090	0.112	0.051	0.096	0.105	0.100	0.152	0.080	0.115	0.105	0.123	0.101	0.088	0.052	0.082	0.000		CNJI
0.055	0.061	0.042	0.105	0.078	0.049	0.046	0.071	0.023	0.054	0.069	0.054	0.089	0.047	0.062	0.054	0.074	0.047	0.045	0.016	0.050	0.050	0.000	CNPO

Anodonta woodiana_	Sheet1	Pairwise Population Matrix of Dest Values for Total																																						
ROSV	CZKY	PLLI	ITMA	ITPO	HUBA	BGIS	CNSH	CNNA	PLOP	HUDA	FR	PLSP	HR	PLKO	CZTR	ROMU	BGDA	PLSZ	CNBA	CNHA	CNJI	CNPO																		
0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,055	0,118	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	ROSV																	
0,168	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	CZKY																	
0,139	0,144	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,231	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	PLLI																	
0,334	0,324	0,338	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	ITMA																	
0,164	0,105	0,225	0,345	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	ITPO																	
0,154	0,151	0,064	0,274	0,270	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,066	0,001	0,001	0,001	0,085	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	HUBA																	
0,114	0,219	0,096	0,368	0,220	0,101	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,313	0,001	0,001	0,001	0,003	0,011	0,028	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	BGIS																	
0,596	0,594	0,621	0,672	0,594	0,635	0,587	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	CNSH																	
0,318	0,402	0,279	0,541	0,456	0,301	0,309	0,473	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	CNNA																	
0,145	0,131	0,117	0,299	0,112	0,151	0,134	0,615	0,389	0,000	0,001	0,107	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	PLOP																	
0,056	0,176	0,160	0,357	0,189	0,110	0,152	0,581	0,301	0,174	0,000	0,167	0,001	0,089	0,001	0,006	0,011	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	HUDA																	
0,052	0,148	0,032	0,258	0,150	0,059	0,020	0,506	0,248	0,045	0,067	0,000	0,001	0,062	0,036	0,044	0,113	0,366	0,159	0,002	0,001	0,001	0,002	FR																	
0,256	0,137	0,284	0,488	0,316	0,232	0,349	0,690	0,514	0,268	0,226	0,333	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	PLSP																	
0,081	0,169	0,180	0,360	0,244	0,118	0,097	0,572	0,278	0,176	0,053	0,090	0,225	0,000	0,001	0,006	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	HR																	
0,129	0,239	0,074	0,476	0,249	0,186	0,128	0,633	0,379	0,180	0,131	0,084	0,364	0,218	0,000	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	PLKO																	
0,139	0,138	0,140	0,400	0,224	0,042	0,128	0,568	0,325	0,182	0,149	0,111	0,189	0,076	0,257	0,000	0,003	0,005	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	CZTR																	
0,122	0,279	0,183	0,499	0,268	0,222	0,091	0,629	0,383	0,195	0,149	0,076	0,406	0,113	0,109	0,153	0,000	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	ROMU																	
0,122	0,119	0,078	0,396	0,175	0,112	0,041	0,561	0,331	0,102	0,129	0,013	0,208	0,089	0,126	0,089	0,104	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	BGDA																	
0,208	0,210	0,120	0,307	0,209	0,208	0,141	0,560	0,331	0,146	0,185	0,032	0,372	0,195	0,176	0,254	0,249	0,109	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	PLSZ																	
0,338	0,332	0,267	0,477	0,322	0,303	0,258	0,446	0,134	0,288	0,281	0,173	0,500	0,239	0,375	0,287	0,336	0,262	0,220	0,000	0,001	0,001	0,007	CNBA																	
0,575	0,575	0,563	0,649	0,546	0,596	0,587	0,200	0,380	0,547	0,521	0,510	0,675	0,516	0,582	0,616	0,626	0,555	0,463	0,338	0,000	0,001	0,001	CNHA																	
0,490	0,491	0,461	0,495	0,543	0,483	0,495	0,518	0,309	0,486	0,470	0,456	0,660	0,432	0,585	0,548	0,608	0,556	0,431	0,304	0,386	0,000	0,001	CNJI																	
0,386	0,370	0,298	0,496	0,392	0,327	0,302	0,408	0,136	0,358	0,366	0,231	0,515	0,325	0,410	0,321	0,444	0,319	0,264	0,059	0,304	0,279	0,000	CNPO																	

**Distanta genetica** Dest poate lua valori liniare între 0, ceea ce înseamnă identitate completă și 1 ce reprezintă o diferențiere completă a populațiilor analizate. Gradul de diferențiere între populațiile native din China și cele invazive din Europa variază între 0.3 și 0.5, ceea ce este considerat un grad moderat de diferențiere genetică.

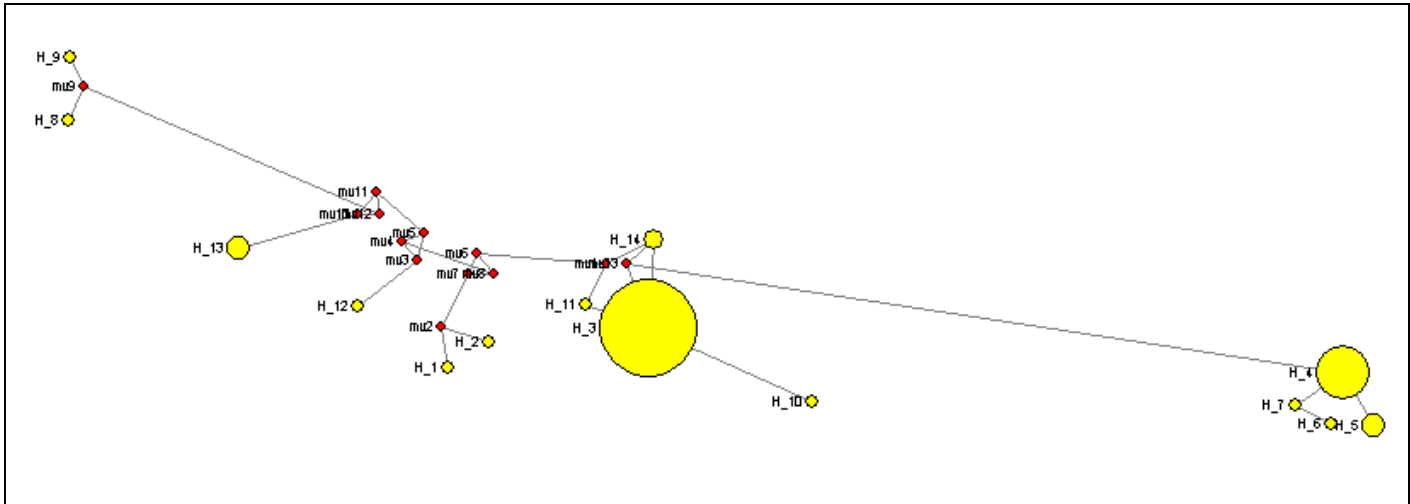


Figure 9. Figure 4. Median joining network pentru haplotipurile COI ale speciei *A. woodiana* în populațiile analizate

Table 4. Haplotipuri COI analizate pentru specia *A. woodiana*

Haplotip	Nr. secvențe	Indicativ	Specie
Hap_1	1	GQ451869.1	<i>Anodonta arcaeformis</i>
Hap_2	1	GQ451870.1	<i>Anodonta arcaeformis</i>
Hap_3	52	022_FR 11_CZ_Tre 122_FR 12_CZ_Tre 13_CZ_Tre 14_CZ_Tre 1AW_IR 2AW_IR 2_CZ_Tre 3_CZ_Tre 8_CZ_Tre 9_CZ_Tre AF468683.1_PO AW11_Vadeni AW12_Vadeni AW_19_PL_PLSZ AW_20_PL_PLSZ AW_26_PL_PLSZ AW_3_PL_PLSZ AW_9_PL_PLSZ AW_C2_18_CZKY AW_C2_19_CZKY AW_C2_1_CZKY AW_C2_26_CZKY AW_C2_27_CZKY AW_C2_2_CZKY AW_C2_8_CZKY EF440349.1_PO_Ftype JQ253893.1_Uk. JQ253894.1_Ukraine KF731775.1_Maggiore KF731776.1_Po_Site KF731777.1_Po_Site KJ125078.1_PO KJ125079.1_PO KJ434482.1_CH KJ434483.1_CH KJ434484.1_CH KJ434485.1_CH M1_ITMA M2_ITMA M3_ITMA M4_ITMA M5_ITMA P1_ITPO P2_ITPO P3_ITPO P4_ITPO P5_ITPO SD_21_ROSV SD_22_ROSV SD_9_ROSV	<i>Anodonta woodiana</i>
Hap_4	17	7N10_CHNA 7N1_CHNA 7N3_CHNA 7N4_CHNA 7N5_CHNA 7N6_CHNA 7N8_CHNA 7N9_CHNA 8N1_CHNA 8N2_CHNA 8N3_CHNA 8N5_CHNA 8N6_CHNA 8N7_CHNA 8N8_CHNA 8N9_CHNA B3C_CNBA	<i>Anodonta woodiana</i>
Hap_5	3	7N2_CHNA 7N7_CHNA 8N4_CHNA	<i>Anodonta woodiana</i>
Hap_6	1	B1C_CNBA	<i>Anodonta woodiana</i>

Hap_7	1	B2C_CNBA	Anodonta woodiana
Hap_8	1	GQ451867.1_South_Kor	Anodonta woodiana
Hap_9	1	GQ451868.1_South_Kor	Anodonta woodiana
Hap_10	1	JQ435822.1_Ro	Anodonta woodiana
Hap_11	1	KJ434486.1_CH	Anodonta woodiana
Hap_12	1	KJ434487.1_CH	Anodonta woodiana
Hap_13	3	KJ434488.1_CH KJ434489.1_CH KJ434490.1_CH	Anodonta woodiana
Hap_14	2	KM272949.1_CH_CMit NC_024943.1_CH_CMit	Anodonta woodiana

Analiza Median Joining efectuată ne indică un arbore din care putem desprinde concluzia că populațiile din China, colectate în cadrul prezentului studiu și anume haplotipurile H4, H7, H6, H5, reprezintă o ramură separată a rețelei. Haplotipurile H1 și H2 aparțin unei alte specii și anume *Anodonta arcaeformis*, specie foarte asemănătoare din punct de vedere morfologic cu specia *Anodonta woodiana*.

De asemenea, haplotipurile europene H14, H11, H3, H10 sunt mult mai apropiate de H13 și H12 dar și de H1 și H2 aparținând speciei *Anodonta arcaeformis*. La o distanță echivalentă cu probele din China analizate în cadrul acestui proiect se află și două haplotipuri provenind din Coreea de Sud H8 și H9.

În urma acestei analize putem desprinde concluzia că procesul de colonizare al Europei cu specia *A. woodiana* s-a desfășurat utilizând o populație sursă cu altă origine față de cele analizate de noi în aria nativă. O posibilă proveniență pentru populațiile sursă o reprezintă bazinul fluviului Amur, o populație din care nu s-au recoltat probe în cadrul acestui proiect.

## REFERENCES:

- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48
- 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
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Forster P, Torroni A, Renfrew C, Röhl A (2001) Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol Evol* 18:1864-1881.
- Guarneri Irene, Popa Oana Paula, Gola Laura, Kamburska Lyudmila, Lauceri Rosaria, Lopes-Lima Manuel, Popa Luis Ovidiu, Riccardi Nicoletta - A morphometric and genetic comparison of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) populations: does shape really matter? - *Aquatic Invasions* (I.F.: 1.14).06/2014; 9(2):183 - 194.
- 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
- Polzin T, Daneschmand S V (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31:12-20
- Popa Oana P., Veronika Bartakova, Josef Bryja, Martin Reichard, Luis O. Popa - Characterization of nine microsatellite markers and development of multiplex PCRs for the Chinese huge mussel *Anodonta* (*Sinanodonta*) *woodiana* Lea, 1834 (Mollusca, Bivalvia) - *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 60, Pages: 234-237, June 2015
- 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



Reichard Martin, Karel Douda, Mirosław Przybylski, Oana P. Popa, Eva Karbanova, Klara Matasova, Katerina Rylkova, Matej Polacik, Radim Blazek, Carl Smith - Population-specific responses to an invasive species - Proceedings of the Royal Society B, 2015.

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

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

Director proiect,

---