

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
CATEDRA DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**RELEVANȚA UNOR MARKERI MOLECULARI MITOCONDRIALI ÎN
CARACTERIZAREA STRUCTURII GENETICE A POPULAȚIILOR DE
Cerastoderma glaucum, POIRET 1789 ÎN SECTORUL ROMÂNESC AL
MĂRII NEGRE**

- Rezumat -

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. OCTAVIAN POPESCU

DOCTORAND
DRAGOMIR-COSMIN DAVID

CLUJ-NAPOCA

2011

Cuprins

I Introducere	3
1. Marea Neagră – descriere generală	3
2. Considerații generale asupra speciei <i>Cerastoderma glaucum</i>	4
3. <i>Cerastoderma glaucum</i> și <i>Cerastoderma edule</i> – diferențe	5
II Material și metode	7
4. Prelevarea probelor	7
5. Pregătirea și analiza probelor	8
III Rezultate	9
6. Analiza datelor subunității I a citocrom-oxidazei (COX)	9
7. Analiza datelor genei parțiale ADNr 16S	17
8. Analiza combinată a datelor subunității I a citocrom-oxidazei și a genei parțiale 16S ADNr	24
IV Discuții	29
9. Discuții asupra markerilor mitocondriali	29
10. În ce fel pot influența fenomenele de upwelling și downwelling distribuția speciei în Marea Neagră?	30
11. Prezența portului Constanța nu pare să influențeze populațiile de <i>C. glaucum</i>	31
12. Aspecte privind morfologia cochiliei și haplotipurile	31
13. Legătura dintre <i>C. glaucum</i> și familia Limnardiidae	32
14. Influența rezervației Vama Veche asupra speciei <i>C. glaucum</i>	33
V Concluzii	34
VI Bibliografie selectivă	36

Cuvinte cheie :

- litoralul românesc
- genetica populațiilor
- ADN mitocondrial
- reacția în lanț a polimerazelor
- bivalve
- *Cerastoderma glaucum*

I. INTRODUCERE

Principalul scop al acestui studiu l-a constituit investigarea prin metode moleculare a diversității și structurii genetice a speciei de bivalve *Cerastoderma glaucum*, Poiret 1789 cunoscută anterior din literatura de specialitate sub denumirea de *Cerastoderma (Cardium) edule*, Linnaeus 1758. Principalele obiective ale acestui studiu sunt:

- Consolidarea identității și nomenclaturii speciei *Cerastoderma glaucum*, cunoscută anterior ca și *Cerastoderma (Cardium) edule*.
- Investigarea structurii genetice la scară mică a populațiilor de *Cerastoderma glaucum* de la litoralul românesc al Mării Negre
- Dacă portul Constanța Sud-Agigea influențează structura genetică a acestor populații sau nu!
- Care ar putea fi factorii ce influențează structura genetică a speciei?

1. Marea Neagră – descriere generală

Marea Neagră (fig.1) reprezintă una dintre cele mai izolate mări interioare din lume. Este un exemplu tipic de mare Eurasiatică, semi-închisă și intercontinentală. Mările semi-închise pot avea următoare definiție: “o mare înconjurată de pământ cu o intrare relative îngustă, care este de cel puțin de 4 ori mai mică în dimensiune decât axa cea mai lungă din cadrul bazinului închis” (Healy și Harada, 1991). Sectorul românesc al Mării Negre este localizat în partea de vest a bazinului Mării Negre, la sud de Delta Dunării și are o suprafață de peste 35 000 km².



Fig. 1 Hartă generală a regiunii Mării Negre

2. Considerații generale asupra speciei *Cerastoderma glaucum*

C. glaucum (Poiret, 1789) este o bivalvă comună (Bivalvia: Cardiidae) care populează infralitoralul românesc al Mării Negre (Grossu, 1962). Arealul de distribuție cuprinde Marea Mediterană, Marea Nordului, Marea Baltică (Russell și Petersen 1973; Freire, 2010), Marea Caspică, Marea Azov (Brock, 1979) și există unele dovezi că această specie a ajuns și în Marea Roșie (Brock 1987). Această specie este abundentă în Golful Gabes, coasta nordică a localității Sfax în Tunisia (Derbali et al., 2008; 2009) și câteva lagune costiere precum cele din sudul și sud-estul Marii Britanii (McArthur, 1998), Portugalia (Machado și Costa 1994), Grecia (Gontikaki, 2003) și Italia (Ivell, 1979; Trotta și Cordisco, 1998), (fig.2). *C. glaucum* populează fundurile mâlos-nisipoase sau cu nisip fin (Sara, 2007; Derbali et al., 2009). Este o specie eurihalină și euritermă, de aceea nici chiar temperaturile sau salinitățile extreme nu constituie o barieră împotriva dispersării acesteia. *C. glaucum* tolerează salinități cuprinse între 5 PSU to 84 PSU (Boyden and Russel, 1972; Labourg și Lasserre 1980) și temperature de la 0°C până la peste 45°C (Russell și Petersen 1973; Wilson și Elkaim, 1997).

În ciuda euritopiei, populațiile de *C. glaucum* pot fi întâlnite doar în anumite areale costale specifice, în principal lagune, estuare, golfuri și lacuri. Populează sedimentele nisipoase și nu depășește izobata de 30-35 m (Krzyminska, 1993). Deși Russell (1972) a presupus că intoleranța expunerii la aer provocată de maree este principalul factor limitativ al acestei specii, *C. glaucum*, poate fi des întâlnită în zonele mlăștinoase formate prin depunerea mărului sub acțiunea mareelor sau râurilor. La această specie este foarte probabil că textura sedimentului este mai importantă decât ‘expunerea la aer’ din moment ce nu este niciodată întâlnită în zone cu sediment ‘grosier’, de exemplu nisipul bine sortat care rezultă din expunerea la curenți și valuri. (Brock, 1979).



Fig.2 Distribuția europeană a speciei *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789)

3. *Cerastoderma glaucum* și *Cerastoderma edule* – diferențe

Cerastoderma glaucum este o rudă foarte apropiată cu specia cunoscută sub denumirea de *Cerastoderma edule*. Aceste două specii au fost descrise de-a lungul timpului ca fiind varietăți ale aceleiași specii și anume *C. edule* (Rygg, 1970).

Din regiunea Ponto-Caspică și a Mării Negre, există descrise șase varietăți ale speciei *C. edule* (*C. edule major*, *C. edule lamarcki*, *C. edule batesoni*, *C. edule maeotica*, *C. edule nuciformis*, *C. edule quadrata*) (Grossu, 1962). Dintre acestea, varietățile *batesoni*, *lamarcki* și *quadrata* au fost reconsiderate ca fiind ale speciei *C. glaucum*. Prin vizualizarea desenelor și a substratului de pe care au fost colectate, de asemenea, varietățile *maeotica*, *nuciformis* și *major* sunt considerate a aparține aceleiași specii, *C. glaucum* (Rygg, 1970).

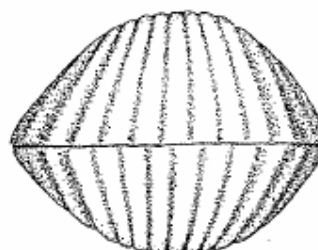
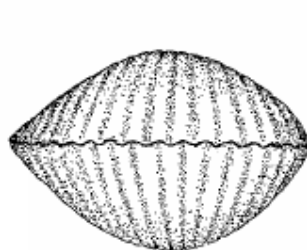
C. glaucum și *C. edule* diferă din punct de vedere ecologic (Hummel și colab. 1994; Machado și Costa 1994). Totuși, în unele zone care prezintă condiții de mediu mai aparte, se pot întâlni populații simpatrice precum cele din Portugalia (Machado și Costa 1994), Finlanda (Rygg 1970), Norvegia, Suedia, Danemarca, Olanda, Anglia și Franța (Brock 1987).

Machado și Costa (1994) au identificat un set de caractere morfologice prin care se pot distinge cele două specii (Tab 1; Fig. 3). În acest scop au utilizat atât criterii morfologice cât și criterii enzimatic (de ex. malat dehidrogenaza hepatopancreatică). Un alt caracter morfologic care poate fi luat în considerare pentru diferențierea dintre cele două specii este joncțiunea valvei ventrale (crenulată la *C. edule* și de obicei dreaptă la *C. glaucum*). Proeminența ligamentului nu poate fi utilizată pentru distingerea indivizilor de pe coasta Portugheză deoarece s-ar părea că nu este validă pentru mai mult de 50% din indivizii întâlniți în unele probe.

Tabelul 1. Diferențele morfologice dintre cele două specii de *Cerastoderma* identificate de Machado și Costa (1994).

Caracter	<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Cerastoderma glaucum</i>
Profilul valvei	neted	ascuțit
Joncțiunea valvei ventrale	crenulat	de obicei drept
Tipul de solzi calcaroși	tipul laminar, inserați perpendicular pe valve	de obicei absenți sau groși îndoiți către regiunea umbonelui
Culoarea cochiliei	variabilă, diferită de culorile tipice pentru <i>C. glaucum</i>	de obicei galben-albicioasă sau verzuie
Joncțiunea valvei posterioare	de obicei crenulat	de obicei drept sau puțin crenulat
Vizibilitatea ligamentului	în general vizibil sau la limita vizibilității	de obicei invizibil
Cantitatea de periostracum	variabil	de obicei în cantitate mare
Forma cochiliei	variabil	variabil
Punctul maro intern	de obicei prezent	de obicei prezent

a.



b.

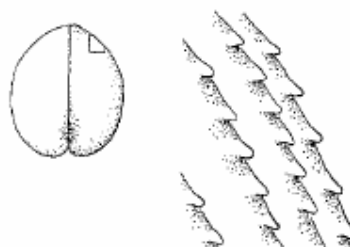
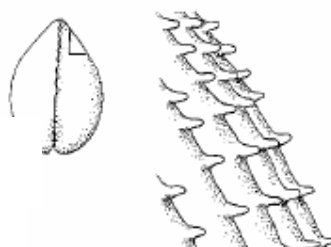


Fig.3 Diferențe între *C. edule* (stânga) și *C. glaucum* (dreapta) (din Machado și Costa, 1994) a. Vedere ventrală asupra profilului caracteristic al valvei și joncțiunea valvei ventrale la ambele specii; b. reprezentare schematică a formei caracteristice și tipului de inserție valvară a solzilor calcaroși la ambele specii (vedere frontală). Picton, B.E. & Morrow, C.C., 2010. [In] *Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland*

II. MATERIAL ȘI METODE

4. Prelevarea probelor

Probelele au fost prelevate manual de la adâncimi de 1-10 m cu ajutorul scafandrului autonom din șapte locații de-a lungul sectorului românesc al Mării Negre (Vadu – V, Năvodari – N, Mamaia – M, Constanța – Ct, Agigea – Ag, Eforie Nord – E, Vama Veche – VV), în anul 2009 (Fig. 4).

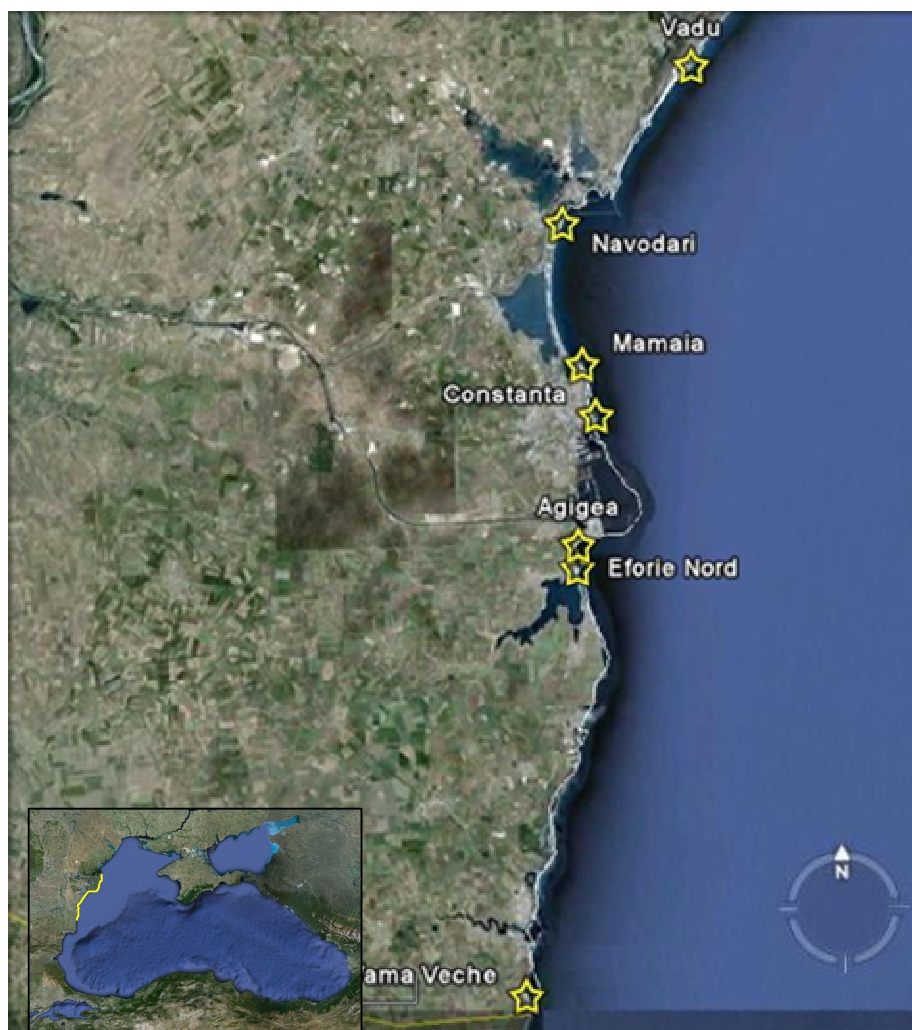


Fig. 4 Stațiunile de colectare de la litoralul românesc al Mării Negre pentru *C. glaucum* (2011 Google – Imagery 2011 TerraMetrics, Map Data 2011 Basarsoft, Geocentre Consulting, Tele Atlas, Transnavicom, Google)

5. Prelucrarea și analiza probelor

Analizele moleculare ale moluștelor bivalve prelevate au fost efectuate conform următoarei proceduri (Fig.5):

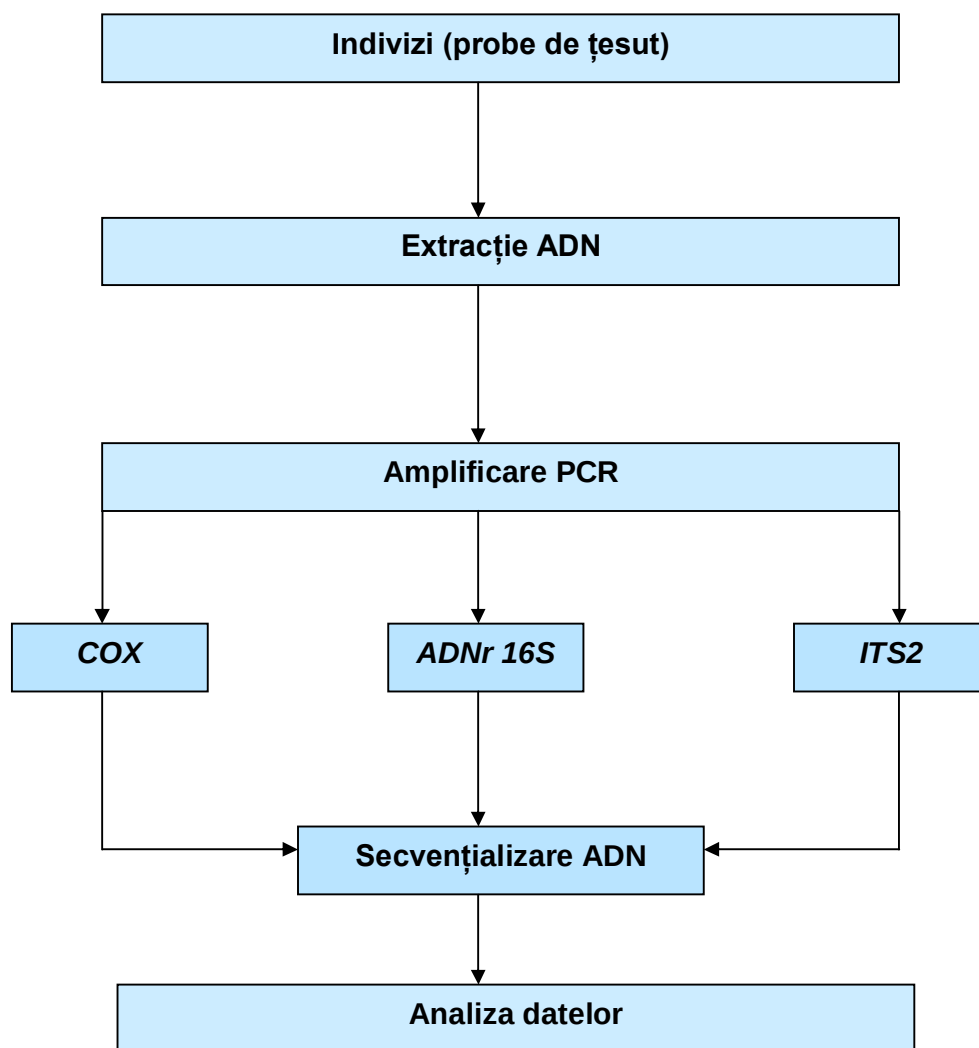


Fig. 5 Principalii pași implicați în analiza probelor de *Cerastoderma glaucum*

În scopul prelucrării datelor au fost utilizate următoarele software-uri: BioEdit, Sequencher 4.9 Demo Version, MEGA V.4, Arlequin V.3, Network 4600.

III. REZULTATE

6. Analiza datelor subunității I a citocrom oxidazei (COX)

Haplotipuri identificate

Prin analiza subunității I a citocrom oxidazei au fost identificate un număr de 8 haplotipuri de la litoralul românesc al Mării Negre (Tab.2). Haplotipul cel mai des întâlnit, prezent în toate stațiunile de prelevare a probelor a fost haplotipul 4, urmat de haplotipul 1 și 2. Doi indivizi, unul de la Năvodari și al doilea de la Vama Veche au prezentat haplotipuri aparte care nu sunt întâlnite în restul stațiunilor n7 și respectiv n8.

Variații între indivizi au fost observate la următorii loci: 139 (C→A), 190 (A→G), 241 (C→T), 244 (G→A), 271 (G→A), 256 (T→G), 364 (T→C), 404 (C→T) și 493 (A→C). La loci 139 și 493 are loc o transverție din C în A și din A în C. Alte mutații apar ca fiind “tranziții”, o condiție mai comună decât transverțiile.

Tabelul 2 Haplotipurile COX ale populațiilor de *C. glaucum*

	Stațiuni (număr de indivizi)					
		Navodari (6)	Mamaia (13)	Agigea (7)	Eforie Nord (2)	Vama Veche (4)
Haplotipuri	1	2	4	2	1	-
	2	1	1	1	-	2
	3	1	-	1	-	-
	4	1	8	1	1	1
	5	-	-	1	-	-
	6	-	-	1	-	-
	7	1	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	1

Indici moleculari de bază

Tabelul 4 arată indicii moleculari de bază. Cel mai mare număr de haplotipuri (6) per staține de colectare a fost obținut de la Agigea (7 indivizi), iar cel mai mic număr (2) de la Mamaia (13 indivizi). Diversitatea haplotipurilor (H_d) a fost mare în cazul indivizilor de la Eforie Nord, chiar dacă aceste date nu pot fi considerate foarte concludente datorită numărului mic de

indivizi analizați (2) din această stațiune. În cazul Agigei (0.952) și al Vamei Vechi (0.833) diversitatea este mai ridicată comparativ cu Mamaia (0.564).

La Vama Veche pot fi observate 3 haplotipuri din cei 4 indivizi analizați. Această stațiune de colectare este foarte diferită de celelalte în privința numărului mediu de diferențe între perechile de nucleotide (2.333) și prin urmare se constată diferențe semnificative între perechile nucleotidice ale indivizilor colectați. Aceasta este confirmată și de diversitatea nucleotidică, care este mai ridicată în Vama Veche (0.004).

Table 3 Indicii moleculari de bază pentru subunitatea I a citocrom oxidazei (COX)

Stațiune	Localizare	N	N _H	S	H _d	K	π
Navodari	44°19'42.45"N 28°40'14.87"E	6	5	5	0.933	1.870	0.004
Mamaia	44°12'40.29"N 28°39'11.15E	13	3	3	0.564	0.769	0.001
Agigea	44°4'57.91"N 28°38'30.47"E	7	6	6	0.952	1.905	0.004
Eforie Nord	44°3'14.96"N 28°38'37.44"E	2	2	1	1.000	1.000	0.001
Vama Veche	43°46'9.30"N 28°35'5.40"E	4	3	4	0.833	2.333	0.004

N: numărul de indivizi; **N_H:** numărul de haplotipuri; **S:** numărul de site-uri polimorfice;
H_d: diversitatea haplotipurilor; **K:** numărul mediu de diferențe între perechile de nucleotide; **π:**
diversitatea nucleotidică

Rețeaua haplotipurilor

Distribuția haplotipurilor sugerează o structură în formă de stea, tipică populațiilor aflate în expansiune (Fig. 6). Acest tip de rețea a haplotipurilor poate fi interpretată ca o expresie a efectului fondator. Majoritatea haplotipurilor diferă de haplotipul central (75), printr-o singură mutație, în timp ce doar câteva haplotipuri diferă prin 2 mutații. Haplotipul 88 este prezent la probele provenite din toate stațiunile cu excepția celor din Vama Veche și este al doilea haplotip ca importanță în privința numărului de indivizi per stațiune.

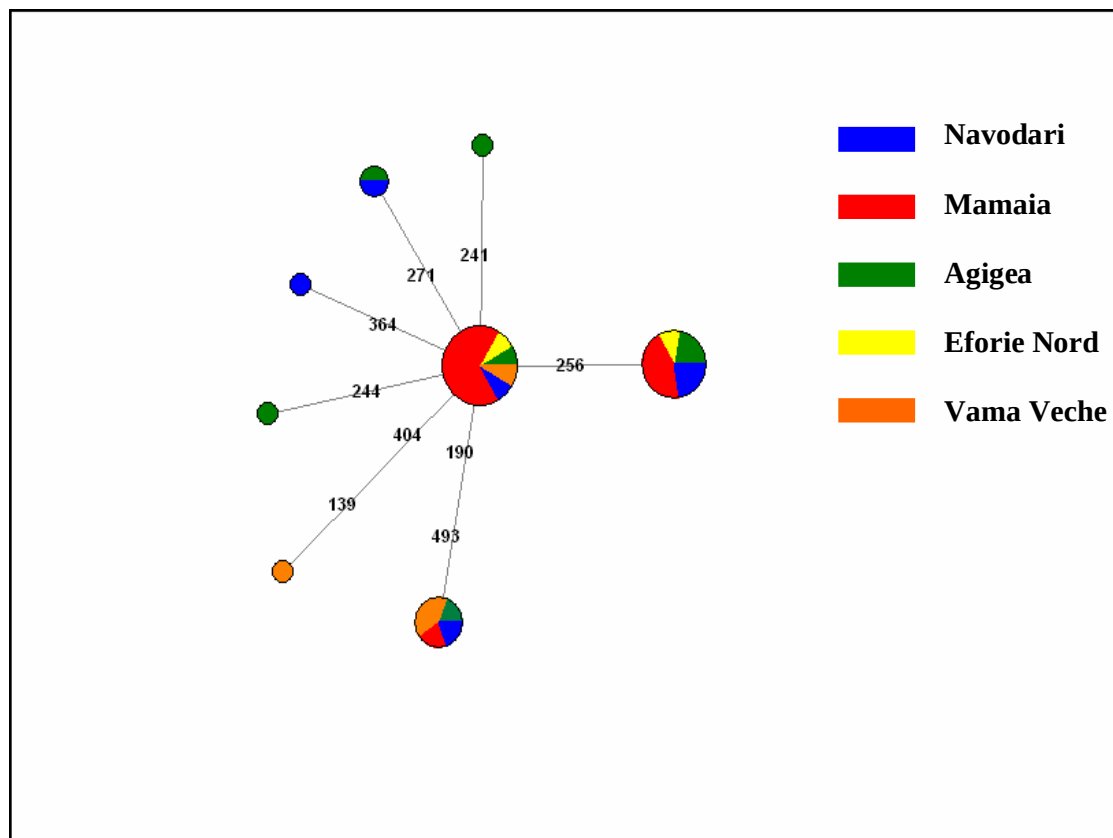


Fig. 6 Rețeaua haplotipurilor bazate pe subunitatea I a citocrom oxidazei (COX). Mărimea cercurilor este proporțională cu frecvența fiecărui haplotip. Numărul de pe ramuri indică poziția mutațiilor.

Testele de neutralitate

Aplicarea testelor de neutralitate Tajima D și Fu's F nu a fost validă în cazul probelor de la Eforie Nord datorită mărimii reduse a acestora (2 individuals). În cazul Năvodari și Agigea, testul este semnificativ indicând o expansiune a populațiilor (p value < 0.05) contrar celei din Vama Veche. Acest rezultat poate fi relaționat cu faptul că populația de *C. glaucum* de la Vama Veche prin prezența celor 2 mutații este mai veche, fiind probabil populația fondatoare.

Tabelul 4 Testele de neutralitate Tajima D și Fu's F pentru COX

Stațiune	Localizare	Tajima D	Fu's F
Navodari	44°19'N 28°36'E	- 0.826 (p: 0.258)	- 2.263 (p: 0.023)
Mamaia	44°14'N 28°38'E	- 0.646 (p: 0.285)	0.250 (p: 0.491)
Agigea	44°5'N 28°36'E	-1.129 (p: 0.153)	- 3.408 (p: 0.005)
Eforie Nord	44°2'N 28°39'E	-	-
Vama Veche	43°45'N 28°36'E	0.650 (p: 0.253)	0.360 (p: 0.471)

Analiza distanței genetice

Am efectuat “pairwise Fst” pentru testarea diferențelor genetice între populații. Semnificația diferențelor de perechi a fost testată utilizând 5040 permutații. Valoare indicelui F_{ST} pentru secvențele COX au indicat că singura diferență semnificativă se întâlnește între populațiile de la Mamaia și Vama Veche ($p < 0.05$).

Dendrograma NJ construită pe baza matricei distanțelor moleculare a secvențelor COX (Fig 7), a grupat populațiile din stațiuni conform similarităților și distribuției geografice. Populațiile nordice (AG, M, N) formează o grupare separată de cele sudice (E, VV). Cea mai sudică populație aflată la Vama Veche este de asemenea distantă de cea de la Eforie Nord.

Tabelul 5 Valorile F_{ST} dintre populații. În roșu valorile cu semnificație statistică $p < 0.05$, în albastru valorile lui p.

Populations	Navodari	Mamaia	Agigea	Eforie Nord	Vama Veche
Navodari		0.757	0.983	0.999	0.279
Mamaia	0.059		0.746	0.999	0.018
Agigea	0.132	0.052		0.999	0.274
Eforie Nord	0.339	0.293	0.313		0.393
Vama Veche	0.042	0.27	0.056	0.058	

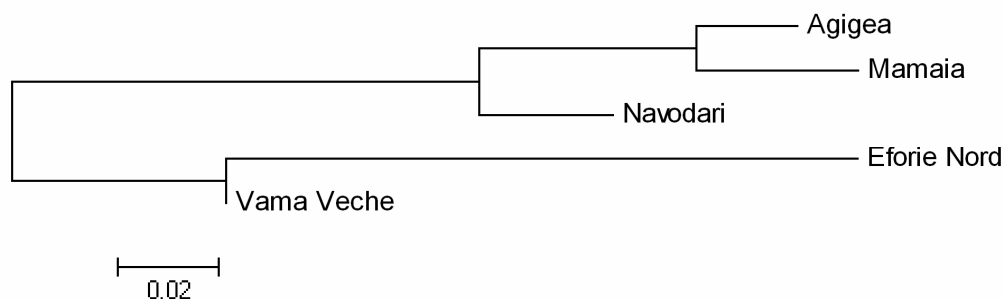


Fig. 7 Dendrograma NJ bazată pe matricea distanțelor moleculare dintre secvențele COX (Kimura 2-P)

Relația dintre distanța genetică și distanța geografică

Testul Mantel efectuat are ca și obiectiv examinarea proceselor microevoluționare precum izolarea prin distanță (IBD).

Tabelul 6 Distanțele genetice bazate pe F_{ST} ($F_{ST}/(1-F_{ST})$,albastru) și distanțele geografice (km, îngroșat) între cinci din populațiile studiate

Populations	Agigea	Eforie Nord	Mamaia	Navodari	Vama Veche
Agigea		0.4556	0.0537	0.1521	0.0593
Eforie Nord	4.7		0.4144	0.5129	0.0616
Mamaia	17.5	22.2		0.0627	0.3699
Navodari	30.1	34.8	12.6		0.0438
Vama Veche	44.3	39.6	61.8	74.7	

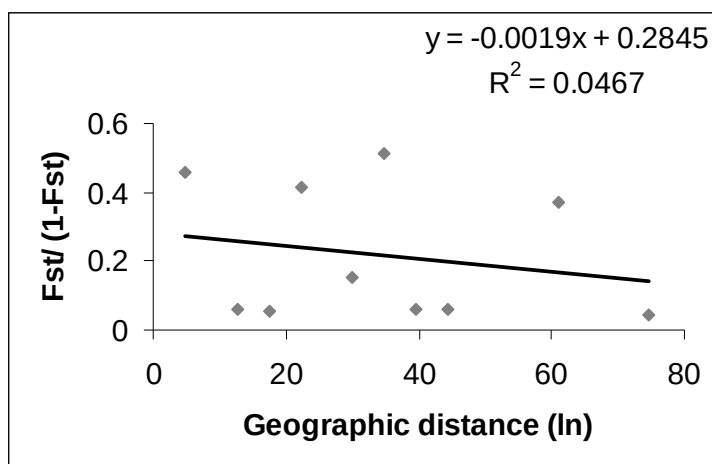


Fig. 8 Rezultatul testului Mantel pentru COX între distanțele geografice ale stațiilor de colectare și distanțele genetice ale haplotipurilor bazate pe F_{ST}

Analiza varianței moleculare (AMOVA)

Pentru înțelegerea distribuției variației genetice între populațiile de *C. glaucum* au fost formulate trei ipoteze cu ajutorul testului AMOVA (Tab.7). În prima ipoteză, în care populația de la Vama Veche este comparată cu populațiile din alte stațiuni, cea mai mare proporție de varianță moleculară (26.07) este considerată semnificativă ($p < 0.001$). Celelalte ipoteze (Mamaia Vs celelalte) și (Vama Veche, Eforie Nord, Agigea Vs Mamaia, Navodari, Vadu) nu sunt semnificative.

Tabelul 7 Analiza AMOVA a secvențelor subunității I a citocrom oxidazei

	Ipoteza 1	Ipoteza 2	Ipoteza 3
Procentul de varianță	Grup1: Vama Veche Grup2: Agigea, Eforie Nord, Mamaia, Navodari, Vadu	Grup1: Mamaia Grup2: Agigea, Eforie Nord, Vama Veche, Navodari, Vadu	Grup1: Vama Veche, Eforie Nord, Agigea Grup2: Mamaia, Navodari, Vadu
Între grupuri	26.07 ($p=0.000$)	-2.35 ($p=0.201$)	3.84 ($p=0.094$)
Între populațiile din grupuri	-8.73 ($p=0.413$)	0.38 ($p=0.256$)	-2.73 ($p=0.760$)
În populații	82.66 ($p=0.506$)	101.97 ($p=0.502$)	98.89 ($p=0.521$)

Analize filogenetice

Metoda bayesiană

Arborele filogenetic obținut cu ajutorul software-ului Mr. Bayes a fost doar parțial rezolvat datorită similarităților apropiate ale secvențelor.

Singurele diferențe semnificative între secvențe sunt prezente la haplotipurile 78 – AG4, M1, N12, VV7, VV10; 79 – AG2, N13; 88 – AG1, AG8, E3, M12, M14, M21, M2, N5, N11.

Prin compararea speciei *C. edule* ca și “outgroup”, cu indivizii de *C. glaucum*, este evidentă distanțarea dintre cele două specii.



Fig. 9 Inferența Bayesiană a secvențelor COX pentru *Cerastoderma glaucum* (arbore filogenetic) cu *C. edule* ca și “outgroup” (model specificat: GTR; numărul de generații: 50 000 000)

Metoda Neighbor Joining

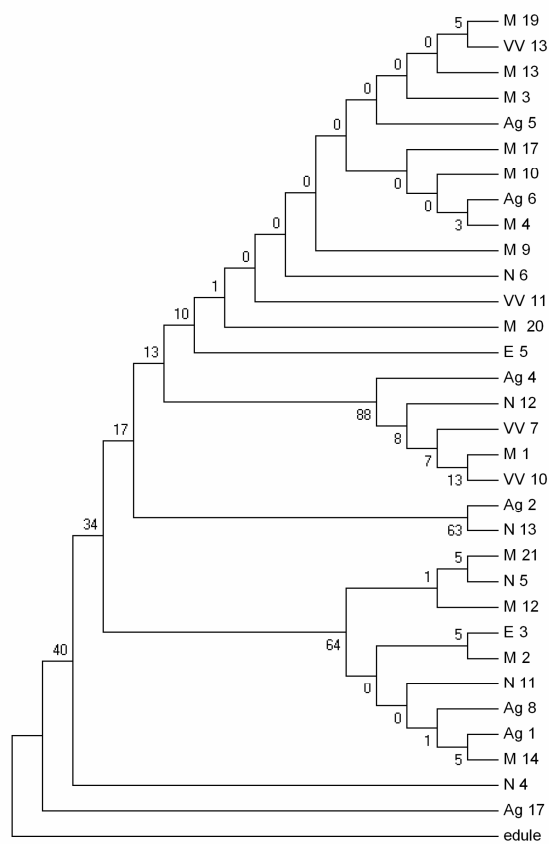


Fig. 10 Dendrograma NJ bazată pe secvențele COX, înrădăcinată cu *C. edule*

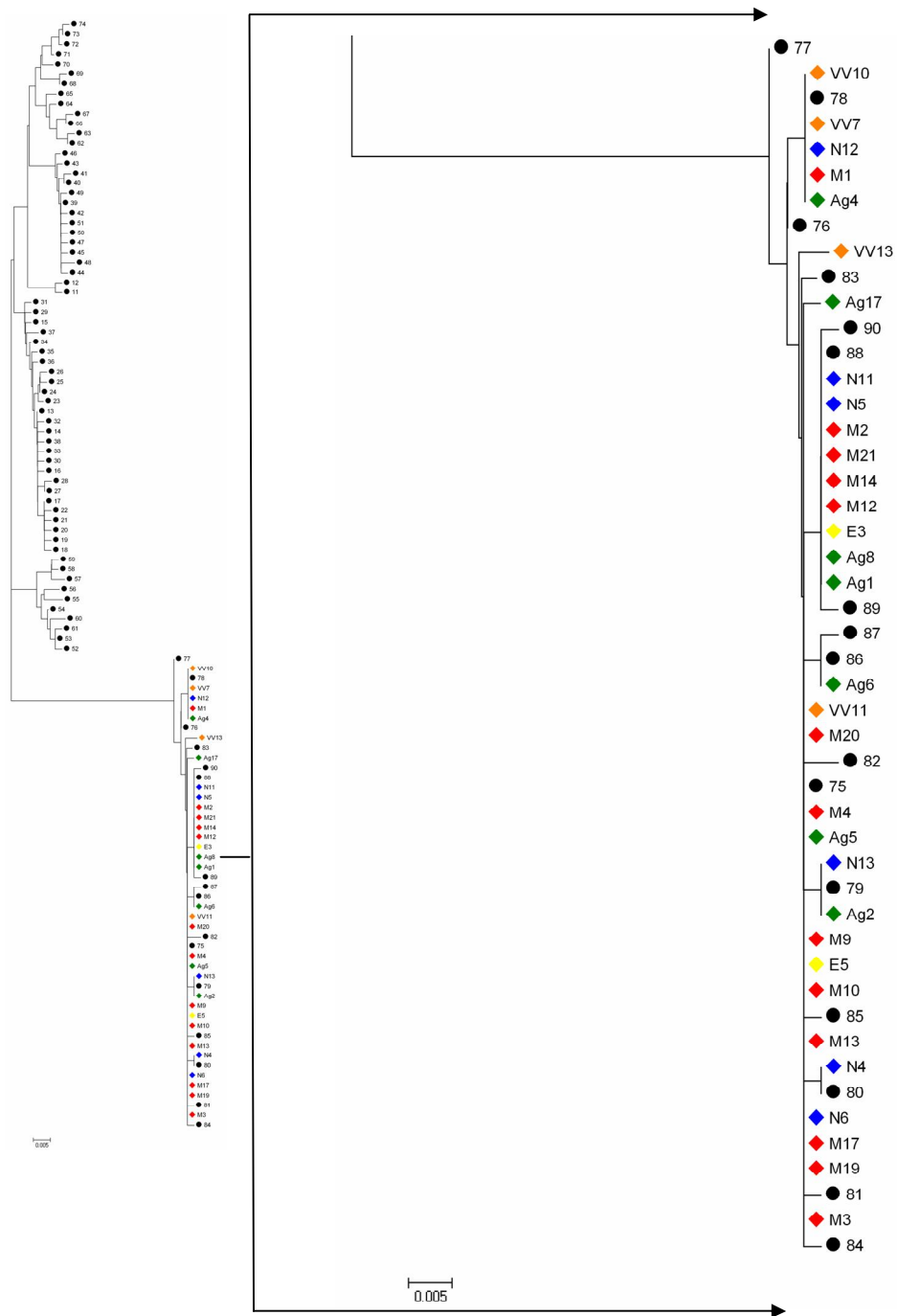


Fig. 11 Dendrograma NJ bazată pe secvențele COX: date originale (în color) combinate cu datele din literatură (cerc negru: Tarnowska et al. 2010).

7. Analiza datelor pentru gena parțială a ADNr 16S

Haplotipuri identificate

Prin analiza marker-ului mitocondrial ADNr 16S au fost identificate un număr de 5 haplotipuri prezente la litoralul românesc al Mării Negre. Cele mai comune haplotipuri au fost 1 și 2. Variații între indivizi au fost observate la loci: 111 (G→A), 191 (C→T), 201 (T→C), 203 (T→C).

Toate aceste mutații reprezintă tranziții și sunt responsabile pentru haplotipurile întâlnite de-a lungul litoralului românesc.

Tabelul 8. Haplotipurile bazate pe ADNr 16S ale populațiilor de *C. glaucum*

	Stațiuni (număr de indivizi)						
		Vadu (2)	Navodari (5)	Mamaia (12)	Agigea (8)	Eforie Nord (2)	Vama Veche (8)
Haplotipuri	1	2	1	2	2	1	-
	2	-	4	8	5	1	5
	3	-	-	1	1	-	2
	4	-	-	1	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	1

Indici moleculari de bază

Cel mai mare număr de haplotipuri relevat prin analiza secvențelor cu o lungime de 404 perechi de baze a genei parțiale pentru ADNr 16S, comparat cu numărul indivizilor a fost obținut de la Agigea și Vama Veche (3 haplotipuri de la 8 indivizi). În contrast cel mai scăzut număr de haplotipuri se întâlnește la Mamaia (4 haplotipuri de la 12 indivizi).

Dupa cum se observă, în cazul stațiunilor Vadu și Eforie Nord, există doar doi indivizi/stațiune și acest fapt se dovedește a nu fi adecvat pentru obținerea parametrilor genetici. Valorile acestor două stațiuni nu sunt suficiente pentru a formula unele concluzii cu privire la populațiile de aici.

Numărul de site-uri polimorfice și numărul mediu de diferențe între perechile de nucleotide sunt argumente care certifică diversitatea populației de la Vama Veche.

Table 9. Indici moleculari de bază pentru gena parțială *ADNr 16S*

Stațiune	Localizare	N	N _H	S	H _d	K	π
Vadu	44°25'42.63"N 28°46'2.97"E	2	1	0	0.000	0.000	0.0000
Navodari	44°19'42.45"N 28°40'14.87"E	5	2	1	0.400	0.400	0.0009
Mamaia	44°12'40.29"N 28°39'11.15"E	12	4	3	0.561	0.742	0.0018
Agigea	44°4'57.91"N 28°38'30.47"E	8	3	2	0.607	0.786	0.0019
Eforie Nord	44°3'14.96"N 28°38'37.44"E	2	2	1	1.000	1.000	0.0024
Vama Veche	43°46'9.30"N 28°35'5.40"E	8	3	3	0.607	1.107	0.0027

N: numărul de indivizi; N_H: numărul de haplotipuri; S: numărul de site-uri polimorfice;
H_d: diversitatea haplotipurilor; K: numărul mediu de diferențe între perechile de nucleotide; π:
diversitatea nucleotidică

Rețeaua haplotipurilor

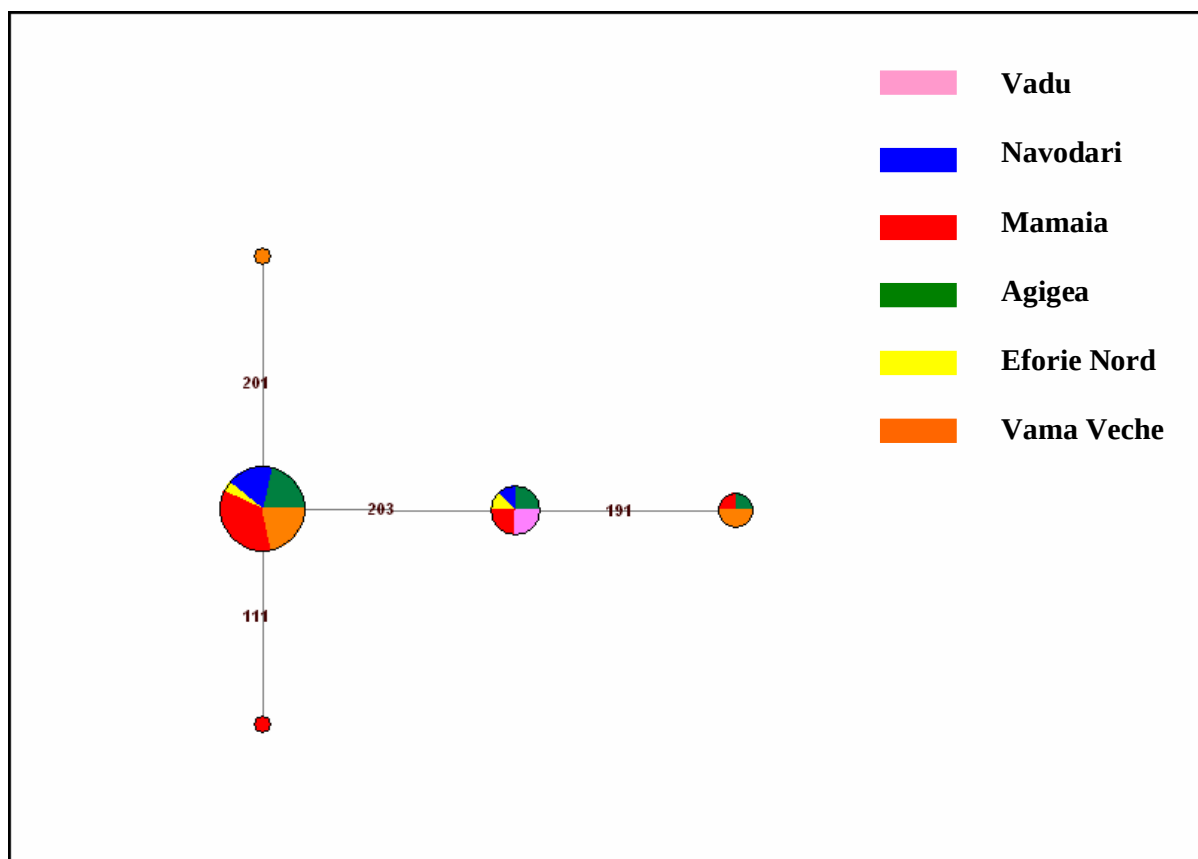


Fig. 12 Rețeaua haplotipurilor bazate pe gena parțială a *ADNr 16S*. Mărimea cercurilor este proporțională cu frecvența fiecărui haplotip. Numărul de pe ramuri indică poziția mutațiilor.

Testele de neutralitate

Testele de neutralitate în cazul genei parțiale *ADNr 16S* s-au dovedit a fi statistic nesemnificative. După cum am arătat anterior, populațiilor de la Vadu și Eforie Nord le lipsesc datele necesare și prin urmare în acest caz nu sunt valide.

Tabelul 10. Testele de neutralitate Tajima D și Fu's F pentru 16S ADNr

Stațiune	Localizare	Tajima D	Fu's F
Vadu	44°25'42.63"N 28°46'2.97"E	-	-
Navodari	44°19'42.45"N 28°40'14.87"E	- 0.817 (p:0.297)	0.090 (p: 0.302)
Mamaia	44°12'40.29"N 28°39'11.15E	- 0.829 (p: 0.228)	-1.256 (p: 0.067)
Agigea	44°4'57.91"N 28°38'30.47"E	0.069 (p: 0.455)	- 0.223 (p: 0.193)
Eforie Nord	44°3'14.96"N 28°38'37.44"E	-	-
Vama Veche	43°46'9.30"N 28°35'5.40"E	0.178 (p: 0.460)	0.390 (p: 0.514)

Analiza distanței genetice

Valoarea indicelui de fixație F_{ST} pentru secvențele *ADNr 16S* nu a indicat nici o diferență semnificativă între populațiile din zona investigată ($F_{ST} p < 0.05$)

Table 11 Valorile F_{ST} dintre populații. În albastru valorile lui p ($p < 0.05$)

Populations	Vadu	Navodari	Mamaia	Agigea	Eforie Nord	Vama Veche
Vadu		0.149	0.104	0.437	0.999	0.138
Navodari	0.149		0.999	0.807	0.999	0.674
Mamaia	0.104	0.999		0.808	0.999	0.709
Agigea	0.437	0.099	0.078		0.999	0.999
Eforie Nord	0.999	0.215	0.237	0.378		0.999
Vama Veche	0.257	0.073	0.050	0.081	0.226	

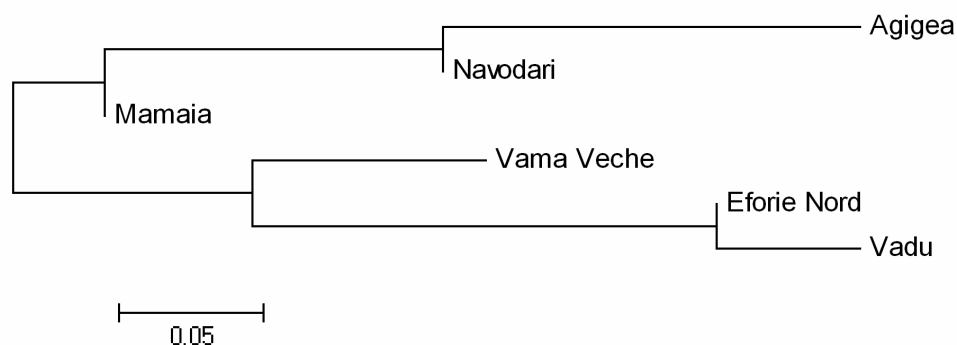


Fig. 13 Dendrograma NJ bazată pe matricea distanțelor moleculare dintre secvențele *ADNr 16S* (Kimura 2-P)

Relația dintre distanța genetică și distanța geografică

Table 12 Distanțele genetice bazate pe F_{ST} ($F_{ST}/(1-F_{ST})$, albastru) și distanțele geografice (km, îngroșat) între șase din populațiile studiate

Populations	Vadu	Navodari	Mamaia	Agigea	Eforie Nord	Vama Veche
Vadu		1.6525	0.5552	0.2771	0.0000	0.3459
Navodari	19.32		0.1521	0.1099	0.2739	0.0787
Mamaia	31.92	12.6		0.0846	0.3106	0.0526
Agigea	49.4	30.1	17.5		0.6077	0.0881
Eforie Nord	54.12	34.8	22.2	4.7		0.2920
Vama Veche	94.02	74.7	61.08	44.3	39.6	

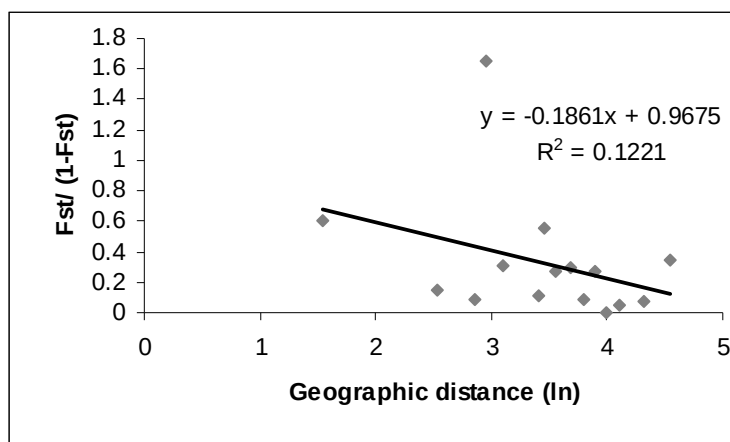


Fig. 14 Rezultatul testului Mantel pentru *ADNr 16S* între distanțele geografice ale stațiunilor de colectare și distanțele genetice ale haplotipurilor bazate pe F_{ST}

Testul Mantel nu este statistic semnificativ nici în privința genei parțiale pentru *ADNr 16S*

Analiza varianței moleculare (AMOVA)

Ipoteza AMOVA sprijină afirmația conform căreia gena pentru *ADNr 16S* nu are o putere de discriminare între populațiile aceleiași specii. În ciuda acestui fapt, totuși o mică diferențiere poate fi observată în cazul primei ipoteze când populația Vama Veche este grupată separat de celelalte (6.61).

Tabelul 13 Analiza AMOVA a secvențelor genei parțiale *ADNr 16S*

	Ipoteza 1	Ipoteza 2	Ipoteza 3
Procentul de varianță	Group1: Vama Veche Group2: Agigea, Eforie Nord, Mamaia, Navodari, Vadu	Group1: Mamaia Group2: Agigea, Eforie Nord, Vama Veche, Navodari, Vadu	Group1: Vama Veche, Eforie Nord, Agigea Group2: Mamaia, Navodari, Vadu
Între grupuri	6.61 (p=0.000)	2.56 (p=0.194)	1.81 (p=0.300)
Între populațiile din grupuri	-12.98 (p=0.972)	-11.67 (p=0.909)	-11.14 (p=0.990)
În populații	106.36 (p=0.957)	109.11 (p=0.961)	109.33 (p=0.960)

Analize filogenetice

Metoda bayesiană



Fig. 15 Inferența Bayesiană a secvențelor *ADNr 16S* pentru *Cerastoderma glaucum* (arbore filogenetic) cu *C. edule* ca și “outgroup” (model specificat: GTR; numărul de generații: 50 000 000)

Prin rularea inferenței bayesiene a unui arbore filogenetic, pot fi observate doar două grupări în cadrul indivizilor de *C. glaucum* (reprezentate în partea inferioară a arborelui filogenetic). Indivizii care nu au putut fi diferențiați se află în aceeași linie. Ca și în cazul *COX*, specia *C. edule* ca și outgroup, este distanțată de indivizii de *C. glaucum*.

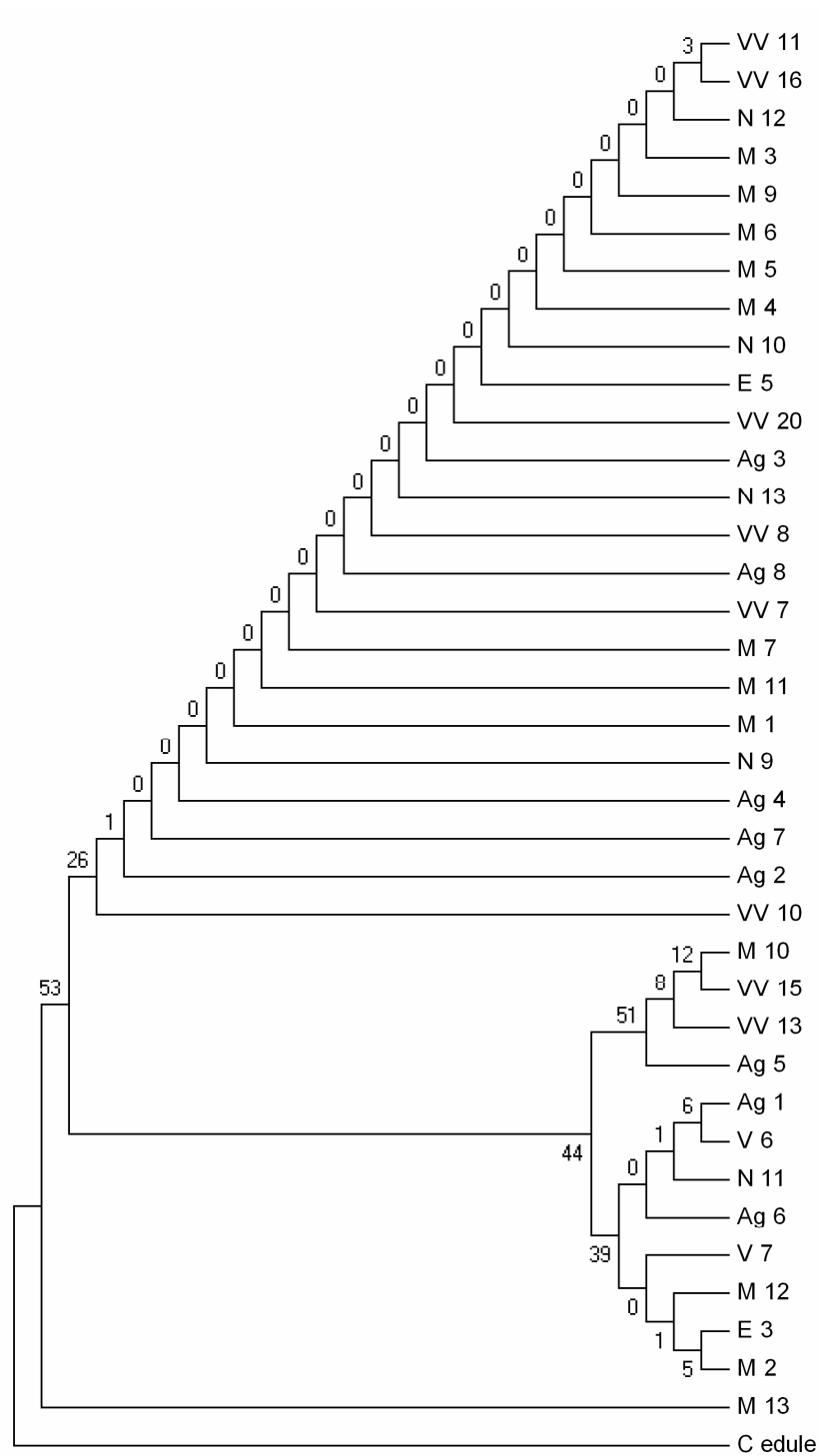


Fig. 16 Dendrograma NJ (parametrul-Kimura 2P) bazată pe secvențele *ADNr 16S*, înrădăcinată cu *C. edule*

8. Analiza combinată a subunității I a citocrom oxidazei și a genei parțiale pentru ADNr 16S

Haplotipuri identificate

Setul de date combinat prezintă o lungime de 918 perechi de baze, din care au fost identificate un număr de 10 haplotipuri. Haplotipul comun întâlnit în toate stațiunile a fost 2 (N, M, AG, VV), urmat de haplotipul 1 (N, M, AG). Haplotipurile 3 (N, AG) și 4 (M, AG) au fost prezente în două populații fiecare. Restul haplotipurilor de la 5 – 10 au fost prezente în câte o populație fiecare.

Variații între indivizi au fost observate la următorii loci: 111 (G→A), 191 (C→T), 201 (T→C), 203 (T→C), 543 (C→A), 594 (A→G), 645 (C→T), 660 (T→G), 675 (G→A), 808 (C→T) și 897 (A→G). În pozițiile 543 și 660 există o transversie din C în A și respectiv din T în G. Restul mutațiilor indică prezența tranzițiilor care sunt mai comune decât transversiiile. Aceste mutații sunt responsabile pentru prezența haplotipurilor întâlnite de-a lungul litoralului românesc al Mării Negre.

Table 14 Haplotipurile rezultate din analiza combinată a COX și ADNr 16S pentru patru dintre populațiile de *C. glaucum*

	Stațiuni (număr de indivizi)				
		Navodari (3)	Mamaia (8)	Agigea (6)	Vama Veche (4)
Haplotipuri	1	1	2	1	-
	2	1	1	1	2
	3	1	-	1	-
	4	-	1	1	-
	5	-	-	1	-
	6	-	-	1	-
	7	-	1	-	-
	8	-	3	-	-
	9	-	-	-	1
	10	-	-	-	1

Indici moleculari de bază

Analiza combinată a celor doi markeri mitocondriali indică un număr scăzut de haplotipuri în populația din Mamaia comparativ cu populațiile din celelalte stațiuni. Populația din Vama Veche deși are doar 3 haplotipuri comparativ cu numărul indivizilor, prezintă o valoare ridicată a numărului mediu de diferențe între perechile de nucleotide (3.853).

Tabelul 15 Indici moleculari de bază pentru analiza combinată a COX și ADN_r 16S

Stațiune	Localizare	N	N _H	S	H _d	K	π
Navodari	44°19'42.45"N 28°40'14.87"E	3	3	5	1.000	3.344	0.004
Mamaia	44°12'40.29"N 28°39'11.15E	8	5	6	0.858	1.967	0.002
Agigea	44°4'57.91"N 28°38'30.47"E	6	6	7	1.000	2.808	0.003
Vama Veche	43°46'9.30"N 28°35'5.40"E	4	3	7	0.833	3.852	0.004

N: numărul de indivizi; N_H: numărul de haplotipuri; S: numărul de site-uri polimorfice;
H_d: diversitatea haplotipurilor; K: numărul mediu de diferențe între perechile de nucleotide; π:
diversitatea nucleotidică

Rețeaua haplotipurilor

Rețeaua haplotipurilor obținute din setul de date combinat al marker-ilor mitocondriali prezintă un vector median - mv1 (punct roșu, Fig. 17) care reprezintă o secvență ipotetică (adesea ancestrală) necesară pentru a conecta secvențele existente în rețea. La un moment dat, caracterele 203 și 660 se repetă de două ori formând un ciclu (precum o cutie) care se numește “cub”. În acest caz există mutații paralele sau homoplazie.

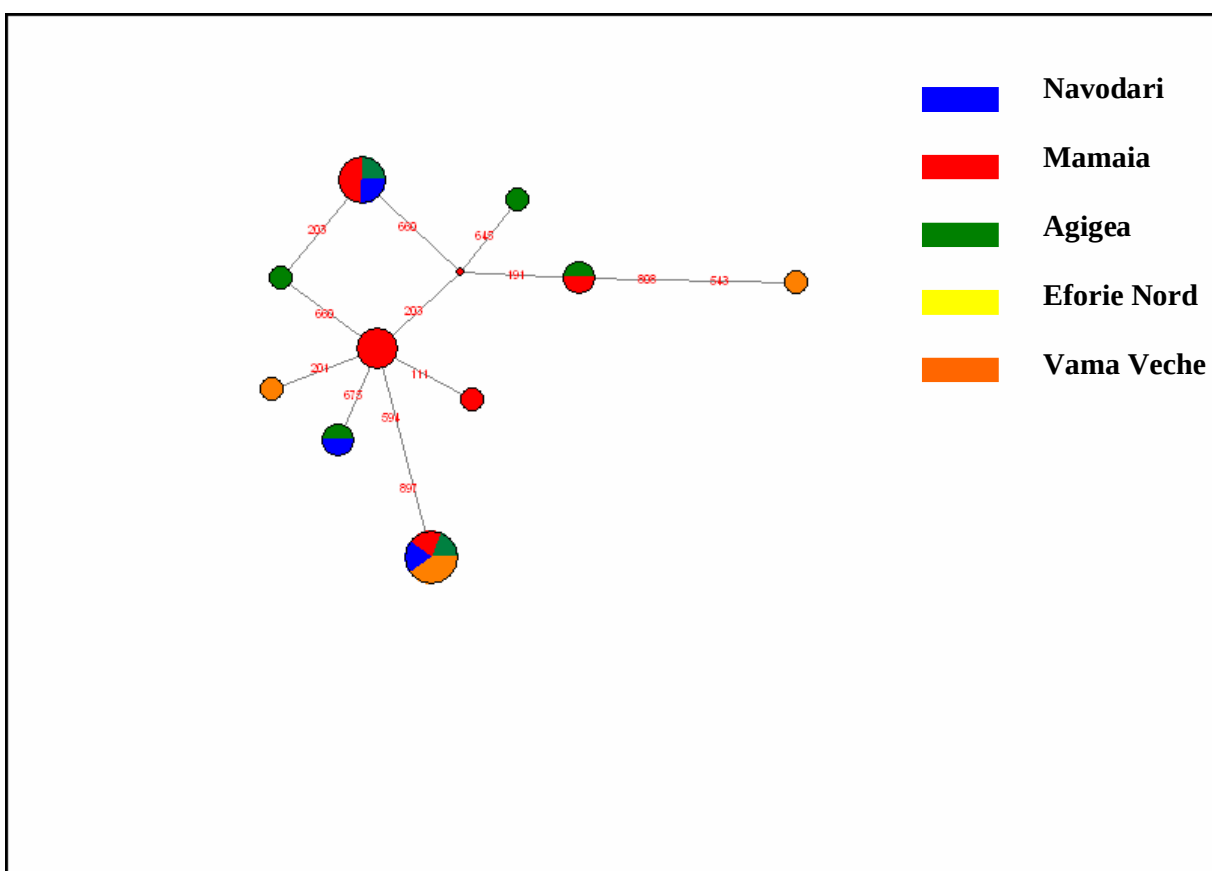


Fig. 17 Rețeaua haplotipurilor bazate pe analiza combinată a *COX* și *ADNr 16S*. Mărimea cercurilor este proporțională cu frecvența fiecărui haplotip. Numărul de pe ramuri indică poziția mutațiilor.

Testele de neutralitate

Testele de neutralitate s-au dovedit a fi statistic ne semnificative chiar și în analiza combinată a celor doi markeri mitocondriali.

Table 16 Testele de neutralitate Tajima D și Fu's F pentru analiza combinată a COX și ADNr 16S

Stațiune	Localizare	Tajima D	Fu's F
Navodari	44°19'42.45"N 28°40'14.87"E	0.000 (p: 0.000)	- 0.077 (p: 0.231)
Mamaia	44°12'40.29"N 28°39'11.15E	- 0.704 (p: 0.280)	- 1.191 (p: 0.136)
Agigea	44°4'57.91"N 28°38'30.47"E	- 0.504 (p: 0.371)	- 3.453 (p: 0.005)
Vama Veche	43°46'9.30"N 28°35'5.40"E	0.039 (p: -0.363)	1.099 (p: 0.624)

Analiza distanței genetice

Table 17 Valorile F_{ST} dintre populații în cazul analizei combinate a COX și 16S ADNr. În albastru valorile lui p ($p < 0.05$)

Populații	Navodari	Mamaia	Agigea	Vama Veche
Navodari		0.846	0.999	0.999
Mamaia	0.142		0.934	0.294
Agigea	0.24	0.115		0.398
Vama Veche	0.169	0.04	0.06	

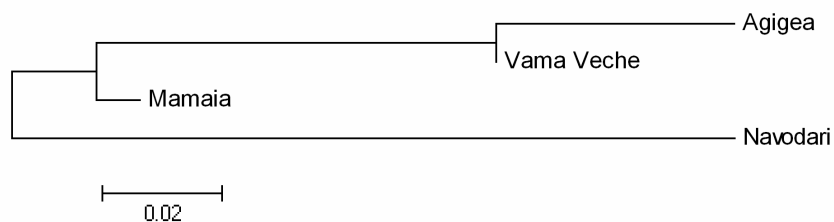


Fig 18 Dendrograma NJ bazată pe matricea distanțelor moleculare în analiza combinată a secvențelor COX și 16S ADNr (Kimura 2-P)

Analiza varianței moleculare (AMOVA)

Analiza AMOVA discriminează între Vama Veche și celelalte stațiuni (Ipoteza 1), exprimă un procentaj de varianță de 13.92. În celelalte cazuri, când Mamaia este grupată singură și când populațiile sudice (M, VV) sunt comparate cu cele nordice (N, Ag) procentajul varianței exprimate este scăzut și nesemnificativ ($p > 0.05$) și 0.54 respectiv 1.20.

Table 18 Analiza AMOVA a secvențelor combinate de COX și ADNr 16S

	Ipoteza 1	Ipoteza 2	Ipoteza 3
Procentul de varianță	Grup1: Vama Veche Grup2: Agigea, Mamaia, Navodari	Grup1: Mamaia Grup2: Agigea, Vama Veche, Navodari	Grup1: Navodari, Agigea Grup2: Mamaia Vama Veche
Între grupuri	13.92 ($p=0.000$)	0.54 ($p=0.243$)	1.20 ($p=0.331$)
Între populații în grupuri	13.28 ($p=0.744$)	7.57 ($p=0.751$)	7.10 ($p=0.881$)
În populații	99.36 ($p=0.857$)	108.11 ($p=0.860$)	108.32 ($p=0.856$)

Neighbour Joining Method

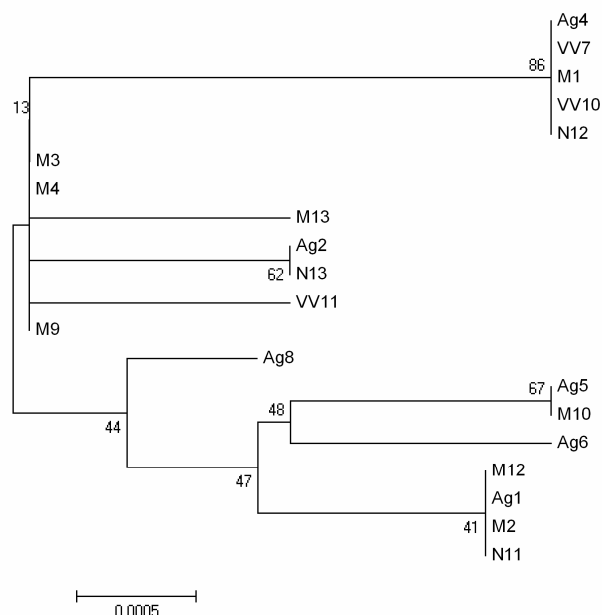


Fig. 19 Dendrograma NJ (parametrul-Kimura 2P) bazată pe analiza combinată a secvențelor COX și ADNr 16S

IV. DISCUȚII

9. Discuții asupra markerilor mitocondriali

Cele 8 haplotipuri identificate la litoralul românesc al Mării Negre cu ajutorul *COX* aparțin filogrupului Ponto-Caspic, după cum au arătat și studiile anterioare asupra populațiilor de *Cerastoderma glaucum* (Nikula and Väinölä, 2003; Tarnowska și colab., 2010). Nikula și Väinölä, 2003 investigând populații ale acestei specii cu ajutorul unui marker mitocondrial (*COX*) și a alozimelor, au descoperit două filogrupuri distincte, respectiv Atlanto-Mediteranean și Ponto-Caspic.

Această opinie a fost consolidată și de către Tarnowska și colab., 2010, care au utilizat subunitatea I a citocrom oxidazei (*COX*) și microsateliții pentru investigarea unor populații ale aceleiași specii cuprinzând o arie mai mare de studiu. În ambele studii, cel mai divers filogrup în privința diversității nucleotidelor și a numărului de haplotipuri a fost cel Atlanto-Mediteranean. În schimb filogrupul Ponto-Caspian prezintă o diversitate scăzută a indicilor moleculari, și prin urmare o structură genetică mai puțin diversă.

Studiul de față tinde să completeze cercetările anterioare prin adăugarea de noi informații privind structura genetică și distribuția speciei *Cerastoderma glaucum* în Marea Neagră. Singurele informații moleculare disponibile din regiunea Mării Negre privind această specie provin din prelevări efectuate în Varna (Bulgaria) (Nikula și Väinölä, 2003), Constanța (Romania) și Seihierovka (Ucraina) (Tarnowska și colab., 2010). De la Varna au fost identificate un număr de 4 haplotipuri (75, 78, 87, 88), de la Constanța 5 haplotipuri (75, 78, 79, 88, 89) și Seihierovka 7 haplotipuri (75, 80, 81, 86, 87, 88, 90). În urma studiului efectuat, prin adăugarea populațiilor de la litoralul românesc al Mării Negre, au fost semnalate următoarele haplotipuri: 75, 78, 79, 80, 86, 88 precum și două haplotipuri noi (Haplotipul Ag și Haplotipul VV).

Autorii studiilor anterioare au utilizat o nomenclatură diferită pentru haplotipurile identificate în regiunea Ponto-Caspică. În consecință, același haplotip a avut în unele cazuri două nominalizări după cum urmează: 24 (= 75); 28 (=87); 30 (=78); 32 (88). Aceste haplotipuri erau comune în ambele studii. Pentru a evita orice confuzie în legătură cu haplotipurile identificate în prezentul studiu, am apelat la nomenclatura utilizată în Tarnowska și colab., 2010, datorită semnalărilor mai recente a haplotipurilor noi.

Distribuția generală a variabilității genetice în populațiile de *C. glaucum* de la litoralul românesc este relativ scăzută, ceea ce este în concordanță cu studiile anterioare asupra acestei specii în regiunea Ponto-Caspică. Relațiile între haplotipuri sugerează un eveniment de tip efect fondator precum de altfel indică și celelalte rezultate ale analizei subunității I a citocrom oxidazei. Există un haplotip central, prezent în fiecare stațiune investigată și anume haplotipul 75.

Cele 2 mutații suferite de populația de la Vama Veche și doar o singură mutație prezentă în restul stațiunilor, sugerează probabil că această populație poate avea un rol de efect fondator și prin urmare sursa pentru celelalte populații prezente la litoralul românesc.

Această viziune ar putea fi explicată atât prin conexiunea acestei specii cu formarea Mării Negre cât și prin înțelegerea tiparului curenților din Marea Neagră. Conform lui Ryan și colab., 1997, acum 7500-8000 de ani a avut loc un potop masiv dinspre Mediterana înspre Marea Neagră, transformând fostul mediu dulcicol al Mării Negre într-unul sărat. Dacă ipoteza potopului este corectă atunci poate fi găsită o explicație pentru diversitatea genetică scăzută a populațiilor de *C. glaucum* în perioada scurtă de timp care a trecut de la apariția acestei specii în Marea Neagră, ceea ce reprezintă un impediment în dobândirea unei diversități mai ridicate.

În ceea ce privește markerul mitocondrial *ADNr 16S*, acesta s-a dovedit a nu fi un marker cu o rezoluție bună care poate discrimina între populațiile aceleiași specii. Această concluzie este observabilă din analiza distanțelor genetice a diferențelor de perechi (FST) și din analiza varianței moleculare (AMOVA).

10. Cum influențează fenomenele de “upwelling” și “downwelling” din Marea Neagră distribuția acestei specii?

Distribuția acestei specii la litoralul românesc pare să respecte spectrul specific al strategiilor reproductive care pot să acționeze ca forțe ce influențează fluxul genic și diferențierea genetică între populații (Palumbi, 1994). Speciile cu larve planctotrofice, care au o capacitate mare de dispersie și o durată mai mare de viață, sunt capabile să realizeze joncțiuni între populațiile adulte de-a lungul distribuției spațiale a acestora (Palumbi, 2003). Larvele lecitotrofice, care au o durată de viață scurtă indică un flux genic scăzut între populații (Hoare și colab., 1999), și în contrast speciile care sunt lipsite de stadiu larvar, cel mai probabil au cel mai scăzut nivel de diversitate genetică.

Ultimele două categorii de larve se înscriu cel mai probabil în tiparul speciei *C. glaucum* datorită faptului că stadiul larvar al acestei specii nu este foarte bine cunoscut, unii autori susținând că stadiul larvar este foarte scurt, de aproximativ o săptămână (Boyden și Russell, 1972) iar alții că acesta ar fi absent.

Conform subunității I a citocrom oxidazei (COX) toate populațiile de *C. glaucum* de la litoralul românesc se compotră ca o singură populație mare fără nici un tipar genetic.

Este cunoscut faptul că vânturile din regiunea Mării Negre au o influență asupra salinității de suprafață, asupra modului în care nutrienții sunt distribuiți și asupra nivelului de clorofilă produsă în masa apei (Staneva și colab., 2010). Fenomenul de “downwelling” este favorizat de vânturile din nord și este care împing suprafața apei bogată în nutrienți și cu o

salinitate scăzută către coastă. În opoziție, vânturile din sud și vest influențează fenomenul de “upwelling” care duc departe de țărm apele fluviale (Staneva et al., 2010).

Shanks și Brink, 2005 au testat o ipoteză conform căreia larvele de bivalve care înoată încet sunt purtate pe distanțe mari față de țărm în timpul fenomenului “upwelling” și sunt aduse înapoi către țărm în timpul fenomenului “downwelling”. Ei au demonstrat că atunci când larvele sunt situate sub termoclină (zonă de discontinuitate între două mase de ape marine cu temperaturi diferite), ipoteza nu era confirmată, larvele fiind împinse către țărm în timpul fenomenului “upwelling” și către larg în timpul fenomenului “downwelling”. În schimb ipoteza a fost confirmată când larvele se aflau deasupra termoclinei, formulându-se concluzia ca influența acestor două fenomene asupra larvelor de bivalve depinde de comportamentul și distribuția verticală a larvelor (Shanks și Brink, 2005). Astfel, acțiunea valurilor poate avea un efect limitativ asupra larvelor de *C. glaucum* în timpul poziționării acestora pe substrat. Enunțul ipotezei afirmă că distribuția speciei este limitată la zonele în care influențele valurilor sunt reduse iar nivelul mareelor este scăzut și expunerea la aer este rară (Boyden și Russell, 1972).

11. Prezența portului Constanța nu pare să influențeze structura populațiilor de *C. glaucum*.

Litoralul românesc al Mării Negre a suferit numeroase schimbări datorită activităților antropice, printre care un rol important revine construirii porturilor (Ungureanu și Stănică, 2000). Portul Constanța este cel mai mare port de la litoralul românesc și reprezintă de asemenea principala poartă de intrare a speciilor invazive (Anastasiu și colab., 2009). În ciuda impactului activităților portuare asupra litoralului românesc, acest fapt nu pare să influențeze distribuția speciei *Cerastoderma glaucum* dedusă din structura genetică. De fapt, rezultatele analizelor nu indică nici un tipar genetic care să poată fi întâlnit în populațiile acestei bivalve de-a lungul litoralului. Dacă acest fapt este adevărat trebuie observat modul în care portul ar putea induce indirect acest fenomen.

Pe lângă portul Constanța, există unele porturi mai mici precum Midia și Mangalia, toate având debarcadere de protecție. Se știe că asemenea structuri precum debarcaderele pot modifica distribuția curenților marini și prin urmare transportul sedimentelor (Ungureanu și Stănică, 2000). De exemplu cel mai important debarcader este cel de la Midia, care nu permite transportul sedimentelor de la Dunăre înspre sud, în acest fel partea sudică a litoralului românesc fiind privată de sedimente. Aceasta se reflectă și la nivelul fundului stâncos prezent în această parte a litoralului. Prin urmare acest tip de construcții sunt responsabile de distribuția sedimentelor și este posibil ca indirect să influențeze populațiile de *C. glaucum* de la litoral prin crearea tipului de substrat pe care trăiește această specie.

12. Aspecte ale legăturii dintre morfologia cochiliei și haplotipuri

Studiul morfologiei cochiliei de *C. glaucum* i-au condus pe Mariani și colab., 2002 la concluzia că există diferențe alometrice între cochiliile celor două specii de *Cerastoderma*. În timp ce la *C. glaucum* se remarcă o alometrie pozitivă însemnând că dacă animalul crește, lățimea, greutatea și înălțimea cresc mai rapid decât lungimea ceea ce conferă cochiliei o formă rotundă, la *C. edule* există o creștere alometrică negativă rezultând o cochilie de formă mai alungită. În cazul populațiilor de *C. glaucum* din România, deoarece nu există nici o corelație între ADN-ul mitocondrial și forma cochiliei, singurii factori care ar putea modela cochilia să fie factorii de mediu precum salinitatea, temperatura și substratul.

13. Legătura dintre *C. glaucum* și familia Limnocardiidae din complexul Razelm–Sinoe

Un caz interesant îl constituie relația dintre *Cerastoderma glaucum* și familia Limnocardiidae ai cărei reprezentanți trăiesc în lacurile din apropierea țărmului Mării Negre. Deși în trecut, această familie relictă Limnocardiidae, a avut un areal de distribuție larg care cuprindea întreaga regiune Ponto-Caspică, în prezent ele sunt limitate la marea Caspică și câteva lagune din Marea Neagră (Popa și colab., 2009). Există o similaritate morfologică între *Cerastoderma glaucum* și membrii familiei de Limnocardiidae, bivalve de apă dulce. Aceasta sugerează originea înrudită a speciei studiate cu cea a membrilor acestei familii. Cu alte cuvinte, Croghan, 1983, discutând despre evoluția faunei de apă salmastră și dulce, furnizează un exemplu de evoluție particulară în regiunea Ponto-Caspică. Autorul menționează ca familia Limnocardiidae a evoluat dintr-un strămoș marin, și anume din genul *Cerastoderma*, în timpul Pliocenului. Acest fenomen a condus la o radiație diversă în cadrul familiei, care cuprinde în jur de 30 genuri endemice. În România, distribuția familiei Limnocardiidae este limitată la complexul Razelm (Popa și colab., 2010) cu doar două genuri existente în prezent care mai populează aceste lacuri.

Complexul Razelm reprezintă un sistem de lagune a cărei structură a fost modelată de influența Deltei Dunării și a Mării Negre. Acest complex fiind situat la interfața dintre cele două mase de apă, este separat de o zonă umedă față de Delta Dunării și de bancuri de nisip față de Marea Neagră (Vădineanu și colab., 1997) și a apărut într-un fost golf marin (Brețcan și colab., 2009).

Este foarte probabil ca *Cerastoderma glaucum* să fi împărțit același habitat cu aceste Limnocardiidae, dat fiind faptul că a fost observată în lac sub denumirea de *Cerastoderma edule* var. *nuciformis* (Grossu, 1962). Această posibilă coexistență a gemului *Cerastoderma* și a familiei Limnocardiidae, ar putea fi explicată de existența unei zone de comunicație a complexului Razelm cu Marea Neagră.

Drenajul normal al apei a fost dinspre lacuri înspre Marea Neagră, dar în unele cazuri accidentale datorită furtunilor, un procentaj mare de apă marină a fost adusă în lacuri. Se știe că înainte de unele lucrări hidrotehnice, salinitatea complexului Razelm era apropiată de salinitatea Mării Negre (Brețcan și colab., 2009), însemnând că peste 70% din zoobentos era alcătuit din relicte Ponto-Caspice și doar 30% erau specii de apă dulce sau salmastră (Dimitriu și colab., 2008), acesta fiind un motiv întemeiat pentru prezența genului *Cerastoderma* în lac. După anul 1970, comunicarea cu marea a fost întreruptă și apa dulce din Dunăre a modificat salinitatea până la un nivel foarte scăzut de aproximativ 0.4-0.6 g/l (Brețcan și colab., 2009) ceea ce a favorizat dispariția moluștelor bentice printre care și cele din familia Cardiidae care erau specii eurihaline.

Această schimbare a salinității apei a condus la o înlocuire a fostei faune, cu specii de apă dulce în proporție de 90% , doar 7% fiind relicte Ponto-Caspice și 3% specii salmastre și marine (Dimitriu și colab., 2008). Salinitatea foarte scăzută a apei a constituit un impediment pentru supraviețuirea genului *Cerastoderma* dar nu și pentru membrii familiei Limnocardiidae care sunt toleranți la apa dulce.

14. Influența rezervației Vama Veche asupra speciei *C. glaucum*

Conform indicilor moleculari de bază, indivizii de la Vama Veche au cea mai mare diversitate genetică în raport cu alte stațiuni de colectare. Acest fapt poate fi observat din diversitatea nucleotidică (0.004) și din numărul de diferențe între perechile de nucleotide (2.333). De asemenea, indivizii de la Vama Veche au două mutații în următoarele poziții (139-404; 190-493) în timp ce o singură mutație este caracteristică indivizilor din celelalte stațiuni. Dacă aruncăm o privire asupra modului în care evoluează mutațiile, este foarte probabil ca gruparea de indivizi de la Vama Veche să fie cea mai veche. În concluzie ea ar putea avea un statut de efect fondator. Populațiile /indivizii cu o singură mutație sunt mai nou apărute pe scară evolutivă. Cea mai apropiată stațiune care are aproape aceeași diversitate genetică este Agigea, cu diversitatea nucleotidică egală cu cea de la Vama Veche (0.004), dar numărul mediu de diferențe între perechile de nucleotide este mai scăzut (1.905).

Diversitatea genetică a populației de la Vama Veche este puțin mai mare decât a altor stațiuni, în raport cu numărul de indivizi analizați și aceasta ar putea fi în relație cu statutul de rezervație marină. Au existat numeroase măsuri și acțiuni pentru protejarea biodiversității în această rezervație de la desemnarea ei prin Legea Nr. 5/2000 ca arie marină protejată (Zaharia și colab., 2008), toate acestea contribuind astfel la limitarea impactului antropic. S-a declarat că această rezervație reprezintă o combinație de habitate diferite, servind ca o zonă de refugiu și de reproducere pentru speciile marine (Zaharia și colab., 2008) ceea ce este probabil și cazul pentru populația de *Cerastoderma glaucum* care trăiește în perimetrul rezervei.

V. CONCLUZII

- Secvențele obținute de la indivizii de *Cerastoderma glaucum* aduc argumente în plus în favoarea prezenței acestei specii la litoralul românesc și nu a speciei *C. edule* Linnaeus, 1758 descrisă din literatura de specialitate pentru această zonă.
- Structura genetică a populațiilor de *Cerastoderma glaucum* din România pare să nu respecte nici un tipar de-a lungul ariei de distribuție
- Portul Constanța, cel mai probabil nu influențează structura genetică a populațiilor
- Haplotipurile identificate în urma studiului efectuat demonstrează că populațiile de la litoralul Românesc aparțin filogrupului Pont-Caspic.
- Rezultatele noastre indică o variabilitate genetică scăzută a acestei specii la litoralul românesc, ceea ce este caracteristic și altor specii din bazinul Mării Negre.
- Între cei doi markeri mitocondriali utilizați în investigarea structurii genetice a populațiilor (*COX* și *ADNr 16S*), am constatat că markerul *COX* este cel mai adecvat.
- Am constatat că *ADNr 16S* nu poate fi un marker adecvat pentru a discrimina între populațiile aceleiași specii.
- Analiza combinată a *COX* și *ADNr 16S* a identificat un număr de 10 haplotipuri pentru toate stațiunile investigate ceea ce reprezintă mai mult decât fiecare marker luat în parte și ar fi oportună o astfel de abordare în studii viitoare.
- Haplotipul principal 75 a fost prezent în toate populațiile românești de *C. glaucum*
- Vama Veche, dintre toate stațiunile, a indicat cea mai mare diversitate a haplotipurilor, a numărului de nucleotide și numărului mediu de diferențe între perechile de nucleotide.
- Haplotipurile de la Vama Veche prezintă două mutații, iar celelalte haplotipuri au doar o mutație
- Presupunem că prin cele două mutații, gruparea de la Vama Veche este cea mai veche și în același timp poate fi considerată ca având efect fondator.
- Diversitatea populației de la Vama Veche ar putea fi determinată de statutul de rezervație marină, ceea ce diminuează impactul antropic păstrând nealterată biodiversitatea zonei.
- Mamaia, deși a avut numărul cel mai mare de indivizi analizați, a fost stațiunea cea mai puțin diversă în privința indicilor moleculari de bază

- Morfologia speciei aparent nu are nici o legătură cu ADN-ul mitocondrial, prin urmare singurii factori care ar putea avea vreo influență sunt temperatura, salinitatea și substratul.
- Prezentul studiu completează cunoștințele despre distribuția și structura genetică a speciei *Cerastoderma glaucum* din Marea Neagră
- Datele cercetării noastre deschid calea spre studii viitoare pentru investigarea complexă a acestei specii în Marea Neagră, reconstituirea întregii istorii naturale a speciei, precum și posibilului impact asupra societății umane prin utilizarea ei ca o sursă alternativă de hrană.

VI. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Anastasiu, P., Negrean, G., Făgăras, M., Samoilă, C., Cogălniceanu, D., 2009. Constanta harbour (Romania) as a major gateway and reservoir for alien plant species. *Acta Horti Bot. Bucurest*, **36**: 41-60
- Boyden, C. R., Russell, P. J. C., 1972. The distribution and habitat range of the brackish water cockle (*Cardium (Cerastoderma) glaucum*) in the British isles. *Journal of Animal Ecology*, **41**: 719-734.
- Bretcan, P., Murarescu, O., Samoila, E., Popescu, O., 2009. Water management in the Razim-Sinoe lacustrine complex. International Symposium on Water Management and Hydraulic Engineering. Ohrid/Macedonia
- Brock, V., 1979. Habitat selection of two congeneric bivalves, *Cardium edule* and *C. glaucum* in sympatric and allopatric populations. *Marine Biology*, **54**: 149-156.
- Brock, V., 1987. Genetic relations between the bivalves *Cardium (Cerastoderma) edule*, *Cardium lamarcki* and *Cardium glaucum*, studied by means of crossed immunoelectrophoresis. *Marine Biology*, **93**: 493-498.
- Croghan, P.C., 1983. Osmotic regulation and the evolution of brackish and fresh-water faunas. *Journal of the Geological Society*, **140**: 39-46.
- Derbali, A., Jarboui, O., Ghorbel, M., Zamouri-Langar, N., 2008. Population structure, distribution and relative abundance of *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) from the Bou Ghrara Lagoon (Gulf of Gabes, Southern Tunisia). *JMBA – Biodiversity Records*, doi.: 10.1017/S1755267209000487.
- Derbali, A., Jarboui, O., Ghorbel, M., 2009. Reproductive biology of the cockle *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) from the north coast of Sfax (Gulf of Gabes, Tunisia). *Ciencias Marinas*, **35**: 141-152.
- Dimitru, R. G., Oaie, G., Gomoiu, M. T., Begun, T., Szobotka, Ș., Rădan, S. C., Fulga, C., 2008. O caracterizare interdisciplinară a stării geoecologice a complexului lagunar Razim-Sinoe la începutul secolului XXI. *Geo-Eco-Marina*, **14**: 69-74
- Freire, R., Arias, A., Mendez, J., Insua, A., 2010. Identification of european commercial cockles (*Cerastoderma edule* and *C. glaucum*) by species-specific PCR amplification of the ribosomal DNA ITS region. *European Food Research and Technology*, 1-4.
- Gontikaki, E., Antoniadou, C., Chintiroglou, C. C. 2003. Population structure of *Cerastoderma glaucum* and *Abra ovata* in Vouliagmeni lagoon (Attiki), *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **83**: 1095-1097.
- Grossu, A. 1962. Fauna Republicii Populare Romîne, Mollusca. Bivalvia (Scoici), Vol. III. Fasc. 3, 426 pp. Editura Academiei Republicii Populare Romîne, Bucuresti
- Healy, T., Harada, K. 1991 Definition and physical characteristics of the world's enclosed coastal seas. *Marine Pollution Bulletin*, **23**: 639-644
- Hoare, K., Hughes, R. N., Goldson, A. J., 1999. Molecular genetic evidence for the prevalence of outcrossing in the hermaphroditic brooding bryozoan *Celeporella hyalina*. *Marine Ecology Progress Series*, **188**: 73-79
- Hummel, H., Wołowicz, M., Bogaards, R. H., 1994. Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Neth. J. Sea Res.*, **33**: 81-89
- Ivell, R., 1979. The biology and ecology of a brackish lagoon bivalve, *Cerastoderma glaucum* Bruguière, in Lago Lungo, Italy. *Journal of Molluscan Studies*, **45**: 364-382
- Krzymińska, J., 1993. The distribution of *Cerastoderma glaucum* (Poiret), *Macoma balthica* (Linnaeus), *Mya arenaria* (Linnaeus) and *Mytilus edulis* (Linnaeus), in Holocene bottom sediments of the southern Baltic Sea. *Scripta Geol., Spec. Issue 2*: 269-273.
- Labourg, P. J., Lasserre, G., 1980. Dynamique des populations de *Cerastoderma glaucum* dans une lagune aménagée de la région d'Arcachon. *Mar. Biol.* **60**: 147-157

- Machado, M. M., Costa, A. M., 1994. Enzymatic and morphological criteria for distinguishing between *Cardium edule* and *C. glaucum* of the Portuguese coast. *Mar. Biol.* **120**: 535-544
- Mariani, S., Piccari, F., De Matthaeis, E., 2002. Shell morphology in *Cerastoderma* spp. (Bivalvia: Cardiidae) and its significance for adaptation to tidal and non-tidal coastal habitats. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **82**: 483-490
- McArthur, V. E., 1998. Post-settlement mortality of juvenile lagoonal cockles (*Cerastoderma glaucum*: Mollusca: Bivalvia). *Mar. Biol.* **132**: 117-122.
- Nikula, R., Väinölä, R., 2003. Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae) across Europe: a major break in the eastern Mediterranean. *Marine Biology*, **143**: 339-350
- Palumbi, S. R., 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **25**: 547-572
- Palumbi, S. R., 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**: S146-S158
- Picton, B. E., Morrow, C. C., 2010. In: Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland. Available at http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=W19_920, accessed on 2011.05.02.
- Popa, O. P., Sarkany-Kiss, A., Kelemen, B. S., Iorgu, E. I., Murariu, D., Popa, L. O., 2009. Contributions to the knowledge of the present limnocardiid fauna (Mollusca: Bivalvia) from Romania. *Travaux du Muséum National D'Histoire Naturelle 'Grigore Antipa'*, **L2**: 7-15
- Popa, O. P., Iorgu, E. I., Kelemen, B. S., Murariu, D., Popa, L. O., 2010. Morphometric analysis of some populations of lymnocardid species (Mollusca: Bivalvia) from Razelm Lake complex (Romania). *Travaux du Muséum National D'Histoire Naturelle 'Grigore Antipa'*, **L3**: 13-19
- Russell, P. J. C., 1972. Biological studies on *Cardium glaucum*, based on some Baltic and Mediterranean populations. *Marine Biology*, **16**: 290-296
- Russell, P. J. C., Høpner Petersen, G., 1973. The use of ecological data in the elucidation of some shallow water European *Cardium* species. *Malacologia*, **14**: 223-232.
- Ryan, W. B. F., Pitman III, W. C., Major, C. O., Shimkus, K., Moscalenko, V., Jones, G. A., Dimitrov, P., Gorür, N., Sakinç, M., Seyir, H. Y., 1997. An abrupt drowning of the Black Sea shelf at 7.5 Kyr B.P. *Geo-Eco-Marina*, **2**: 115-125
- Rygg, B., 1970. Studies on *Cerastoderma edule* (L.) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret). *Sarsia*, **43**: 65-80.
- Sarà, G., 2007. Sedimentary and particulate organic matter: mixed sources for cockle *Cerastoderma glaucum* in a shallow pond, Western Mediterranean, *Aquat. Living Resour.*, **20**, 271-277.
- Shanks, A. L., Brink, L., 2005. Upwelling, downwelling, and cross-shelf transport of bivalve larvae: test of a hypothesis. *Marine Ecology Progress Series*, **302**: 1-12
- Staneva, J., Kourafalou, V., Tsiaras, K., 2010. Seasonal and interannual variability of the north-western Black Sea Ecosystem. *Terr. Atmos. Ocean. Sci.*, **21**: 163-180
- Tarnowska, K., Chenuil, A., Nikula, R., Féral, J.-P., Wołowicz, M., 2010. Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. *Marine Ecology Progress Series*, **406**: 173-184
- Trotta, P., Cordisco, C. A., 1998. Gonadal maturation, conditioning, and spawning in the laboratory and maturation cycle in the wild of *Cerastoderma glaucum* Bruguière. *J. Shellfish Res.*, **17**: 919-923.
- Ungureanu, V. G., Stanica, A., 2000. Impact of human activities on the evolution of the Romanian Black Sea beaches. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* **5**: 111-115.

- Vadineanu, A., Cristofor, S., Ignat, Gh., Romanca, G., Ciubuc, C., Florescu, C. 1997. Changes and opportunities for integrated management of the Razim-Sinoe Lagoon System. *International Journal of Salt Lake Research*, **6**: 135-144
- Wilson, J. G., Elkaim, B., 1997. Seasonal and geographical differences in oxygen consumption with temperature of *Cerastoderma glaucum* (Poiret) and a comparison with *C. edule* (L.). *Estuar. Coast. Shelf. S.*, **45**: 571-577.
- Zaharia, T., Nicolaev, S., Maximov, V., Micu, D., Nită, V., 2008. Measures and actions for the protection of the biodiversity from the marine reserve 2 Mai – Vama Veche. *Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii*, **24**: 230-236