

**UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
CATEDRA DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ**

**Markeri moleculari pentru amfibieni și reptile în genetica  
populațiilor**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**Îndrumător științific:  
Prof. Univ.Dr. Octavian Popescu**

**Student doctorand:  
Marosi Albert Béla**

**Cluj – Napoca  
2011**

## Cuprins

Mulțumiri .....	5
Rezumat.....	6
Date din literatură.....	9
1. Utilizarea genelor MHC în genetica populațiilor .....	9
1. 1. Structura și funcția genelor MHC .....	9
1. 2. Genomică comparativă a complexului major de histocompatibilitate .....	12
1. 3. Mecanismele selecției naturale care întrețin polimorfismul genelor MHC .....	14
1. 4. Utilizarea genelor MHC în diferite domenii de studiu.....	16
1. 5. Abordări pentru izolarea genelor MHC .....	22
1. 6. Analiza polimorfismului la genele MHC .....	25
2. Utilizarea genelor COI în filogenie, filogeografie și genetica populațiilor.....	26
2. 1. Abordări pentru izolarea genelor COI.....	29
3. Genetica populațiilor .....	29
4. Metode statistice tipice pentru genele MHC .....	35
5. Metode statistice tipice pentru filogenie și filogeografie cu markeri mitocondriali..	36
Proiecte de cercetare și rezultate .....	40
1. Identificarea parțială a exonului 2 din gena MHC II B, la două specii de ofidieni: <i>Natrix tessellata</i> și <i>Natrix natrix</i> .....	40
1. 1. Metode.....	40
1. 2. Rezultate și discuții .....	41
2. Identificarea și caracterizarea alelelor de MHC II B la trei specii de amfibieni din familia Ranidae .....	45
2. 1. Materiale și Metode.....	45
2. 2. Rezultate.....	48
2. 3. Discuții .....	52
3. Identificarea secvențelor parțiale ale COI la două specii de amfibieni strâns înrudite, <i>Rana dalmatina</i> și <i>Rana temporaria</i> .....	55
3. 1. Metode.....	55
3. 2. Rezultate și discuții .....	57

4. Filogeografie bazată pe COI și variabilitate genetică intraspecifică a populațiilor de <i>Rana dalmatina</i> în jurul Carpaților .....	61
4. 1. Materiale și Metode.....	62
4. 2. Rezultate.....	64
4. 3. Discuții .....	67
5. Filogenia bazată pe COI a amfibienilor din grupul Ranidea din Europa: <i>Rana arvalis</i> , <i>Rana temporaria</i> , <i>Rana dalmatina</i> , <i>Pelophylax kurtmuelleri</i> și <i>Pelophylax lessonae</i> .....	68
5. 1. Materiale și Metode.....	69
5. 2. Rezultate și discuții .....	70
6. Refugiu glaciatic al speciei <i>Mesotriton alpestris</i> în Munții Apuseni .....	74
6. 1. Materiale și Metode.....	74
6. 2. Rezultate și discuții .....	75
7. Filogeografia șarpelui de apă ( <i>Natrix tessellata</i> ) în Europa de Sud și de Est .....	81
7. 1. Materiale și Metode.....	82
7. 2. Rezultate și discuții .....	83
8. Comparatie între filogenie bazată pe MHC și filogenie bazată pe COI.....	88
Concluzii .....	92
Bibliografie.....	94
Lista articolelor publicate.....	100
Participări la conferințe .....	100

## **Mulțumiri**

Prezentul studiu doctoral a fost efectuat la Centrul de Biologie Moleculară, Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano științe, Universitatea "Babes-Bolyai", Cluj-Napoca.

Mai întâi de toate, aș dori să mulțumesc conducătorului meu de doctorat, Prof. Dr. Octavian Popescu, pentru că m-a acceptat la doctorat și mi-a oferit oportunitatea de a lucra în laboratorul său, pentru înțelegerea și încrederea în perioada desfășurării studiilor, pentru sprijinul financiar și tehnic.

În al doilea rând realizarea acestei teze nu ar fi fost posibil fără ajutorul și sprijinul lui Dr. Ioan V. Ghira. Aș dori să-mi exprim recunoștința pentru încurajarea lui continuă, pentru idei noi de proiecte și pentru asistență în activitatea de teren și de colectare a probelor.

Am plăcerea să mulțumesc tuturor colegilor de laborator pentru că mi-au dat sfaturi valoroase și m-au învățat metode noi de lucru în timpul lucrărilor de laborator sau în analiza datelor: Dr. Jakab Endre, dr. Sergiu Chira, Dr. Annette Damert., Dr. Bálint Miklós, dr. Iulia Lupan, Dr. Beatrice Kelemen, Dr. Beatrix Ferencz, Dr. Mircea Chiriac, Emilia Licarete, Kovács Levente, Bartha László, Sajgó Szilárd, Irina Matetovici și Miruna Ghinia.

Mulțumiri speciale pentru Dr. Karen M. Kiemnec-Tyburczy pentru ajutorul dat la analiza și interpretarea datelor.

Nu în ultimul rând a-și dori să mulțumesc părinților mei pentru susținerea și încurajarea în timpul studiului de doctorat.

**Cuvinte Cheie:** complex major de histocompatibilitate, situs de legare a antigenelor, citocromoxidază subunitatea I, filogenie, filogeografie, genetica populațiilor, Ranidae, Natrix, Mesotriton.

## Rezumat

Complexul major de histocompatibilitate (MHC) este o regiune genomică relativ largă, care se găsește la toate speciile de vertebrate gnatostrimate. Majoritatea genelor din această regiune sunt necesare pentru răspunsul imun și astfel sunt vitale pentru supraviețuirea organismului.

Funcția proteinelor MHC este prezentarea peptidelor derivate din agenți patogeni intra- și extracelulari. Proteinele MHC II sunt exprimate pe suprafața celulelor prezentatoare de antigen, cum ar fi macrofagele, și funcția lor principală este de a prezenta antigenele extracelulare celulelor T-helper. Complexul matur MHC II este compus dintr-un lanț peptidic alfa și beta care este codificat de genele MHC II A și B. Situsul de legare al antigenelor (antigen binding site –ABS) al acestui complex de proteine heteromere este codificat de exonul 2 al genelor A și B. Aceste situsuri sunt adesea extrem de polimorfe și arată semnele selecției naturale. Teoriile care motivează variația extremă a acestor situsuri sunt: avantajul heterozigoților, selecția dependentă de frecvență și de preferința de împerechere nealeatorie.

Deoarece aceste gene și în special situsurile de legare a antigenelor sunt atât de variabile și joacă un rol-cheie în răspunsul imun al vertebratelor, acestea sunt adesea folosite ca markeri moleculari pentru evaluarea structurii genetice a populațiilor. Populațiile cu o variabilitate scăzută a genelor MHC, pot fi extrem de amenințate de infecții și / sau de efectele consangvinizării.

În cazul amfibienilor și reptilelor, în special la broaște și șerpi, există foarte puține studii axate pe structura și variabilitatea genelor MHC. Multe specii de ofidieni și amfibieni se confruntă cu un declin al populațiilor ca urmare a acestor boli infecțioase emergente. Evaluarea variației genetice a locilor MHC la speciile de reptile și amfibieni amenințate sau pe cale de dispariție, este importantă pentru dezvoltarea strategiilor de conservare și de management, care vizează menținerea variabilității adaptive.

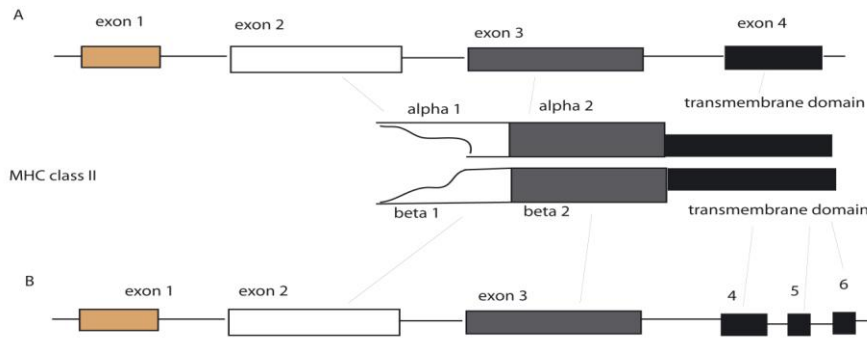
Proteina COI/COX1 (citocromoxidază c subunitatea 1), subunitatea principală a complexului de proteine citocromoxidază c, este codificată în mitocondrii și are funcție catalitică. Acesta este markerul cel mai popular pentru studiile de genetica populațiilor și de filogeografie în regnul animal. Popularitatea sa a crescut și mai mult deoarece se pare că partiția M1-M6 a genei COI (Regiunea Folmer) este un instrument eficient pentru identificarea speciilor de metazoare. Acesta este motivul pentru care acest fragment de genă a devenit principala secvență de barcoding ADN. Codul de bare ADN poate servi ca mijloc de acces la informații taxonomice și ajută la identificarea speciilor, precum și la evidențierea acelor specii pentru care nu există date disponibile. Acesta nu este un instrument complet pentru o reconstrucție filogenetică, dar prin completarea datelor COI cu alți markeri nucleari sau mitocondriali, putem obține informații detaliate și exacte despre specii / filogenie, filogeografie și structura populațiilor.

Prezentul studiu s-a axat pe identificarea, caracterizarea și aplicabilitatea a două tipuri diferite de markeri moleculari (MHC clasa IIB exon 2 și COI) la amfibieni și reptile. Speciile studiate au fost următoarele: *Rana dalmatina*, *Rana temporaria*, *Rana arvalis*, *Pelophylax lessonae*, *Pelophylax kurtmuelleri*, și *Mesotriton alpestris* - specii de amfibieni și *Natrix tessellata*, *Natrix natrix* și *Lacerta agilis* - specii de reptile.

## **Introducere, date din literatură**

### **1. Utilizarea genelor MHC în genetica populațiilor**

Această secțiune se ocupă cu structura moleculară, clasificarea și funcția genelor MHC, abordările generale pentru izolarea acestor gene și utilizarea lor în genetica populațiilor. Pentru studiile de genetica populațiilor cel mai relevant este exonul 2 al genei MHC clasa IIB. Acest exon codifică canelura de legare a antigenelor în complexul MHC II, în lanțul de proteină beta (Figura 1) și este situsul cel mai variabil în genomul speciilor de vertebrate (Penn & Ilmonen 2005).



**Figura 1:** Structura schematică a genelor și proteinelor MHC clasa II.

După modelul de la mamifere, la toate celelalte specii, complexul major de histocompatibilitate este divizat în regiuni cuprinzând gene cu funcții similare: clasa I, clasa a II-a și clasa a III-a, inclusiv regiunile extinse ale claselor I și II (Kelley et al 2005.). Numărul de gene și prezența acestora variază de la o specie la alta.

Pentru a explica modul în care este menținut polimorfismul prin selecție naturală la genele MHC, au fost propuse mai multe ipoteze: avantajul heterozigoților (overdominant selection), selecția dependentă de frecvență, preferința de împerechere nealeatorie, precum și ipoteza evitării consangvinizării (Penn 2002).

Genele MHC au stârnit interesul ecologilor, deoarece sunt extrem de polimorfe și sunt relevante pentru multe întrebări de ecologie și evoluție. Pentru că sunt esențiale în recunoașterea imună a paraziților, aceste gene sunt implicate în orice domeniu în care paraziții joacă un rol. Studiile de fitness, de exprimare a caracterelor sexuale secundare și de alegere a partenerului pot beneficia de cunoștințele despre variațiile genelor MHC. Genele MHC sunt potențial importante în conservarea speciilor, iar diversitatea lor excepțională oferă perspective noi pentru a înțelege structura și istoria genetică a populațiilor (Hedrick 2003).

## 2. Utilizarea genelor COI in filogenie, filogeografie și genetica populațiilor

Această secțiune prezintă structura și funcția genei citocromoxidază subunitatea I, abordările pentru izolarea acestei gene și utilizarea ei în barcodingul ADN al speciilor de animale, în filogenie și filogeografie. Studiile asociate cu Consortium for the Barcode of Life (CBOL) folosesc de obicei, o secvență de 648 de baze ale genei COI, începând de la capătul 5'. Variațiile intraspecifice în această secvență sunt, în general, cu 10% mai puține decât variațiile interspecifice iar inserțiile sau delețiile sunt rare (Waugh 2007).

### **3. Genetica populațiilor**

Această secțiune prezintă și explică termeni generali, metode și principii aplicate în genetica populațiilor

### **4. Metode statistice tipice pentru genele MHC**

Genele MHC sunt diferite de alte gene în ceea ce privește selecția pozitivă care acționează la nivelul situsurilor de legare a antigenelor. Prin urmare, analiza acestor secvențe are nevoie de anumite metode specifice, care sunt prezentate în această secțiune.

### **5. Metode statistice tipice pentru filogenie și filogeografie cu markeri mitocondriali**

Această secțiune se ocupă cu explicarea termenilor generali de filogenetică, filogeografie, cu alegerea modelului cel mai corespunzător pentru analiza secvențelor, și cu descrierea de modele și metode analitice.

## **Proiecte de cercetare și rezultate**

În această secțiune sunt prezentate separat proiectele de cercetare. Pentru fiecare proiect rezultatele cercetării, metodele și discuțiile sunt separate.

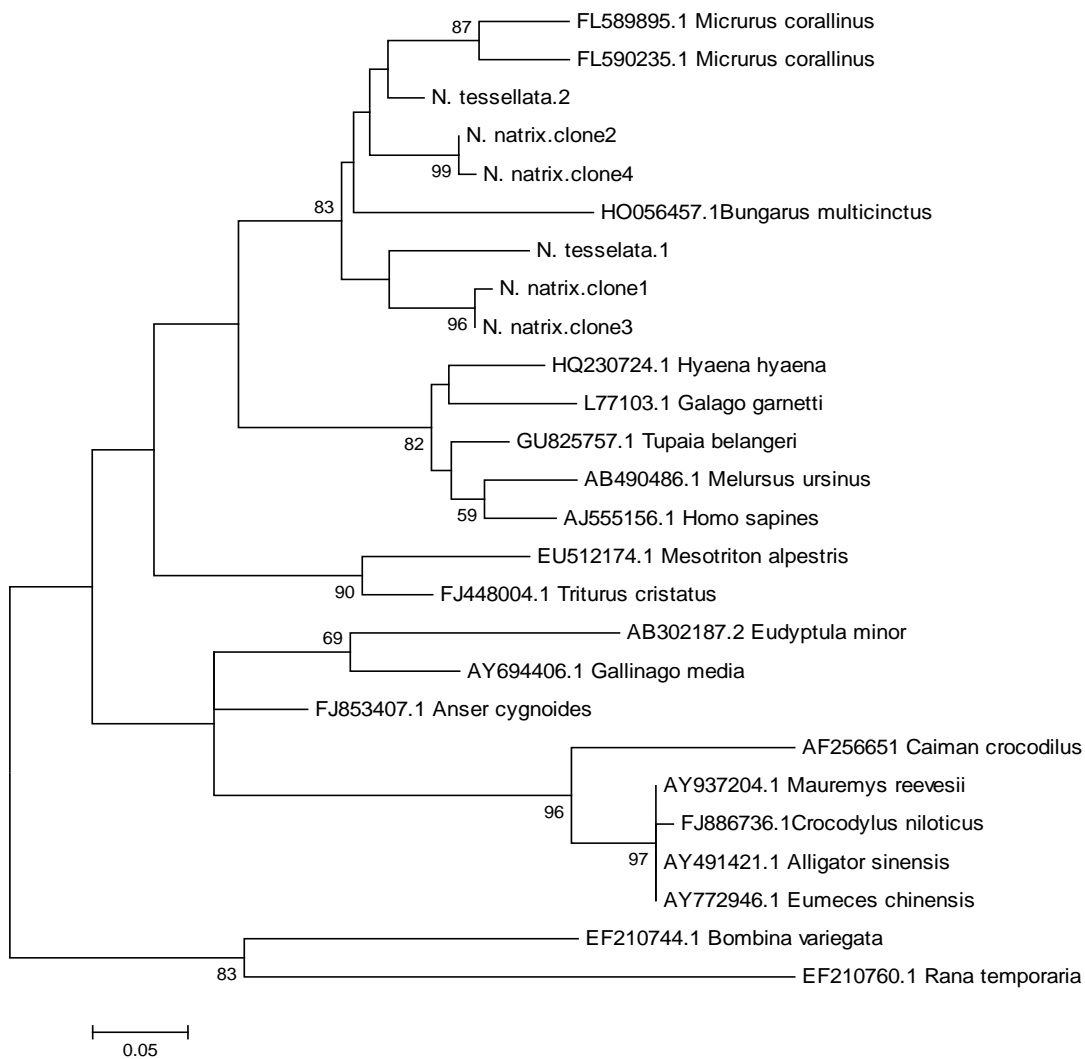
### **1. Identificarea parțială a exonului 2 din gena MHC II B, la două specii de ofidieni: *Natrix tessellata* și *Natrix natrix***

Doi indivizi de *Natrix tessellata* (*N. tessellata1* și *N. tessellata2*) și un individ de *Natrix natrix* au fost utilizați în acest studiu. Pentru a demonstra că secvențele noastre sunt într-adevăr secvențe MHC și pentru construcția arborelui filogenetic, am folosit secvențe MHC omoloage din NCBI. Pentru construcția amorsoarelor am folosit două secvențe de *M. corallinus* (FL589895.1 FL590235.1), deoarece alinierea cu secvențele omoloage de la alte reptile au generat puține regiuni conservate. Amorsoarele degenerate construite de noi, SnakeMHC F: AGC GGG TGC GGT TCC TSS și SnakeMHC R: GTC CRC ATC CGS CTC CCC au dat un produs lung de 113 bps, la temperatura de aliniere de 59° C.

În cazul celor 20 de clone de *N. tessellata*, de la 2 indivizi am găsit doar 2 alele (*N. tessellata 1* și *N. tessellata 2*). În cazul individului de *N. natrix* am găsit 4 alele (clone1-4). Arborele filogenetic indică faptul că secvențele noastre de MHC nu pot fi utilizate pentru



distingerea între specii. Clonele de *N. natrix* clona 1 și clona 3 se grupează împreună cu *N. tessellata* 1, în timp ce *N. natrix* clona 2 și clona 4 se grupează, împreună cu *N. tessellata* 2, și cu secvențele *M. corallinus*. Rezultatele noastre indică prezența de trans-species polimorfism, un fenomen în care aceleași alele sunt păstrate în diferite specii de-a lungul evoluției (Klein et al. 1998). Este important de reținut faptul că secvențele MHC de la șarpe se grupează împreună cu secvențele de mamifere și nu cu restul speciilor de reptile, care par a fi mai aproape de secvențele de MHC de pasăre (Fig. 2).



**Figura 2:** Arborele filogenetic al secvențelor MHC clasa II B-exon 2, după metoda Maximum Likelihood.

## 2. Identificarea și caracterizarea alelelor MHC II B la trei specii de amfibieni din familia *Ranidae*

Interesul în monitorizarea populațiilor de amfibieni este în creștere din cauza apariției unor boli infecțioase cauzate de *Batrachochytrium dendrobatidis* (BD) (Berger et al. 1998) și de ranavirus (ES) (Granoff 1989). Multe specii de broaște europene se confruntă cu un declin al populațiilor ca urmare a acestor boli infecțioase emergente (de exemplu, *Pelophylax esculentus* klepton; Wood et al 2009 și *Rana temporaria*, Teacher et al 2010).

Scopul studiului de față a fost de a identifica și de a caracteriza exonul 2 din gena MHC II B la trei specii europene de *Ranidae*: broasca de mlaștină (*Rana arvalis*), *Pelophylax kurtmuelleri* și broasca mică de lac (*Pelophylax lessonae*). Scopul nostru a fost de a construi și de a optimiza amorse care pot fi folosite pentru analizarea structurii populațiilor și pentru analizarea filogeografiei acestor specii de *Ranidae*.

Am folosit țesutul unor specimene conservate în etanol: *R. arvalis* (n = 3), *P. kurtmuelleri* (n = 2), *R. temporaria* (n = 2) și *P. lessonae* (n = 2). *P. kurtmuelleri* este dificil să se distingă de *R. ridibunda*, astfel am testat cele două exemplare cu amorsele universale 16Sar și 16Sbr (Palumbi 1996). Am folosit o pereche de amorse degenerate (MHC-F și MHC-5R), dezvoltată de Hauswaldt et al. (2007) pentru a amplifica un fragment de 235 bps (cu amorsele inculte) la speciile *R. arvalis* și *R. temporaria*. Prin utilizarea secvențelor de *R. pipiens*, *R. sylvatica*, *R. palustris*, *R. warszewitschii*, *R. yavapaiensis* și *R. catesbeiana* din baza de date NCBI, am realizat o pereche de amorse degenerate pentru a amplifica exonul 2. Secvențele acestor amorse erau: RanaF 5'-CAG TGT TAT TAC CGG AAC GGG ACG-3 "și RanaR2: 5'-TTT SMG STC TAT GGC TGY AGG-3". Lungimea estimată a produsului a fost de 243 de baze (cu amorsele incluse).

În total au fost izolate 13 alele MHC II B-exon 2 din ADN-ul genomic al celor trei specii de *Ranidae*. Secvențele alelelor au arătat similitudine semnificativă cu secvențele altor specii de amfibieni din GenBank (BLAST e-value mai mic decât 2.4e-48). Cele 2 secvențe *R. temporaria* au fost folosite numai în construirea arborelui filogenetic, deoarece această secvență la *R. temporaria* a fost deja caracterizată (Zeisset și Beebee 2009), dar alelele identificate de noi au fost mai lungi și nu identice cu cele prezente în NCBI.

La *R. arvalis*, din cei 61 de aminoacizi ai secvenței au existat 12 poziții variabile între cele opt alele aliniate. Opt dintre aceste situsuri variabile au făcut parte din ABS (situs de legare a antigenelor, antigen binding site) după modelul lui Tong et al. (2006).

Rata mutațională nonsinonimă a fost semnificativ mai mare decât rata mutațională sinonimă în pozițiile ABS, un rezultat care indică selecție pozitivă acționând pe aceste situsuri (Tabelul 1). În schimb, rata mutațională nonsinonimă nu a fost mai mare decât rata de mutații sinonime în pozițiile non-ABS.

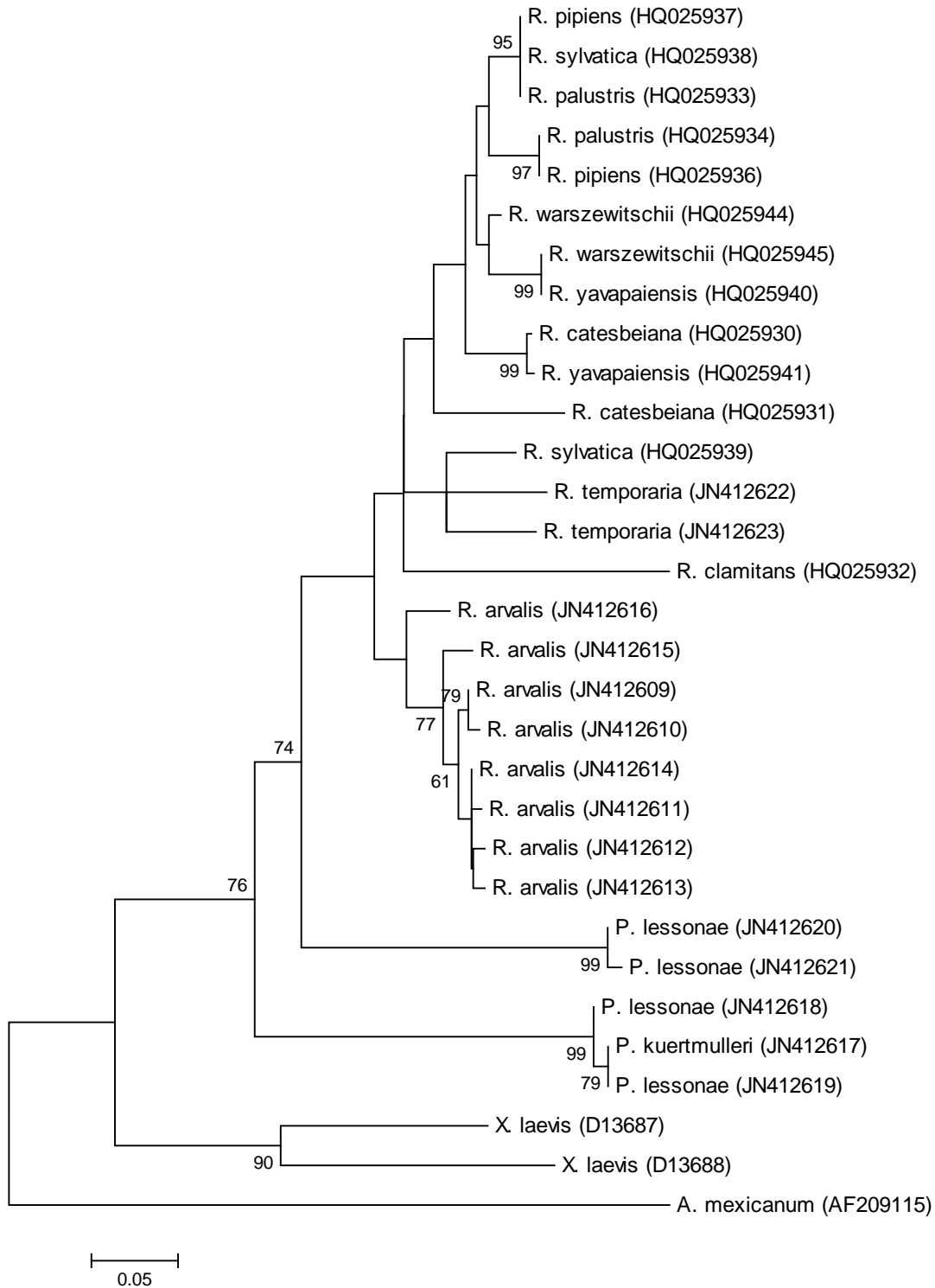
**Tabel 1:** Estimările ratelor mutaționale nonsinonime ( $d_N$ ) și sinonime ( $d_S$ ) ale alelelor de MHC clasa II B exon 2, la două specii de broaște.

Sites	N	$d_S$	$d_N$	$d_N-d_S$	P
<i>R. arvalis</i> ABS	8	0.015 ± 0.014	0.154 ± 0.009	0.139 ± 0.043	0.003
<i>R. arvalis</i> Non-ABS	8	0.032 ± 0.016	0.01 ± 0.005	-0.022 ± 0.017	1.0
<i>P. lessonae</i> ABS	4	0.324 ± 0.280	0.431 ± 0.214	0.107 ± 0.333	0.375
<i>P. lessonae</i> Non-ABS	4	0.334 ± 0.121	0.199 ± 0.041	-0.135 ± 0.134	1.0

Pentru *P. kurtmuelleri* am găsit doar o singură alelă. La a treia specie, *P. lessonae*, am găsit 30 poziții variabile de aminoacizi, cu șapte dintre ele aparținând de ABS-urile definite de Tong et al. (2006) iar 23 sunt în regiunea non-ABS. La *P. lessonae* nu am găsit o dovadă semnificativă de selecție pozitivă în pozițiile ABS (Tabelul 1).

Analiza filogenetică moleculară a indicat alele comune între specii: trans-species polimorfism (Fig. 3). Alelele de *R. arvalis* au format un grup bine definit, dar două alele de *P. lessonae* s-au grupat împreună cu secvența de *R. kurtmuelleri* cu sprijin bootsrap foarte mare. Celelalte două alele de *P. lessonae* au format un grup separat care a fost mult mai strâns legat de speciile din America de Nord. Surprinzător, alelele de *R. temporaria* s-au grupat împreună cu secvențele speciilor din America de Nord, deși nodul de separare între *R. temporaria* speciile de *Rana* din America și *R. arvalis* a avut sprijin redus.

Deducem că *R. arvalis* are cel puțin doi loci MHC II B pentru că am recuperat patru alele unice de la un singur individ. De asemenea presupunem că *P. lessonae* are cel puțin doi loci, pentru că diferențele de aminoacizi între cele două grupuri de alele sunt atât de mari încât este probabil că acestea reprezintă doi loci diferiți.



**Figura 3.** Relațiile filogenetice între secvențele MHC clasa IIB exon 2 la amfibieni. Arborele a fost generat după metoda maximum likelihood. *Ambystoma mexicanum* a fost folosit ca un outgroup și valorile bootstrap (1000 replicare) sunt afișate pentru nodurile care au primit sprijin mai mare de 60%. Codurile GenBank sunt în paranteză.

### 3. Identificarea secvențelor parțiale de COI la două specii de amfibieni strâns înrudite, *Rana dalmatina* și *Rana temporaria*

În acest studiu vom prezenta secvențele parțiale de COI ale celor două specii precum și analiza relațiilor filogenetice între aceste secvențe și secvențele altor specii de *Rana* disponibile în baza de date NCBI. Pentru a confirma identificarea speciilor bazată pe caractere morfologice am analizat de asemenea o secvență a genei 16S rARN ale speciilor respective.

Doi indivizi de *Rana dalmatina* (*dalmatina1* și *dalmatina2*) și de *Rana temporaria* (*temporaria1* și *temporaria2*) au fost folosiți în acest studiu.

Am folosit amorsele universale 16Sar și 16Sbr (Palumbi 1996) pentru a amplifica o secvență de aproximativ 590 bps din gena mitocondrială 16S rARN.

Pentru a obține secvența parțială de COI am folosit amorsele degenerate V1F și V1R publicate de către Smith et al (2008). Inițial, un fragment de 710 bps a fost amplificat pe ADN-ul genomic la individul *dalmatina1*. Bazat pe produsul acestui PCR am conceput amorsele specifice:

RanaCOIF: 5'TTCTCTACTAACCACAAAGACATTGG 3 "și

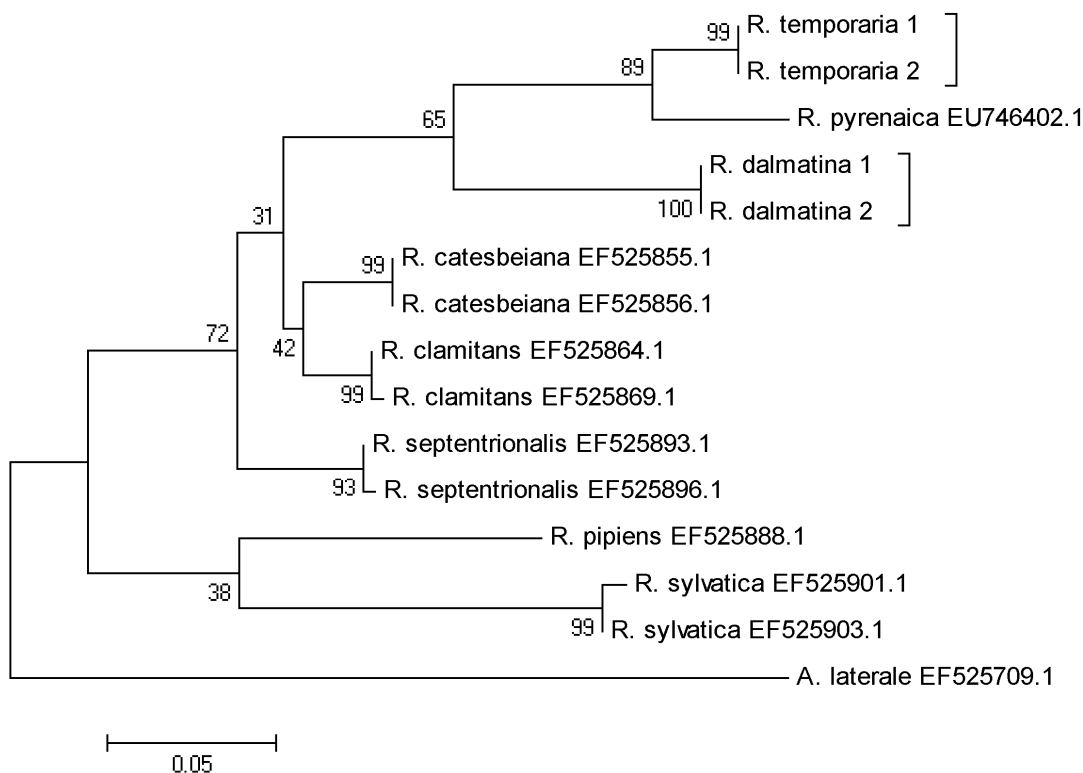
RanaCOIR: 5 "TAGACTTCTGGGTGGCCGAAAAATCA 3".

Lungimile secvențelor obținute după secvențializarea directă cu RanaCOIF au fost în jur de 640 bps.

Bazându-ne pe alinierea secvențelor obținute de *R. temporaria*, *R. dalmatina* și a secvențelor omologe de COI ale altor specii de *Rana* am construit arborele filogenetic, după metoda maximum likelihood (Fig. 4).

Arborele COI prezintă o topologie similară cu cel obținut din secvențele de 16S rARN în ceea ce privește poziția secvențelor de *R. dalmatina* și *R. temporaria*. În cazul arborelui de 16S rRNA *R. pyrenaica* se dovedește a fi mai strâns legat de *R. temporaria* decât de *R. dalmatina*. Separarea este clară între speciile europene (*R. dalmatina*, *R. pyrenaica* și *R. temporaria*) și speciile din America de Nord în cazul ambilor markeri moleculari.

După cunoștința noastră acesta este primul raport al secvențelor de COI la *Rana temporaria* și *Rana dalmatina*. Amorsele specifice, dezvoltate pentru secvențializarea directă ar trebui să faciliteze o evaluare rapidă a variabilității populațiilor de *Rana*.

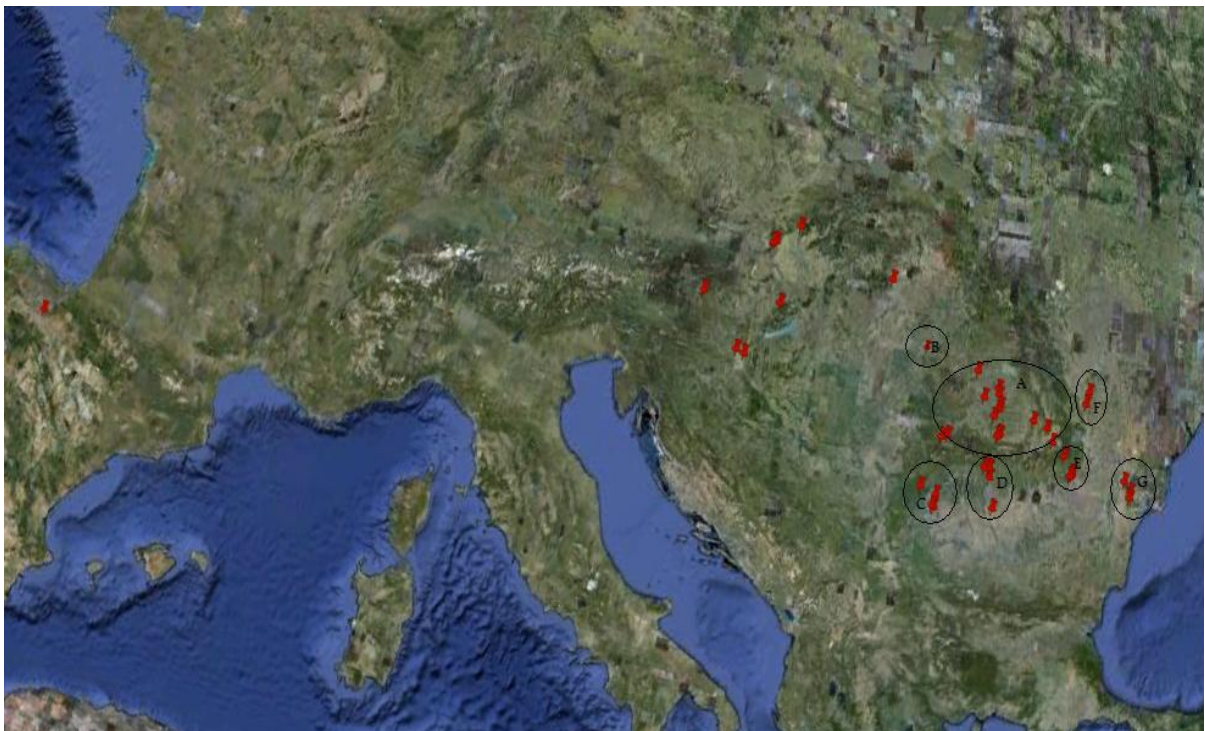


**Figura 4:** Arborele filogenetic după metoda maximum likelihood al secvențelor de COI la speciile de *Rana*. Valorile bootstrap sunt afișate în stânga nodurilor.

#### 4. Filogeografie bazată pe COI și variabilitate genetică intraspecifică a populațiilor de *Rana dalmatina* în jurul Carpaților

Regiunile cele mai bine cunoscute ca refugii glaciare pentru animale și diferite specii de plante sunt peninsulele mediteraneene și Caucazul (Taberlet et al. 1998). Cu toate acestea, se pare că unele specii au supraviețuit perioadelor glaciare recente în refugii criptice, mai spre nord ca și în cazul speciei *R. arvalis*, care arată o mare diversitate în Bazinul Carpatic (Babik et al. 2004). Refugiu local a fost identificat, cu haplotipuri distincte și pentru *R. temporaria*, în sud-vestul Irlandei (Teacher et al. 2009). Având în vedere prezența unor refugii criptice pentru *Rana temporaria* și *Rana arvalis* și în afara peninsulelor mediteraneene, am căutat posibile refugii criptice pentru specia *Rana dalmatina* în jurul Munților Carpați și Podișul Transilvaniei. Pe baza genei de COI, care este de asemenea, utilizat pentru barcodingul ADN al speciilor metazoare (Smith et al 2008) am încercat să elucidăm variabilitatea genetică a populațiilor de *R. dalmatina* în România.

Specimenele au fost colectate din 7 regiuni geografice din România (Imagine 1). Regiunile au fost marcate cu litere de la A la G. Probele care fac parte din regiunea A ( $n = 31$ ) au fost colectate din Podișul Transilvaniei, și sunt considerate o metapopulație, deoarece nu există nici o barieră geografică considerabilă care ar putea împărți populațiile. Regiunea B este la vest de Munții Apuseni și sud de râul Criș, cu un număr de probe  $n = 5$ . Regiunea marcată cu C a fost lângă partea de sud-est a Dunării, cu  $n = 5$  probe. Regiunea D a fost delimitată la est de valea râului Olt și la nord de Carpații Meridionali cu un număr de probe  $n = 6$ . Regiunea E include zona din sud-estul Carpaților cu o dimensiune a eșantionului  $n = 6$ . Din regiunea marcată cu F, în imediata apropiere a râului Siret am putut colecta doar  $n = 2$  exemplare. Regiunea marcată cu G reprezintă platoul din Dobrogea, cu  $n = 7$  probe. În afară de cele 62 de probe din România am analizat secvențe din probele primite din alte părți ale Europei:  $n = 1$  probă din Spania (nord-vest de Pirinei),  $n = 2$  probe din Croația (la sud de râul Drava),  $n = 4$  probe din Slovacia,  $n = 1$  probă din Austria și  $n = 2$  probe din Ungaria. Aceste secvențe nu au fost incluse în analizele structurii populațiilor.



**Imaginea 1:** Punctele de colectare a probelor.

Pentru amplificări PCR și pentru secvențializarea directă am folosit amorsele RanaCOIF/ RanaCOIR din studiul anterior.

Din cele 72 de exemplare de *R. dalmatina*, după analiză am identificat 13 poziții de nucleotide variabile. Toate substituțiile de nucleotide erau sinonime, deci nu au modificat structura de aminoacizi a proteinei. Secvențele difereau numai în singletons. Pentru probele din România am identificat 9 alele diferite.

Diversitatea haplotipurilor a fost cea mai mare pentru probele din regiunea D, cu 5 alele. În regiunea A au fost înregistrate 3 alele și 2 alele în regiunea B. În regiunea F am găsit, de asemenea, 2 alele de la cele 2 probe, dar din cauza acestui număr redus de exemplare, diversitatea haplotipurilor trebuie să fie tratată cu prudență, în acest caz (Tabelul 2). Pentru regiunile C, G, E, am găsit doar o singură alelă, comună la toate.

**Tabelul 2:** Diversitatea haplotipurilor din cele 7 regiuni de eșantion( h: haplotype diversity, uh: unbiased haplotype diversity).

Pop	h	uh
C	0.000	0.000
D	0.778	0.933
A	0.231	0.239
B	0.320	0.400
G	0.000	0.000
E	0.000	0.000
F	0.500	1.000

Distanțele genetice (Pairwise Nei genetic distance) au fost cele mai mari pentru probele din regiunea D (Tabelul 3). Testul Mantel între distanța genetică (GD) și distanța geografică (GGD), indică o slabă corelație negativă,  $r_{xy} = -0.108$ , dar cu o valoare  $P = 0,07$  ne semnificativă.

Testul AMOVA nu a evidențiat o diferențiere genetică între presupuse metapopulații, separate prin Munții Carpați. Cu toate acestea, s-a dovedit diferențierea genetică a populațiilor atunci când cele 7 regiuni au fost analizate separat (Tabelul 4). Valorile maxime și semnificative de PhiPT, luate două câte două, au fost obținute pentru probele din regiunea D. Explicația noastră pentru această variabilitate mare în regiunea D este un posibil refugiu criptic al speciei.



**Tabel 3:** Distanța genetică Nei (GD) și identitatea genetică Nei (ID) pentru secvențele din cele 7 regiuni.

Pop1	Pop2	Nei GD	Nei ID
C	D	0.347	0.707
C	A	0.007	0.993
D	A	0.353	0.702
C	B	0.030	0.970
D	B	0.377	0.686
A	B	0.037	0.964
C	G	0.000	1.000
D	G	0.347	0.707
A	G	0.007	0.993
B	G	0.030	0.970
C	E	0.000	1.000
D	E	0.347	0.707
A	E	0.007	0.993
B	E	0.030	0.970
G	E	0.000	1.000
C	F	0.347	0.707
D	F	0.693	0.500
A	F	0.353	0.702
B	F	0.377	0.686
G	F	0.347	0.707
E	F	0.347	0.707

**Tabel 4:** Estimarea valorilor de PhiPT și de PhiPT linearizat ale regiunilor de eșantion.

Pop1	Pop2	PhiPT	LinPhiPT	P(rand >= data)
C	D	0.261	0.352	0.060
C	A	0.000	0.000	0.220
D	A	0.337	0.508	0.010
C	B	0.000	0.000	0.010
D	B	0.075	0.082	0.160
A	B	0.000	0.000	0.110
C	G	0.000	0.000	1.000
D	G	0.333	0.500	0.010
A	G	0.000	0.000	0.130
B	G	0.073	0.079	0.440
C	E	0.000	0.000	1.000
D	E	0.300	0.429	0.050
A	E	0.000	0.000	0.300
B	E	0.040	0.042	0.560
G	E	0.000	0.000	1.000
C	F	0.474	0.900	0.330
D	F	0.000	0.000	0.520
A	F	0.329	0.490	0.070
B	F	0.015	0.015	0.540
G	F	0.588	1.429	0.260
E	F	0.538	1.167	0.270

## 5. Filogenia bazată pe COI a amfibienilor din grupul *Ranidea* din Europa: *Rana arvalis*, *Rana temporaria*, *Rana dalmatina*, *Pelophylax kurtmuelleri* și *Pelophylax lessonae*

În acest studiu am folosit o secvență (regiunea Folmer) a genei COI (citicrom oxidază subunitatea I) pentru a determina înrudirea filogenetică a 5 specii de broaște *Ranidae*. Deși filogenia speciilor de *Ranidae* și a altor broaște a fost deja efectuată cu ajutorul markerilor de 16S rARN, 12S rARN, tARN-valină, H3 histon, rodopsină (Frost et al 2006, Veith et al. 2003), secvența genei COI încă nu a fost caracterizată. Regiunea Folmer a genei COI este instrumentul cel mai folosit pentru identificarea speciilor metazoare (Waugh 2007). Codul de bare ADN poate servi ca mijloc de acces la informații taxonomice și ajută la identificarea speciilor, precum și la evidențierea acelor specii pentru care nu există date disponibile. Arborele filogenetic obținut din secvențele de COI poate fi comparat cu arborele construit prin secvențele de 16SrARN.

Specimenele au fost aceleași cu cele din studiile anterioare și amorsele RanaCOIF / RanaCOIR au fost utilizate pentru amplificarea PCR și secvențializare directă.

Din cele 3 exemplare de *R. arvalis* am obținut 3 haplotipuri diferite de COI, în timp ce pentru cele 2 exemplare de *P. kurtmuelleri* și *P. lessonae* am obținut doar 1 haplotip de COI pentru fiecare specie. Din studiul nostru anterior am avut un haplotip de *R. dalmatina* și 1 haplotip de *R. temporaria*.

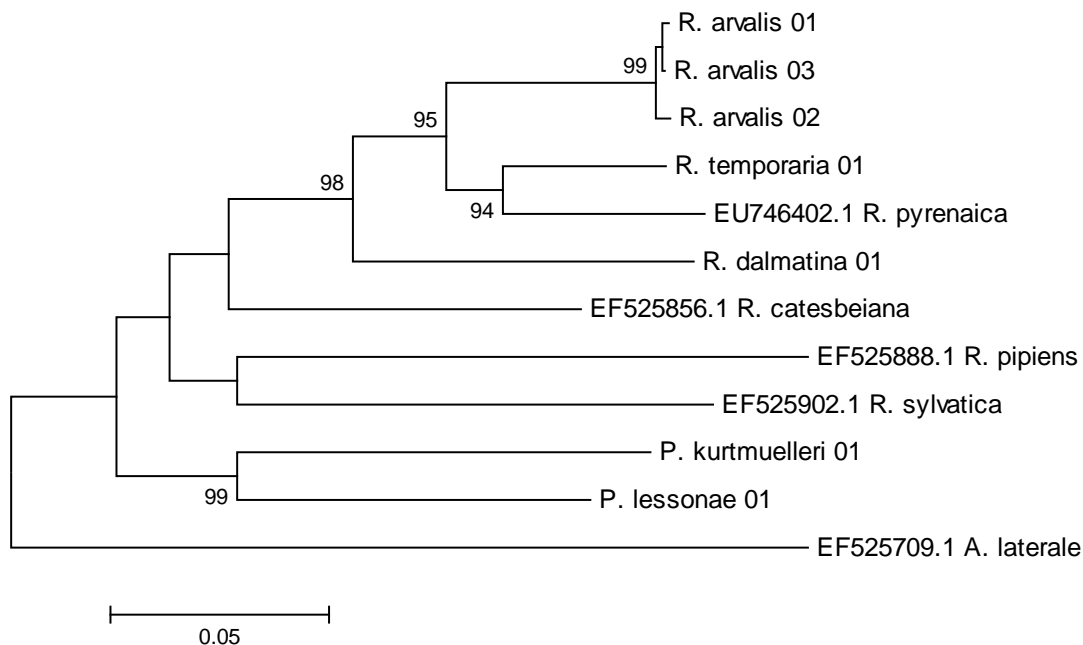
Valorile de divergență genetică estimate între perechile de secvențe au fost relativ ridicate, cele mai mari valori fiind între secvențele de *P. kurtmuelleri* 01 și *R. temporaria* 01 (Tabelul 5).

**Tabel 5:** Estimările divergențelor genetice între cele 7 haplotipuri identificate.

P._kurtmuelleri_01						
P._lessonae_01	0.173					
R._arvalis_01	0.234	0.208				
R._arvalis_02	0.239	0.213	0.006			
R._arvalis_03	0.234	0.208	0.002	0.005		
R._temporaria_01	0.244	0.199	0.102	0.105	0.104	
R._dalmatina_01	0.235	0.225	0.155	0.151	0.153	0.159

Utilizând secvențele disponibile de COI din baza de date NCBI și secvențele obținute de noi, am construit un arbore filogenetic al speciilor *Ranidae*. Potrivit arborelui filogenetic

bazat pe COI, speciile de *Rana* din Europa formează un grup distinct de speciile de *Rana* din Lumea Nouă. Însă *R. catesbeiana* pare să ocupe o poziție intermediară între speciile de *Rana* a celor două continente (Fig. 5). În cadrul speciilor Europene de *Rana*, *R. temporaria* este cea mai apropiată de *R. pyrenaica* în timp ce *R. dalmatina* reprezintă o secvență bazală. Cele două specii de *Pelophylax* formează un grup diferit de cel al speciilor de *Rana*, indicând faptul că divergența între broaștele verzi (*Pelophylax*) și broaștele brune (*Rana*) este mai veche decât separarea între speciile de *Rana* din cele două continente.



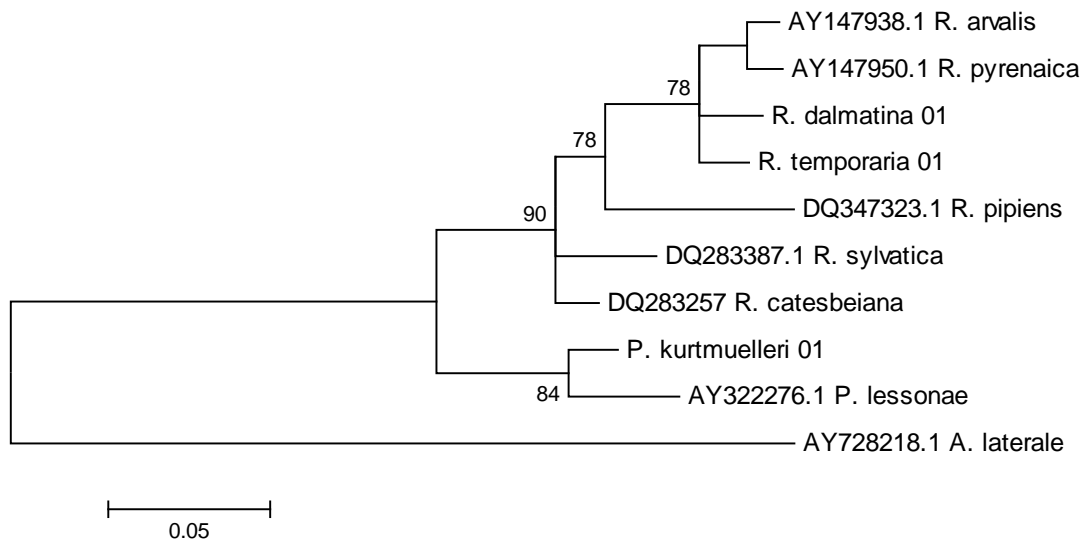
**Figura 5:** Arbore filogenetic bazat pe secvențele de COI ale speciilor de *Ranidae*. Metoda folosită: maximum likelihood, cu replici de 1000 bootstrap.

Arborele filogenetic, construit pe baza secvențelor de 16S rARN este doar puțin diferit de cel bazat pe secvențe de COI (Figura 6).

Rezultatele noastre indică faptul că divergența genetică medie este  $0.2074 \pm 0.0132$  pentru haplotipurile de COI (Modelul Kimura 2-parameter) în timp ce pentru secvențele de 16SrARN este semnificativ mai mică:  $0.103 \pm 0,01$  ( $P < 0,01$ ). Putem concluziona că secvențele de COI având variabilitate mai mare pot produce o rezoluție mai bună și constituie un marker molecular mai bun pentru barcoding și filogenie.

Alinierea celor 7 haplotipuri identificate a indicat un număr mare de poziții variabile între cele 5 specii. Numărul mare de situsuri variabile confirmă faptul că regiunea Folmer a

genei COI este instrumentul cel mai convenabil pentru identificarea speciilor și pentru barcoding.



**Figura 6:** Arbore filogenetic bazat pe secvențele de 16SrARN ale speciilor de *Ranidae*. Metoda folosită: maximum likelihood, cu replici de 1000 bootstrap.

## 6. Refugiul glaciara al speciei *Mesotriton alpestris* în Munții Apuseni

Acest studiu a vizat analiza genetică a tritonului alpin din Munții Apuseni și Carpații Meridionali, prin care am căutat un posibil refugiu criptic al speciei. Au fost analizate două populații, în concordanță cu cele două zone geografice. Tritonii din Munții Apuseni provin din localitatea Mădrigești, aflată la o altitudine de 445 m, iar cei din Carpații Meridionali provin din zona localității Voineasa, la 830 m altitudine.

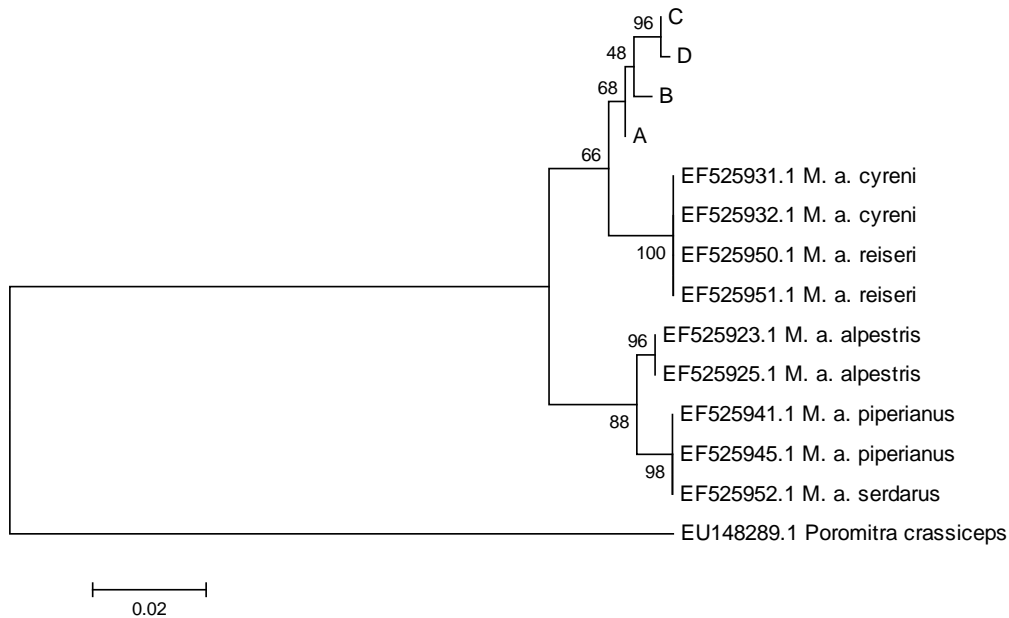
În total, 48 de indivizi au fost incluși în eșantion, 24 de probe din fiecare populație (Mădrigești: m1-24, Voineasa: v1-24).

După amplificarea inițială cu amorsele universale pentru vertebrate: V1F-V1R (Smith et al 2008), am conceput amorsele specifice:

MesF: 5' - TTCTCTACTAACCACAAAGACATTGG - 3' și

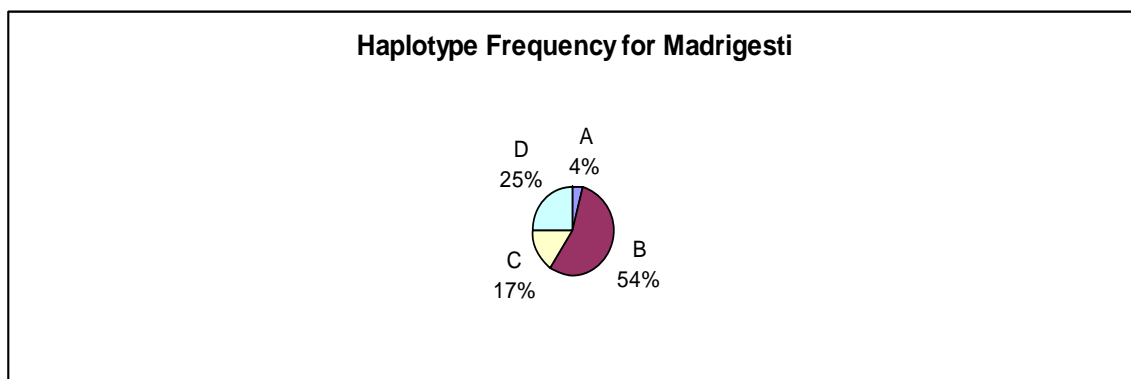
MesR: 5' - TAGACTTCTGGGTGACCAAAAAACCA - 3'. Cu ajutorul amorselor specifice am facut PCR-ul pe cele 48 de probe. Pentru a exclude orice posibilă eroare de amplificare, fiecare PCR a fost repetat.

După analiza celor 48 de secvențe, am identificat 4 alele: A, B, C și D. Alelele identificate se grupează împreună cu secvențele de *M. alpestris cyreni*, care este răspândit în Peninsula Iberică și cu *M alpestris reiseri*, subspecie care populează în Balcani (Fig. 7). Secvențele pentru comparație au fost obținute din baza de date NCBI.

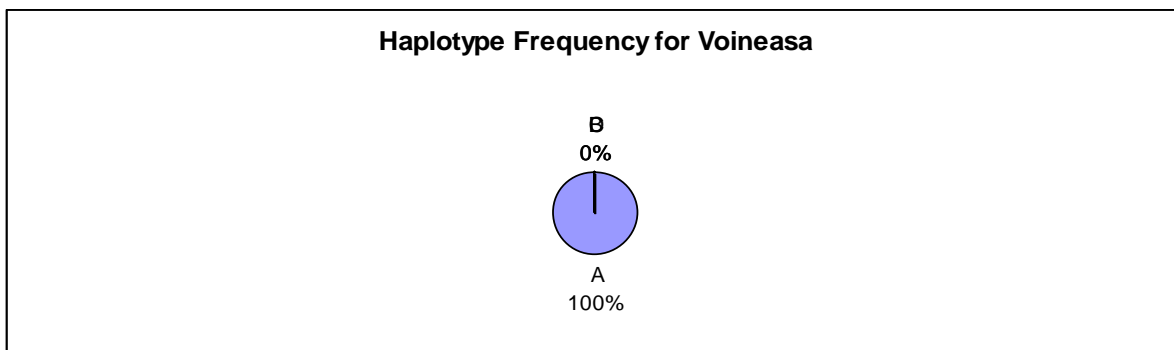


**Figura 7:** Arborele filogenetic al alelelor identificate și al secvențelor de *M. alpestris* din baza de date NCBI. Metoda folosită: maximum likelihood, cu replici de 1000 bootstrap.

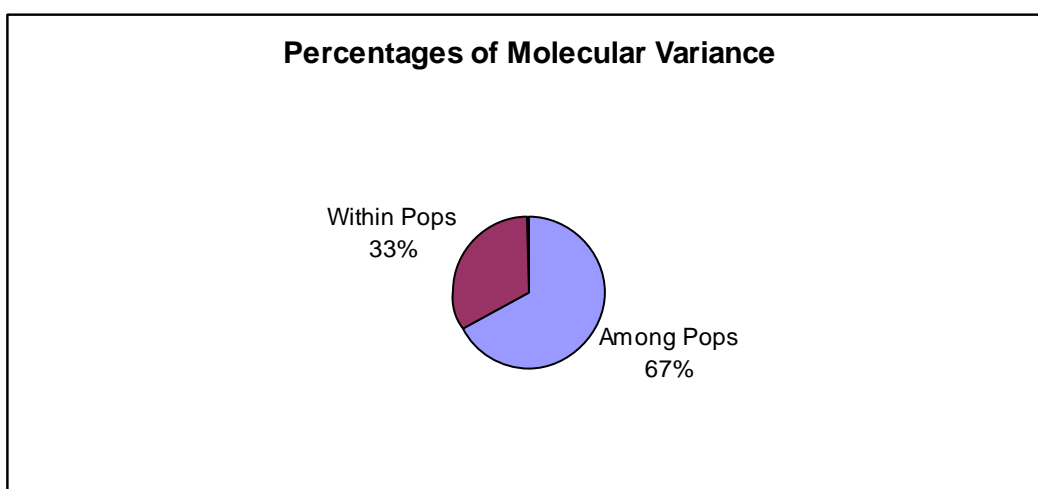
Dacă comparăm cele două populații, există între ele o distincție clară în compoziția alelică. Toate cele 4 alele identificate se găsesc în populația de la Mădrigești, cu o diversitate haplotipică de 0.615, în timp ce populația de la Voineasa este omogenă, având doar o alelă (Fig. 8a, b), fapt care indică efectul fondator (founder effect) în cazul acestei populații. Valoarea PhiPT este de 0.665 ( $P = 0,001$ ), care prezintă o diferențiere majoră între cele două populații. Testul AMOVA arată că variabilitatea genetică cu privire la haplotipuri, este mai mare între cele două populații decât în interiorul celor două populații (Fig. 9).



**Figura 8a:** Frecvența haplotipurilor în populația de la Mădrigești.



**Figura 8b:** Frecvența haplotipurilor în populația de la Voineasa.



**Figura 9:** Procentajul variației moleculare între- și în cadrul populațiilor, după testul AMOVA.

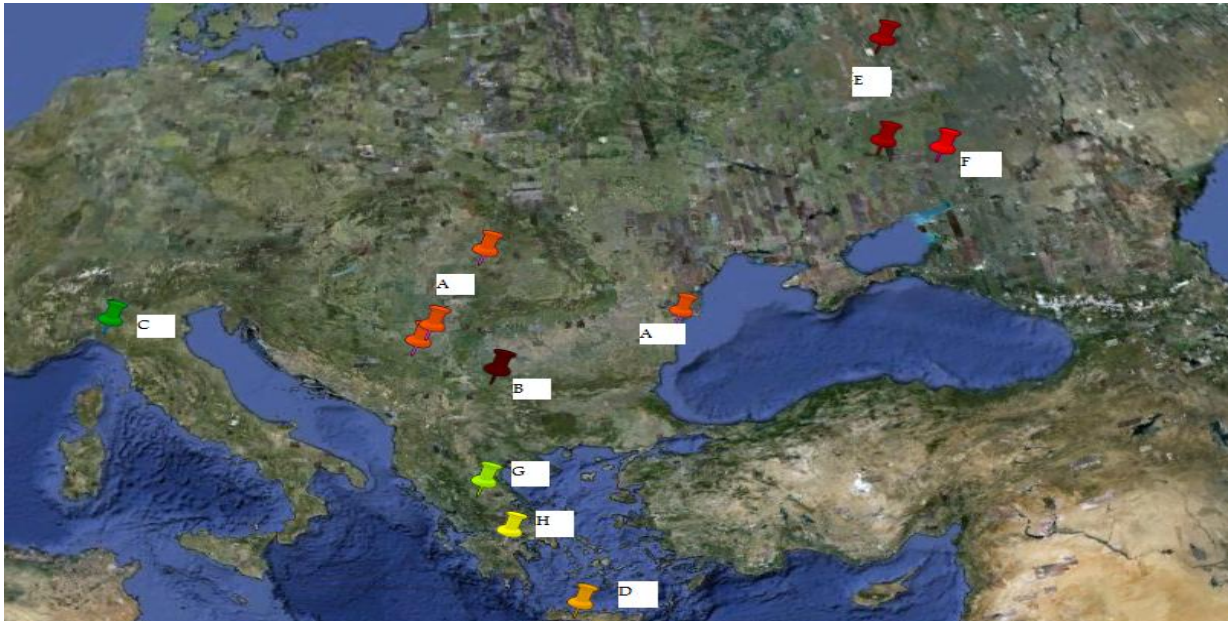
## 7. Filogeografia șarpelui de apă (*Natrix tessellata*) în Europa de Sud și de Est

În acest studiu am folosit gena COI (citocromoxidază subunitatea I) pentru a elucida relațiile filogenetice între haplotipurile de *Natrix tessellata* din Europa de Est și din Balcani. Am comparat suprapunerea dintre arborele filogenetic bazat pe secvențele de COI și arborele filogenetic bazat pe citocromul b, din studiul lui Guicking et al. (2009). Am folosit în total 15 exemplare de *N. tessellata* (Imaginea 2).

Pentru a obține secvența parțială a genei COI, am folosit amorsele degenerate V1F/V1R, publicate de către Smith et al (2008).

Din cele 15 exemplare am recuperat 8 haplotipuri. Haplotipurile sunt prevăzute cu numere de acces de la NCBI, în textul următor: A (JN871603): Ro1 - Ro5, Ser1, Ser2; B (JN871604): Ser3; C (JN871605): Ita; D (JN871606): Gr3 , E (JN871607): Ukr1, Ukr2; F (JN871608): Ukr3; G (JN871609): Gr1; H (JN871610): GR2 (Imaginea 2).

Alinierea secvențelor de 621 bps lungi, a arătat 48 de poziții variabile între haplotipuri.



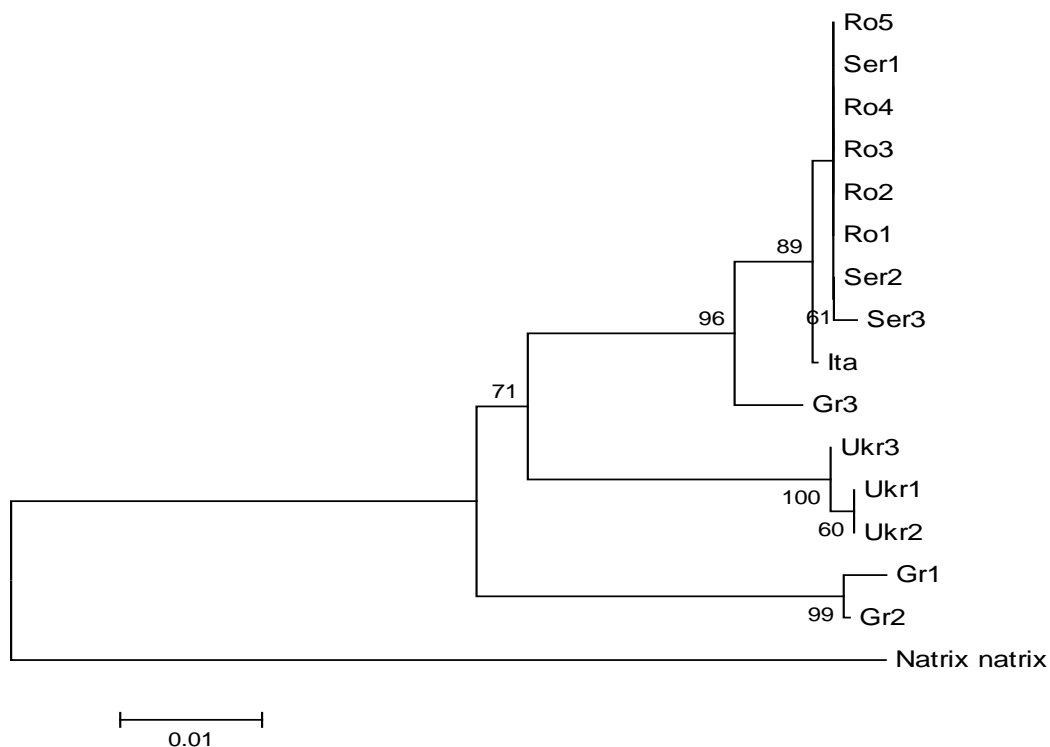
**Imaginea 2:** Haplotipuri identificate.

Cele mai mari valori de divergență genetică între secvențe s-au găsit pentru secvențele Gr1 și Ukr1-2 (0.056) și, în general, cele mai mari valori au fost între haplotipurile Gr1, Gr2 și între restul secvențelor, sugerând poziția bazală a haplotipurilor din Grecia (Tabelul 6).

**Tabelul 6:** Valorile estimate de divergență genetică între haplotipuri, după modelul Kimura 2-parameter.

Gr1														
Gr2	0.003													
Gr3	0.052	0.050												
Ita	0.052	0.050	0.013											
Ro1	0.054	0.052	0.011	0.002										
Ro2	0.054	0.052	0.011	0.002	0.000									
Ro3	0.054	0.052	0.011	0.002	0.000	0.000								
Ro4	0.054	0.052	0.011	0.002	0.000	0.000	0.000							
Ro5	0.054	0.052	0.011	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000						
Ser1	0.054	0.052	0.011	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
Ser2	0.054	0.052	0.011	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
Ser3	0.056	0.054	0.013	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002			
Ukr1	0.056	0.054	0.040	0.043	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.047		
Ukr2	0.056	0.054	0.040	0.043	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.047	0.000	
Ukr3	0.054	0.052	0.038	0.042	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.045	0.002	0.002

Analiza filogenetică a secvențelor de *N. tessellata* indică 3 grupuri majore (Fig. 10). Un grup este format din secvențele din Ucraina, iar un alt grup din haplotipurile Gr1 și Gr2 secvențe care sunt din partea continentală a Greciei. A fost surprinzător faptul că haplotipuri îndepărtate spațial se grupează împreună (proba Gr3 de pe insula Creta cu restul secvențelor din România, Italia și Serbia), dar rezultatele noastre sunt în concordanță cu rezultatele lui Guicking et al. (2009), care s-au bazat pe gena citocrom b. Potrivit acestui studiu, colonizarea Greciei și a Europei a avut loc în două valuri, haplotipurile Gr1 și Gr2 sunt din prima colonizare și au supraviețuit izolat, de la începutul Pliocenului. Europa Centrală și de Vest a fost colonizat după ultima perioadă rece. Haplotipurile de *N. tessellata* din Ucraina formează un grup separat de haplotipurile din Europa și această topologie este, de asemenea, în concordanță cu constatările lui Guicking et al. (2009): partea de nord a Mării-Negre și habitatele nord-și est-Europene au fost colonizate din refugiul caucazian. Populația cea mai nordică și bine izolată de *N. tessellata* din Galichya Gora, pare a fi rezultatul unui eveniment de colonizare foarte recentă și rapidă. Timpul de izolare nu a fost suficient de lung pentru orice divergență genetică la nivelul genei COI.



**Figura 10:** Analiza filogenetică a celor 15 haplotipuri de *N. Tessellata*, după modelul Kimura 2-parameter și metoda maximum likelihood cu replici de 1000 bootstrap. Secvența de *Natrix natrix* (JN871611) a fost folosit pentru outgroup.

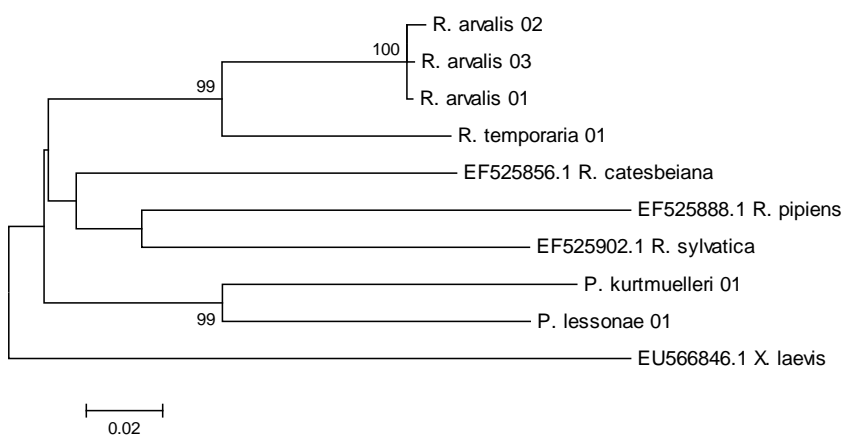


## 8. Comparație între filogenia bazată pe MHC și filogenia bazată pe COI

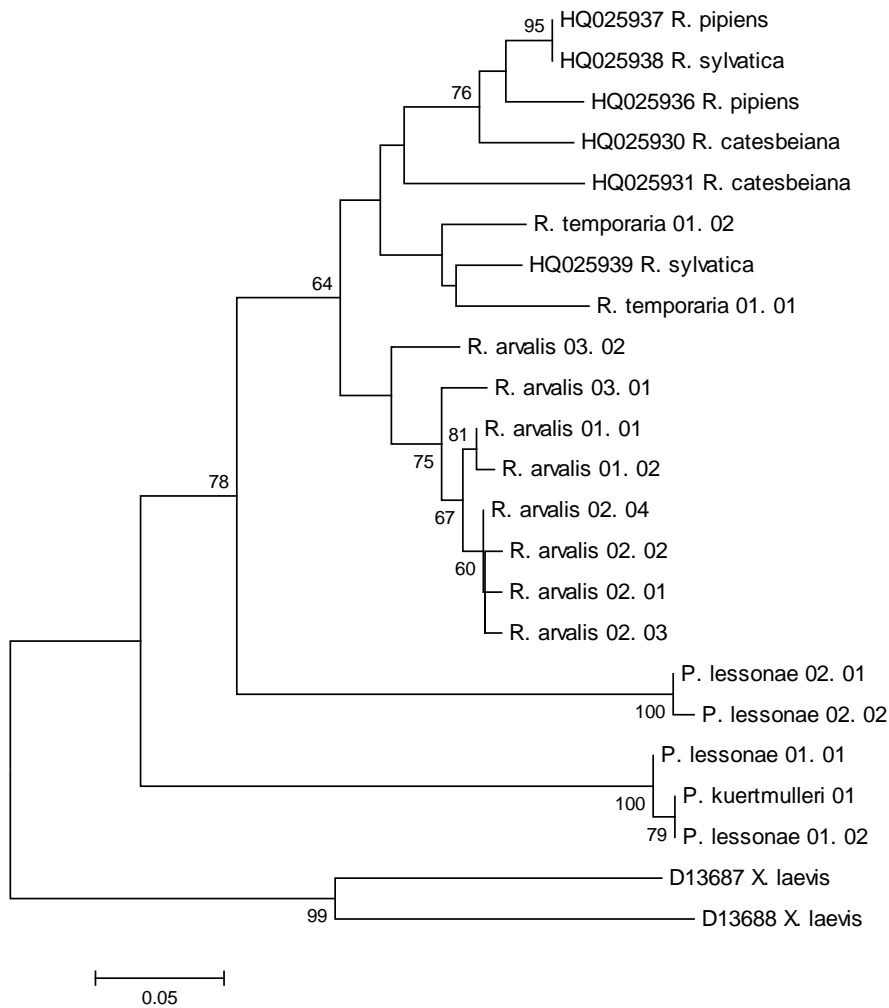
Având la dispoziție secvențele de MHC II B exon 2 și secvențele de COI de la speciile *Ranidae*, putem compara arborii filogenetici generați prin cele două tipuri de markeri moleculari. Acești arbori filogenetici au fost creați utilizând secvențele noastre recent identificate, împreună cu secvențele din baza de date NCBI. Secvențele recent identificate ale genelor MHC și COI provin de la aceleași exemplare, ceea ce nu este cazul pentru secvențele de la NCBI.

Secvențele de COI formează 3 grupuri separate. Un grup este pentru speciile *Rana* din Europa, un grup format din speciile de *Rana* din Lumea Nouă și un grup pentru speciile *Pelophylax* (broaște verzi). Secvențele de *Pelophylax* sunt bazale pentru secvențele broaștelor brune (*Rana*), care indică faptul că separarea în broaște verzi și broaște brune a precedat separarea între broaștele brune din Europa și America (Fig. 11).

Arborele filogenetic pe baza secvențelor MHC pare a fi ușor diferit. Alelele de *R. arvalis* se grupează împreună și sunt cele mai apropiate de alelele de *R. temporaria*. Alelele MHC de la speciile *Rana* din Lumea Nouă, de asemenea, se grupează împreună, cu excepția unei alele de *R. sylvatica*, care se grupează împreună cu alelele de *R. temporaria*. Polimorfismul trans-specific se observă între secvențele din America, alelele de la o specie se grupează între alelele altor specii. Acest fenomen nu apare între secvențele aparținând broaștelor verde și secvențele broaștelor brune, care de asemenea se grupează separat. Ca și în cazul secvențelor COI, secvențele de *Pelophylax* sunt la baza secvențelor de *Rana* (Fig. 12).



**Figura 11:** Analiza filogenetică a secvențelor COI, după modelul Kimura 2-parameter și metoda maximum likelihood cu replici de 1000 bootstrap.



**Figura 12:** Analiza filogenetică a secvențelor MHC II B exon 2, după modelul Kimura 2-parameter și metoda maximum likelihood cu replici de 1000 bootstrap.

Ipoteza noastră este că secvențele genei MHC pot fi mai eficiente în analizele filogenetice, atunci când cunoaștem majoritatea alelelor de la speciile țintă. Atunci când avem mai multe alele putem diferenția între alelele specifice speciei și alelele comune între specii. În timp ce alelele specifice speciei ajută la identificarea speciilor, alelele comune indică faptul că acele specii care împărtășesc alele comune sunt mai apropiate filogenetic, decât speciile care nu împărtășesc alele comune. Rezultatele noastre sunt conforme cu constatările lui Berggren et al. (2005): utilizarea alelelor MHC, împreună cu markeri mitocondriali ne permite să tragem concluzii mai detaliate cu privire la filogenia speciilor.

## Concluzii

1. Secvențele parțiale de MHC II B exon 2 la șarpele de apă (*Natrix tessellata*) și la șarpele de casă (*Natrix natrix*) arată plimorfism trans-specific (trans-species polimorphism). Există alele comune între specii diferite.

Șarpele de casă are cel puțin doi loci MHC II B, 4 alele au fost identificate la un singur exemplar și aceste alele se grupează separat în arborele filogenetic. Doi loci MHC pot fi preziși și pentru șarpele de apă, deoarece cele două alele identificate se grupează în diferite grupuri.

Secvența MHC clasa II B exonul 2, la șerpi are o variabilitate ridicată, la o lungime de 77 bps am găsit 28 de poziții de nucleotide variabile.

2. Secvențele parțiale de MHC II B exon 2 la speciile *Ranidae*, de asemenea, prezintă fenomenul: trans-species polimorfism. Alelele sunt partajate în cadrul speciilor din genul *Rana* dar nu și între speciile genurilor *Rana* și *Pelophylax*.

Genomul speciei *Rana arvalis* are cel puțin doi loci MHC II B, la un individ s-au identificat 4 alele. Pentru specia *Pelophylax lessonae* de asemenea presupunem cel puțin doi loci, pentru că diferențele genetice între cele două grupuri de alele de *P. lessonae*, au valori ridicate.

Pentru *R. arvalis* rata de mutații nonsinonimă a fost semnificativ mai mare decât rata de mutații sinonime în pozițiile ABS (antigen binding sites, situs de legare al antigenelor). Acest mod de substituție este în concordanță cu evoluția caracteristică a genelor MHC, care prezice o selecție pozitivă în pozițiile ABS.

3. Arborele filogenetic al speciilor *Ranidae* pe gene COI (citocromoxidază subunitatea I) are o topologie asemănătoare cu arborele filogenetic al secvențelor 16S rARN. Secvențele COI ale speciilor genului *Rana* din Europa formează un grup separat de secvențele speciilor din genul *Rana* din America. Speciile genului *Pelophylax* formează un grup distinct de speciile genului *Rana* și ocupă o poziție bazală în arborele filogenetic. Potrivit secvențelor COI, divergența între broaștele verzi (*Pelophylax*) și broaștele brune (*Rana*) a avut loc mai devreme decât divergența între speciile genului *Rana* din Europa și Lumea Nouă.

4. Studiul filogeografic pe baza genei COI la broasca brună de pădure (*Rana dalmatina*) a evidențiat o variabilitate genetică scăzută a populațiilor din România și Bazinul Carpatic. Au fost identificate 9 alele.

Munții Carpați nu reprezintă o barieră fizică pentru fluxul de gene și pentru răspândirea acestei specii.

Se pare că există un refugiu criptic al speciei, între valea râului Olt și Carpații Meridionali. În comparație cu celelalte regiuni din eșantion, această regiune arată o diversitate alelică ridicată.

5. Analiza a două populații de tritoni alpini (*Mesotriton alpestris*) din Munții Apuseni și din Carpații Meridionali a relevat un refugiu criptic în Munții Apuseni.

Populația de altitudine mare, din Carpații Meridionali este omogenă, ceea ce indică efectul fondator, iar populația de altitudine joasă are 4 alele.

6. Analiza filogeografică a șarpelui de apă (*Natrix tessellata*) din Europa de Est și de pe Balcani indică 3 grupuri majore și 8 haplotipuri diferite de COI (citocromoxidază subunitatea I). Un grup este format de speciile din România, Serbia și Creta, un alt grup de probele din Ucraina și al treilea grup este format din probele din Peninsula Balcanică. Secvențele din Peninsula Balcanică (Thessalia) sunt bazale pentru celelalte secvențe, confirmând faptul că colonizarea Europei a avut loc în două etape. Populația prezentă a Cretei și a Europei de Est provine din al doilea val de colonizare.

7. Utilizarea alelelor MHC (marker nuclear), împreună cu alelele COI (marker mitocondrial) contribuie la o analiză filogenetică și sistematică mai detaliată a speciilor, deoarece cele două tipuri de markeri se completează reciproc. Arborele filogenetic bazat pe COI este similar cu arborele filogenetic bazat pe MHC, deși cele două tipuri de markeri sunt supuse unor forțe evolutive diferite.

## Bibliografie selectivă

Babik W, Branicki W, Sandera M, Litvinchuk S, Borkin L J, Irwin J T, and Rafiński J. 2004. Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology*, 13(6): 1469-1480

Berger L, Speare R, Daszak P, Green D E, Cunningham A A, Goggin C L, Slocombe R, Ragan M A, Hyatt A D, McDonald K R, Hines H B, Lips K R, Marantelli G, Parkes H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:9031–9036

Berggren K T, Ellegren H, Hewitt G M and Seddon J M. 2005. Understanding the phylogeographic patterns of European hedgehogs, *Erinaceus concolor* and *E. europaeus* using the MHC. *Heredity*, 95:84-90

Frost D R, Grant T, Faivovich J, Bain R H, Haas A, Haddad C F B, et al. 2006. The amphibian tree of life. *Bull Am Mus Nat Hist*, 297:1–370

Granoff A 1989. Viruses of Amphibia: an historical perspective. Pp 3-12, *Viruses of Lower Vertebrates* Ahne W and Kurstak E eds, Springer-Verlag, Berlin

Guicking D, Joger U, Wink M. 2009. Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR-PCR fingerprinting. *Org Divers Evol*, 9: 201-214

Hauswaldt J S, Stuckas H, Pfautsch S and Tiedemann R. 2007. Molecular characterization of MHC class II in a nonmodel anuran species, the fire-bellied toad *Bombina bombina*. *Immunogenetics*, 59:479-491

Hedrick P W. 2003. The major histocompatibility complex (MHC) in declining populations: an example of adaptive variation. Pp 97-113, *Reproduction Science and Integrated conservation*, Holt W V, Pickard A R, Rodger J C and Wildt D E eds, Cambridge Univ. press, Cambridge, UK

Kelley J, Walter L, Trowsdale J. 2005. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics*, 56:683-695

Klein J, Sato A, Nagl S, O'hUigin C. 1998. Molecular trans-species polymorphism. *Annu Rev Ecol Syst*, 29:1-21

Palumbi S R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. Pp 205-247, *Molecular Systematic*, Hillis D M, Moritz C and Mable B K eds, Sinauer & Associates Inc, Sunderland

Penn D J and Ilmonen P. 2005. Major histocompatibility complex. *ELS*, 1-7

Penn D J. 2002. The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology*, 108:1-2

Smith M A, Poyarkov N A Jr and Hebert P D N. 2008. DNA BARCODING: CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Mol Ecol Resour*, 8:235-246

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A G and Cossons J.-F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol Eco*, 7:453-464

Teacher A G F, Garner T W J and Nichols R A. 2009. European phylogeography of the common frog (*Rana temporaria*): routes of postglacial colonization into the British Isles, and evidence for an Irish glacial refugium. *Heredity*, 102(5): 490-496

Teacher A G, Cunningham A A, Garner T W. 2010. Assessing the long-term impact of ranavirus infection in wild common frog populations. *Biol Cons*, 13:514-522

Tong J, Bramson J, Kanduc D, Chow S, Sinha A A and Ranganathan Sh. 2006. Modeling the bound conformation of *Pemphigus Vulgaris*-associated peptides to MHC Class II DR and DQ Alleles. *Immunome Research*, 2:1

Veith M, Kosuch, J, Vences M. 2003. Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Mol Phylogenet Evol*, 26(2): 310-27

Waugh J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29: 188–197

Wood L R, Griffiths R A, Schley L. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Luxembourg. *Bull Soc Nat Luxemb*, 110:109-114

Zeisset I, Beebee J C. 2009. Molecular characterization of major histocompatibility complex class II alleles in the common frog, *Rana temporaria*. *Mol Ecol Resour*, 9:738-745

## **Lista articolelor publicate**

Béla Marosi, Tibor Sós, Ioan V. Ghira, Annette Damert and Octavian Popescu. 2010. Identification of COI partial sequences in two closely related frog species, *Rana dalmatina* and *Rana temporaria*. Herpetologica Romanica. Vol.4. (<http://herpetofauna.uv.ro/herprom-vol4.html>)

Béla Marosi, Ioan V. Ghira, Tibor Sós and Octavian Popescu. 2011. Identification of partial MHC class II B exon 2 sequences in two closely related snake species: *Natrix tessellata* and *Natrix natrix*. Herpetologica Romanica. In press

## **Participări la conferințe**

Béla Marosi, Octavian Popescu, Annette Damert, Ioan V. Ghira. 2009. MHC (major histocompatibility complex) genek a kockas siklonal - Gene MHC la sarpele de apa. Conferinta X. RODOSZ

Béla Marosi, Karen M. Kiemnec-Tyburczy, Ioan V. Ghira, Tibor Sos and Octavian Popescu. 2011. Identification and characterization of major histocompatibility complex class IIB alleles in three species of European ranid frogs. MCCMB'11 (5<sup>th</sup> Moscow Conference on Computational and Molecular Biology)