



Cofinanțat de
Uniunea Europeană



DELTAICA NR. 8, 2025
TULCEA, ROMANIA

MINISTERUL INVESTIȚIILOR ȘI PROIECTELOR EUROPENE ÎN
CALITATE DE AUTORITATE DE MANAGEMENT PENTRU
PROGRAMUL DEZVOLTARE DURABILĂ

SMIS 2021 321108

"DEZVOLTAREA STAȚIEI DE MONITORIZARE A PEȘTELOR
MIGRATORI: STURIONI ȘI SCRUMBIE – ISACCEA"

DELTAICA

BULETIN DE INFORMARE ȘTIINȚIFICĂ

"EVALUAREA GENETICĂ A
STURIONILOR UTILIZAȚI ÎN
PROGRAMELE DE REPOPULARE,
ÎN DUNĂREA INFERIOARĂ"

AUTORI: CIORPAC MITICĂ,
HOLOSTENCO DANIELA- NICOLETA,
SIMIONOV ANA, MIHAI COSMIN-
TEODOR, MARTA ANATOLIE, STACHE
ALEXANDRU BOGDAN, TAFLAN ELENA,
POREA DANIELA, GORGAN DRAGOS-
LUCIAN



STATIESTURIONI.DDBRA.RO



Cofinanțat de
Uniunea Europeană



DELTAICA nr. 8, 2025
Tulcea, Romania

MINISTERUL INVESTIȚIILOR ȘI PROIECTELOR EUROPENE în calitate de Autoritate de
Management pentru Programul Dezvoltare Durabilă

smis 2021 321108

"DEZVOLTAREA STAȚIEI DE MONITORIZARE A PEȘTELOR MIGRATORI:
STURIONI ȘI SCRUMBIE – ISACCEA"

DELTAICA
DELTAICA

BULETIN DE INFORMARE ȘTIINȚIFICĂ

*Evaluarea genetică a sturionilor utilizați în programele de repopulare, în
Dunărea Inferioară*

Autori:

**Ciorpac Mitică, Holostenco Daniela- Nicoleta, Simionov Ana,
Mihai Cosmin-Teodor, Marta Anatolie, Stache Alexandru Bogdan, Taflan Elena,
Porea Daniela, Gorgan Dragos-Lucian**

<https://statiesturioni.ddbra.ro>



Cofinanțat de
Uniunea Europeană



MINISTERUL INVESTIȚIILOR ȘI PROIECTELOR EUROPENE în calitate de Autoritate de Management
pentru Programul Dezvoltare Durabilă,

Cod apel: PDD/175/PDD_P2/OP2/RSO2.7/PDD_A15

Cod proiect: 321108

Titlu Proiect: **Dezvoltarea Stației de monitorizare a peștilor migratori: sturioni și scrumbie – Isaccea**

Titlu Apel: Conservarea biodiversității pentru a îndeplini cerințele directivelor de mediu - Proiecte etapizate

Beneficiar: ADMINISTRAȚIA REZERVAȚIEI BIOSFEREI DELTA DUNĂRII TULCEA

Partener 1: INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE "DELTA DUNĂRII"-I.N.C.D.D.D. TULCEA

Activitatea A.4. Acțiuni de conștientizare și informare suplimentară

Subactivitatea A.4.1. Buletin de informare

Date de Contact:

Administrația Rezervației Biosferei Delta Dunării

Website: <http://www.ddbra.ro>

<https://www.facebook.com/ARBDD>

© 2025, Editura Centrul de Informare Tehnologică Delta Dunării Tulcea, Romania

Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare Delta Dunării

Website: <http://www.ddni.ro/>

<https://www.facebook.com/INCDDD>

https://twitter.com/ddni_ddtic

Bun de tipar: iunie 2025

Editura CITDD Tulcea

Tiraj: 50

DELTAICA: ISSN 2286-0889



Introducere

Sturionii reprezintă un grup de pești care a apărut cu aproximativ 200 de milioane de ani în urmă, în Jurasic și care a reușit să supraviețuiască unor extincții în masă și câtorva glaciațiuni. Prezentând o evoluție desfășurată pe milioane de ani și având un ritm de evoluție lent, sturionii sunt considerați pești primitivi, adevărate "fosile vii", cu o deosebită importanță științifică. Aceștia reprezintă un model de studiu pentru evoluția peștilor în special, dar și a vertebratelor, în general (Grande and Bemis, 1991; Bemis et al., 1997; Krieger and Fuerst, 2002).

Sturionii (Acipenseridele) sunt pești marini de talie mare, cu schelet cartilaginos-osos, care trăiesc în special în Marea Neagră și Marea Caspică (cu excepția cegii). Sunt foarte rar întâlniți în Europa de Vest. Sunt importanți din punct de vedere economic pentru icrele și carnea lor. În sezonul de reproducere, sturionii părăsesc mediul marin și migrează în apele dulci ale fluviilor și râurilor bazinului hidrografic al acestora unde își depun icrele. Din cele șase specii de sturioni care se reproduceau în trecut în Dunăre, în prezent se mai reproduc doar patru specii: *Acipenser gueldenstaedtii* (nisetrul), *Acipenser stellatus* (păstruga), *Acipenser ruthenus* (cega), *Huso huso* (morunul), speciile *Acipenser nudiiventris* (viza) și *Acipenser sturio* (șipul) sunt declarate extinse în bazinul Dunării. Cele patru specii se regăsesc pe lista roșie a IUCN marcate ca fiind specii critic periclitare (excepție făcând cega, marcată ca specie periclitată). Sturionii se recunosc după trăsăturile speciale ale acestui grup de pești: scheletul cartilaginos-osos, lipsa solzilor și prezența unor discuri osoase pe piele, sub formă de șiruri dispuse de-a lungul corpului. Din punct de vedere filogenetic și al diversității genetice a populațiilor de sturioni, acest grup - special de pești cu schelet cartilaginos-osos a fost anterior studiat în Georgia (Beridze et al., 2022), Iran (Ghasemi et al., 2005; Khoshkholgh et al., 2011), China (Zhao et al., 2005; Zhang et al., 2013; Shen et al., 2020), America de Nord (Walsh et al., 2001; Moyer et al., 2012; O'Leary et al., 2014; Estep et al., 2020; Sellheim et al., 2022), în bazinul superior al Dunării (Austria și Germania – Friedrich et al., 2022), bazinul inferior al Dunării (România – Dudu et al., 2014; Holostenco et al., 2021), în bazinele ponto-caspic și adriatic (Boscari et al., 2021).

În vederea protejării sturionilor, s-au adoptat măsuri de conservare. S-a interzis prin lege pescuitul în scop comercial al speciilor de sturioni din habitatele naturale de pe teritoriul României pentru o perioadă de 10 ani începând din 2006, a fost apoi prelungită pentru încă cinci ani, pentru ca ulterior să fie prelungită pe termen nelimitat până la refacerea populațiilor sălbatice de sturioni. Sunt interzise atât comercializarea produselor provenite de la sturioni capturați din bazinele naturale ale Dunării și Mării Negre, cât și folosirea echipamentelor de capturat sturioni în zonele de pescuit din habitatele piscicole naturale.

De asemenea, au fost demarate programe de refacere a populațiilor de sturioni. Acestea vizează reproducerea artificială a genitorilor sălbatici capturați din Dunăre, urmată de creșterea puietului obținut pe această cale în ferme de piscicultură. Ulterior, puietul este utilizat fie pentru acțiuni de repopulare a mediului natural, fie pentru obținerea cării și a caviarului de acvacultură (Muscalu and Muscalu, 2009; Bronzi and Rosenthal, 2014). Astfel, se urmărește descurajarea braconajului și a pescuitului de sturioni sălbatici, ceea ce ar permite refacerea populațiilor de sturioni din mediul natural și conservarea speciilor.

În astfel de situații, acvacultura reprezintă o măsură de conservare a speciilor periclitare ce urmărește creșterea de puiet pe cale artificială, cu scopul fie de a repopula mediul natural, fie de a obține caviar de acvacultură. În crescătorii se utilizează un număr limitat de indivizi în programele de reproducere, întrucât capturile de indivizi sălbatici sunt reduse. În consecință, pericolul consangvinizării este crescut în piscicultura sturionilor și prin urmare, se urmărește menținerea unui nivel crescut de diversitate genetică a juvenilor obținuți în acvacultură.

Toate organismele sunt predispușe la apariția mutațiilor. Acestea pot fi cauzate fie de deficiențe în procesele fiziologice de reparare a erorilor survenite în replicarea ADN, fie de expunerea la anumiți factori de mediu. Mutațiile conduc la apariția variației genetice, denumită polimorfism. Alături de alte forțe evolutive precum selecția naturală și deriva genetică, apariția mutațiilor determină creșterea diferențierii genetice în cadrul unei populații, specii sau altui taxon superior. Cu ajutorul markerilor moleculari se poate evalua unicitatea genetică la nivel de individ, populație sau specie (Avice, 1995; Park and Moran, 1995).

Un marker molecular reprezintă un fragment de ADN specific situat într-o anumită locație din cadrul genomului, care este folosit pentru a identifica un individ sau o specie (http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_marker). O altă definiție a markerului molecular este că acesta reprezintă o secvență specifică de ADN, cu locație cunoscută în genom, care marchează poziția unei gene particulare sau modul de transmitere al unui caracter particular.

Markerii moleculari se împart în: markeri ADN nucleari și markeri ADN mitocondriali și ambele tipuri permit evaluarea variației genetice în cadrul întregului genom.

Markerii moleculari se clasifică în markeri de tipul I, asociați cu gene cu funcție cunoscută, și markeri de tip II asociați cu regiuni necodante (Liu and Cordes., 2004).



Tehnicile de biologie moleculară sunt folosite pentru identificarea taxonomică precisă a indivizilor și înlăturarea confuziilor cauzate de încadrarea taxonomică strict pe baza caracterelor morfologice. De asemenea, analiza hibridizării și a introgresiei cu ajutorul markerilor moleculari permite identificarea hibridilor prin stabilirea identității genitorilor.

O altă aplicație a markerilor moleculari este identificarea populațiilor, evaluarea gradului de variabilitate genetică a acestora și a gradului de diferențiere interpopulațională și analiza fluxului de gene între populații. Markerii moleculari sunt utilizați și în analiza structurii unei populații, pentru a stabili dacă aceasta constituie o unitate distinctă sau este alcătuită din mai multe subpopulații.

Markerii ADN își găsesc aplicație în acvacultură venind în sprijinul programelor de reproducere artificială și repopulare. Aceștia sunt utilizați pentru a compara variația genetică a populației crescute în acvacultură cu cea a populației sălbatice. Se poate evalua gradul de consangvinizare a populațiilor de acvacultură în vederea planificării programului de reproducere (Wirgin et al., 1997; Chauhan and Rajiv., 2010).

Microsateliții sau repetiții ale unor secvențe simple (SSR) sau secvențe scurte repetitive în tandem (STR) reprezintă un marker molecular codominant care permite diferențierea din punct de vedere genetic a indivizilor homozigoți de cei heterozigoți pentru un locus specific. Aceste porțiuni de 1 – 6 pb sunt localizate în principal în genomul nuclear. Pentru speciile de sturioni, studiile anterioare menționate identifică o gamă variată de microsateliți sau se bazează pe analiza ADN-ului mitocondrial. În cadrul Institutului Național de Cercetare Dezvoltare "Delta Dunării" – Tulcea prin proiectul EraNet CsOFASP-DASTMAP s-au analizat aspecte metodologice ale analizei diversității genetice a populațiilor de sturioni din bazinul inferior al Dunării: *Acipenser gueldenstaedtii* (nisetru), *Acipenser stellatus* (păstruga), *Acipenser ruthenus* (cega), *Huso huso* (morunul).

Microsateliții sunt markeri de tip II doar dacă nu sunt asociați cu gene cu funcție cunoscută. Microsateliții reprezintă repetiții dispuse în tandem ale unei secvențe simple de ADN de 2 - 9 pb (Tautz, 1989). Se estimează că microsateliții apar o dată la fiecare 10 kb în genomul nuclear al peștilor (Wright, 1993). Acești markeri sunt distribuiți uniform în genom, fiind prezenți în toți cromozomii, atât în regiunile codificatoare, cât și în introni și secvențe din afara genelor (Liu and Cordes., 2004).

Polimorfismul microsateliților constă în diferențele de mărime datorate numărului variat de unități repetitive conținute de o alelă dintr-un locus particular. Polimorfismul microsateliților constă nu doar în numărul de repetiții, dar și în mărimea unității repetitive și în prezența sau absența unităților repetitive distincte. Numărul mare de alele per locus crește conținutul informațional polimorfic comparativ cu alți markeri ADN (Liu and Cordes., 2004). Gradul mare de polimorfism este cauzat de rata mare de mutație (10-2 per generație), atribuită unei "alunecări" a polimerazei în timpul replicării ADN (Tautz, 1989; Weber and Wong, 1993). Gradul mare de polimorfism inter- și intraspecific îi face să fie utili în evaluarea diferențierii genetice între indivizi strâns înrudiți (Chauhan and Rajiv., 2010).

Microsateliții sunt moșteniți într-o manieră mendeliană și sunt markeri codominanți (Liu and Cordes., 2004). Distribuția uniformă în genomul nuclear, abundența, mărimea redusă, codominanța și hipervariabilitatea sunt caracteristici care îi fac să fie markeri ideali pentru cartarea genomului și studii de genetică populațională (Dayanandan et al., 1998; Liu and Cordes, 2004).

Material și metodă

Prelevarea probelor biologice și izolarea ADN total

Activitatea de analiză genetică s-a concentrat asupra speciei *Acipenser gueldenstaedtii* (nisetru), cu scopul de a evalua diversitatea genetică în contextul conservării și al programelor de repopulare din bazinul Dunării.

Pentru această etapă a proiectului, materialul genetic a fost colectat de la un total de 96 de indivizi aparținând speciei *Acipenser gueldenstaedtii*, grupați după proveniență astfel:

- 10 indivizi sălbatici, capturați prin pescuit științific în Dunărea Inferioară, în cadrul proiectului (Activitatea A6.6 și A 7.1);
- 86 de puieti, obținuți din reproducerea controlată a reproducătorilor capturați în Dunărea Inferioară, și crescuți în condiții controlate.

Indivizii adulți capturați din mediul natural au fost utilizați pentru reproducere controlată, iar ulterior, în conformitate cu bunele practici și reglementările naționale privind conservarea sturionilor, au fost eliberați înapoi în Dunărea Inferioară, în același loc unde au fost capturați.



Pentru fiecare exemplar analizat, au fost înregistrați parametrii morfologici (lungimea totală și greutatea corporală), iar pentru analizele genetice au fost prelevate fragmente de țesut de la nivelul înotătoarei anale (Figura 1).

Probele de țesut au fost stocate individual în eprubete conținând alcool etilic absolut (99%) și păstrate la -20°C până la momentul extracției ADN-ului și al procesării moleculare în laborator.



Figura 1. Sturioni capturați în Dunărea Inferioară (adulți și puiet) de la care s-au prelevat probe biologice

Izolarea ADN-ului genomic total a fost realizată din probele de țesut prelevate, utilizând o metodă eficientă de extracție pe bază de coloane cu membrane de siliciu.

Pentru această etapă s-a utilizat kitul comercial NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel, Düren, Germania), conceput special pentru izolarea ADN-ului din materiale biologice complexe. Procedura s-a desfășurat conform instrucțiunilor producătorului și permite obținerea unor rezultate comparabile cu metodele clasice de extracție, cum ar fi protocoalele CTAB și SDS, asigurând în același timp o puritate ridicată a ADN-ului și o eliminare eficientă a inhibitorilor de reacție PCR.

Protocolul de lucru presupune procesarea unor cantități de până la 200mg de țesut, care sunt inițial mărunțite ultrafin și omogenizate mecanic cu ajutorul FASTPREP®-24 INSTRUMENT (MP Biomedicals) (Figura 2). Această etapă este esențială pentru maximizarea randamentului de extracție și pentru asigurarea uniformității probelor procesate.



Figura 2. Omogenizator FASTPREP®-24 INSTRUMENT, utilizat pentru liza mecanică și chimică a probelor de țesut

Protocolul standard de lucru s-a desfășurat conform instrucțiunilor producătorului și a inclus următorii pași principali:

1. **Liza mecanică și chimică a țesutului:** Aproximativ 200 mg de material biologic a fost mărunțit fin și omogenizat utilizând *omogenizatorul* FASTPREP®-24 INSTRUMENT (MP Biomedicals). Proba omogenizată a fost suspendată într-un tampon de liza specific (Buffer CF) la care s-a adăugat Proteinaza K urmat de incubare la 65°C, pentru eliberarea ADN-ului genomic;
2. **Inactivarea proteinelor și a contaminanților și legarea ADN-ului de membrana de siliciu:** Supernatantul a fost amestecat cu tamponul de legare (Buffer C4 și etanol) și aplicat apoi pe coloanele de purificare NucleoSpin®, unde ADN-ul s-a legat selectiv la membrana de siliciu în condiții de săruri ridicate. Probele au fost centrifugate pentru separarea fazei clare care conține ADN-ul;
3. **Spălarea coloanei:** Coloanele au fost spălate succesiv cu tampoanele CQW și C5, pentru a elimina proteinele, polizaharidele și alte impurități;
4. **Eluția ADN-ului purificat:** ADN-ul genomic a fost eluat într-un volum de 100 μL de tampon de eluție (BE), rezultând o probă de înaltă puritate, potrivită pentru aplicații moleculare sensibile (PCR, genotipare, secvențiere).

Probele de ADN obținute au fost ulterior evaluate calitativ și cantitativ prin spectrofotometrie (Nanodrop™) și verificate prin migrare în gel de agaroză 1%, pentru a confirma integritatea fragmentelor și absența contaminanților. Ulterior, eșantioanele au fost stocate la -20°C, în vederea utilizării ulterioare în reacțiile de amplificare PCR.

Amplificarea markerului mitocondrial și analiza secvențelor de nucleotide

Pentru analiza variabilității mitocondriale, s-a amplificat și secvențiat regiunea *D-loop* (regiunea de control, MT-CR) a ADN-ului mitocondrial, utilizând metoda PCR urmată de secvențiere enzimatică Sanger.

Pentru amplificare s-a utilizat perechea de primeri specifică sturionilor:

- Acip PHE 1F: 5'-CAC CCT TAA CTC CCA AAG C-3'
- Acip PHE 1R: 5'-CCC ATC TTA ACA TCT TCA GT-3'

Reacțiile PCR au fost realizate utilizând kitul GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, SUA), conform protocolului recomandat de producător. Amplificarea a fost efectuată într-un VeritiPro Thermal Cycler (Applied Biosystems), achiziționat prin proiect.



Compoziția amestecului de reacție și programul de amplificare termică sunt prezentate mai jos (Figura 3).

GoTaqGreen Flexi Buffer 5X	5
MgCl ₂	2,5
dNTPs mix	0,5
AcipPHE-1F	0,5
AcipPHE-1R	0,2
apa ultrapura	14,8
ADN	1
Total volum	25

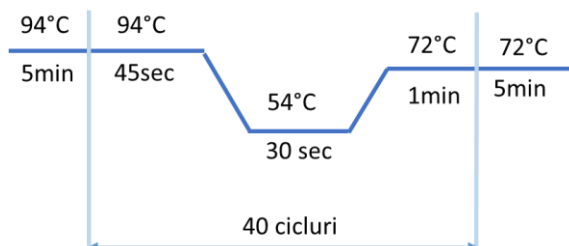


Figura 3. Compoziția amestecului de reacție și programul de amplificare termică pentru regiunea D-loop (MT-CR) din ADN mitocondrial

Produșii de amplificare au fost verificați prin electroforeză în gel de agaroză 1%, utilizând MidoriGreen (Nippon Genetics) pentru vizualizare. Separarea fragmentelor a fost realizată la 70V timp de 1 oră, iar benzile rezultate au fost vizualizate la un transiluminator UV ($\lambda = 302 \text{ nm}$). S-a confirmat prezența unui produs de aproximativ 823 pb în toate cele cinci probe analizate.

Produșii PCR pozitivi au fost purificați cu ajutorul kitului Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conform protocolului furnizorului. Produșii purificați au fost trimiși la Macrogen Inc., Olanda (<https://dna.macrogen-europe.com/eng/>) pentru secvențiere Sanger, realizată pentru ambele catene (forward și reverse).

Prelucrarea primară a secvențelor sub formă de fluorograme și corectarea acestora s-a realizat utilizând programul DNA Sequence Assembler (Heracle BioSoft, RO), datele fiind exportate în format. fasta pentru aliniere. Alinierea tuturor secvențelor unei gene, provenite de la indivizi diferiți, s-a realizat prin metoda ClustalW (Thompson et al., 1994) utilizând programul MEGA 11 (Kumar et al., 2018). Ulterior, alinierea secvențelor este utilizată pentru analiza populațională și filogenetică a indivizilor studiați.

Amplificarea microsateliților și analiza și genotiparea indivizilor analizați

Pentru amplificarea simultană a mai multor loci microsatelitari în reacții multiplex, au fost pregătite **patru panouri de primeri**, fiecare conținând câte trei perechi de primeri specifici, marcați cu fluorocromi diferiți (BMN-6, DY-751, Cyanine 5) (Tabel 1). Fiecare primer a fost diluat din soluția stoc de **100 μM** până la concentrația dorită, conform protocolului - de lucru (tabelul X), astfel încât concentrația finală a fiecărei perechi de primeri în mixul 10X să se situeze între **0.55% și 5%**, în funcție de eficiența fiecărui marker.

Tabel 1. Panelurile de primeri, fiecare conținând câte trei perechi de primeri specifici, marcați cu fluorocromi diferiți (BMN-6, DY-751, Cyanine 5), utilizate pentru amplificarea locilor satelitari la specia *Acipenser gueldenstaedtii*

Panel 1

Primer	Dye		V apă	Stoc [μM]	Conc. țintă	uL of stoc [100 μM]	C% 10x
Agu56	BMN-6	FW	208	100	0.200	3.00	2.00
		Rev	444	100	0.200	3.00	2.00
Agu51	DY-751	FW	232	100	0.180	2.70	1.80
		Rev	741	100	0.180	2.70	1.80
Agu38	BMN-6	FW	195	100	0.175	2.63	1.75
		Rev	908	100	0.175	2.63	1.75
Apă			2728			133.35	

Panel 2

Primer	Dye		V apă	Stoc [μM]	Conc. țintă	uL of stoc [100 μM]	C% 10x
Agu54	Cyanine 5	FW	264	100	0.055	0.83	0.55
		Rev	558	100	0.055	0.83	0.55
Agu36	DY-751	FW	205	100	0.195	2.93	1.95
		Rev	1334	100	0.195	2.93	1.95



DELTAICA nr. 8, 2025
Tulcea, România

Agu37	BMN-6	FW	223	100	0.195	2.93	1.95
		Rev	782	100	0.195	2.93	1.95
Apă			3366			136.65	

Panel 3

Primer	Dye		V apă	Stoc [uM]	Conc. țintă	uL of stoc [100uM]	C% 10x
Agu49	Cyanine 5	FW	352	100	0.075	1.13	0.75
		Rev	448	100	0.075	1.13	0.75
Agu15	DY-751	FW	230	100	0.500	7.50	5.00
		Rev	580	100	0.500	7.50	5.00
Agu59	BMN-6	FW	249	100	0.170	2.55	1.70
		Rev	860	100	0.170	2.55	1.70
Apa			2719			127.65	

Panel 4

Primer	Dye		V apă	Stoc [uM]	Conc. țintă	uL of stoc [100uM]	C% 10x
Agu34	BMN-6	FW	206	100	0.150	2.25	1.50
		Rev	515	100	0.150	2.25	1.50
Agu46	DY-751	FW	208	100	0.160	2.40	1.60
		Rev	547	100	0.160	2.40	1.60
Agu41	BMN-6	FW	225	100	0.180	2.70	1.80
		Rev	635	100	0.180	2.70	1.80
Apa			2336			135.30	

Volumul final al fiecărui mix (panel) a fost obținut prin adăugarea de **apă ultrapură** la volumele calculate din soluțiile stoc, iar amestecul rezultat a fost utilizat ca **10X Primer Mix** în reacțiile de PCR.

Pentru fiecare reacție (per godeu într-o placă de 96 de probe), s-a preparat un **Master Mix de 10 µL**, conținând componentele specificate în Tabelul 2

Tabel 2. Compoziția Master Mixului necesar pentru amplificarea locilor satelitari la specia *Acipenser gueldenstaedtii*

Componentă	Concentrație finală	Volum per well	Volum total (x110 reacții)
QIAGEN Multiplex PCR Buffer 2X	1X	5.00 µL	550 µL
Q-Solution 5X	0.75X	1.50 µL	165 µL
Primer Mix 10X (Panel 1–4)	1X	1.00 µL	110 µL
Apă ultrapură	—	1.50 µL	165 µL
ADN genomic [~10 ng/µL]	—	1.00 µL	adăugat individual
Total per reacție	—	10.00 µL	—

Mixul a fost distribuit în benzi de 8 tuburi (8-strip), câte **123.8 µL per strip**, apoi câte **9 µL** de Master Mix au fost adăugați în fiecare godeu din placa de reacție folosind pipeta multicanal. Ulterior, s-a adăugat **1 µL ADN genomic** per reacție.

Reacțiile PCR s-au efectuat în termociclere programate conform temperaturii optime de hibridizare stabilite anterior prin gradient de temperatură.

Programul standard a inclus:



1. Activare inițială a polimerazei: 95°C, 15 min
2. 30 de cicluri:
 - a. Denaturare: 94°C, 30 sec
 - b. Hibridizare: 60°C (57°C pentru panelul 4), 90 sec
 - c. Extensie: 72°C, 60 sec
3. Extensie finală: 72°C, 10 min
4. Păstrare: 4°C

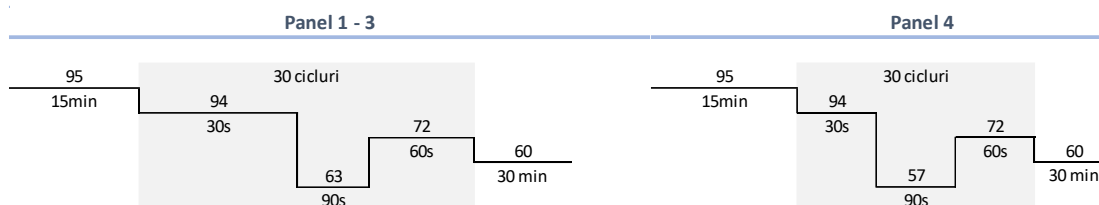


Figura 4. Reprezentarea grafică – amplificare termică PCR pentru cele 4 paneluri de primeri

După amplificare, produsele PCR au fost pregătite pentru electroforeză capilară pe platforma CEQ™ 8000 (Beckman Coulter), folosind modulul Fragment Analysis, conform pașilor specificați în Tabelul 3.

Tabel 3. Amestecul de reacție pentru fiecare produs PCR pregătit pentru electroforeza capilară

Componentă	Volum per reacție
SLS (Sample Loading Solution)	30 μ L
Marker intern de dimensiune (Size Standard 400)	0.75 μ L
Produs PCR	0.55 μ L
Total per well	31.3 μL

Amestecul a fost ulterior încărcat în placa de secvențiere și introdus în analizor.

După etapa de amplificare PCR, pentru fiecare eșantion au fost pregătite probele de migrare, prin adăugarea a 3 μ L de produs PCR într-un amestec format din 36,5 μ L de SLS (Sample Loading Solution) și 0,5 μ L de marker de dimensiune moleculară internă (Size Standard 400). Amestecul a fost transferat în placa de analiză și încărcat în sistemul de electroforeză capilară CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, California, SUA)

Sistemul CEQ 8000 funcționează pe principiul electroforezei capilare, în care fragmentele ADN denaturate migrează printr-un polimer sub influența unui câmp electric, iar viteza de migrare este direct dependentă de dimensiunea fragmentului (în perechi de baze). Fragmentul marcat cu fluorofor este excitat de un sistem cu laser intern, iar semnalul fluorescent emis este detectat optic și digitalizat, rezultând un electroferogramă pentru fiecare eșantion.

Pentru fiecare reacție multiplex, sistemul a permis identificarea simultană a mai multor loci microsatelitari, diferențiați atât prin dimensiunea fragmentelor amplificate, cât și prin spectrul de emisie al fluorocromilor utilizați. Detecția s-a realizat în modulul dedicat de Fragment Analysis, iar rezultatele au fost exportate în format tabelar (.xls) conținând informații precum: numele eșantionului, colorantul utilizat, fragmentul estimat (în pb), înălțimea și aria semnalului.

Analiza diversității genetice la nivel mitocondrial

Pentru evaluarea diversității mitocondriale, secvențele de nucleotide au fost utilizate pentru analiza populațională și filogenetică a indivizilor de nisetră studiați.

Distanțele genetice între indivizii folosiți la reproducerea asistată au fost estimate utilizând programul MEGA 11 (Kumar et al., 2016). Același program a fost utilizat pentru identificarea relațiilor filogenetice dintre indivizi. Această analiză s-a realizat prin metoda Maximum Likelihood (ML) pe baza modelului optim de substituție selectat prin algoritmul BIC (Bayesian Information Criterion), suportul topologic al arborelui s-a testat prin metoda bootstrap, pentru 500 de replicări. Vizualizarea și editarea grafică a arborelui filogenetic obținut, s-a



realizat în programul FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2012).

Analiza cronologică a divergenței (Real Time-timetree) a fost realizată utilizând același program MEGA 11. Această analiză oferă informații cruciale pentru înțelegerea istoriei evoluției filiațiilor materne.

Analiza diversității și structurii genetice la nivel nuclear

Prelucrarea datelor și determinarea alelelor în R

Datele brute obținute au fost ulterior procesate în mediul **R**, printr-un flux de analiză dedicat pentru **loci tetrasomici**, care permite detectarea a până la **patru alele distincte per locus și per individ**. Procesarea a inclus:

- **Separarea și curățarea datelor** (split sample ID, eliminarea fragmentelor cu semnal slab);
- **Filtrarea pe baza fluorocromilor și a ferestrelor de migrare** pentru identificarea corectă a fragmentelor per locus;
- **Binning-ul alelelor**, pe baza repetitivității secvenței (ex: motif din 2 pb), folosind funcții specializate (e.g. BinStats()) și binning personalizat;
- **Corelarea cu colorantul și markerul genetic**, având în vedere compatibilitatea dintre fluorofor și fereastra de detecție;
- **Construcția obiectelor genotipice** compatibile cu analiza poliploidă (ex: genambig din pachetul polysat), în care se stochează alelele identificate per individ și locus.

Această etapă a permis **identificarea exactă a profilului alelic** pentru fiecare individ analizat, precum și construirea unei baze de date de genotipuri utilizabile ulterior în analize de:

- diversitate genetică (H_e , H_o , N_a , alele private),
- structură populațională (STRUCTURE),
- echilibru Hardy–Weinberg și linkage disequilibrium.

Estimarea diversității genetice

Estimarea diversității genetice reprezintă o componentă esențială a analizelor geneticii populaționale a organismelor naturale. Indicii de diversitate genetică intra-populațională includ numărul de alele diferite per loc, variabilitate alelică, și heterozigotia așteptată (H_e) și observată (H_o). Analizele heterozigotiei sunt puternic corelate, dar heterozigotia așteptată (H_e) este considerată o estimare mai bună a variabilității genetice prezente într-o populație (Nei, 1987). Deoarece informația despre diversitatea genetică reprezintă abordarea cea mai fundamentală în genetica populațională empirică, numeroase programe sunt concepute pentru a furniza astfel de informații. Indicii de diversitate genetică pot fi calculați folosind programele AGARST, Arlequin, Cervus, DISPAN, FSTAT, GenAIEx, Genepop și Microsatellite Toolkit.

Estimarea diversității genetice a microsateliților ca număr total de alele, numărul de alele per locus (N_a), numărul de alele private per locus, heterozigotii așteptate (H_e) și observate (H_o) și abaterea de la echilibrul Hardy–Weinberg pentru fiecare grup au fost estimate folosind programul GenAIEx (Peakall & Smouse, 2006, 2012). Pentru a detecta asocieri non-aleatoare ale alelelor între mai multe loci, vor fi efectuate teste exacte pentru linkage disequilibrium folosind aplicația web GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008), obținându-se indici de diversitate genetică.

Testul echilibrului Hardy–Weinberg

Testul echilibrului Hardy–Weinberg (HWE) ar trebui efectuat ca un pas inițial al analizelor de genetică a populației. În conformitate cu principiul Hardy–Weinberg, frecvențele alelelor rămân constante într-o populație în absența selecției, mutației, migrației și a driftului genetic. Astfel, testele echilibrului Hardy–Weinberg investighează stabilitatea frecvențelor alelice în timp. Principiul Hardy–Weinberg se referă la efectele unei singure generații de împerechere aleatoare, unde frecvențele genotipurilor pot fi prevăzute din frecvențele alelelor. Se așteaptă ca HWE să fie prezent în populațiile în care împerecherea este aleatoare, iar o astfel de populație nu ar trebui să prezinte diferențe semnificative între heterozigozitatea observată și cea așteptată. Abaterea excesivă de la HWE indică încălcarea uneia dintre ipotezele analizelor de genetică a populației, prin procese precum împerecherea non-aleatoare sau lipsa neutralității selective. Cu toate acestea, abaterea semnificativă de la HWE poate să apară și din cauza erorilor fizice în timpul genotipării, cum ar fi alelele nule, iar datele trebuie interpretate cu prudență. Testele HWE și semnificația acestora pot fi efectuate cu ajutorul programelor Arlequin, FSTAT, GenAIEx și Genepop.



Măsurarea indicilor de fixare și diferențierea genetică între populații

Diferențierea genetică poate fi măsurată prin diferența distribuției frecvenței alelelor între populații. Informațiile despre indicii de fixare, cum ar fi statistica F , FIS , FIT și FST (Weir și Cockerham, 1984), per locus în toate populațiile, ar trebui să fie investigate în pasul inițial al analizelor de genetică a populației. O diferență semnificativă între heterozigozitatea observată și cea așteptată rezultă într-o valoare FIS semnificativă și poate indica prezența alelelor nule, efectul Wahlund sau alte anomalii. Valorile estimărilor FST sunt în intervalul 0–1 și măsoară cât de diferite, din punct de vedere genetic, sunt două populații la nivelul locilor neutri selectivi, cu o valoare FST de 0 indicând că nu a avut loc nicio diferențiere genetică și o valoare de 1 indicând că cele două populații nu împărtășesc genotipuri comune.

Analiza diferențierii genetice între populații folosind FST (o estimare a subdiviziunii populației sub modelul alelei infinite) și/sau a altor indici F (Weir și Cockerham, 1984) precum și a valorilor p asociate pot fi calculate cu ajutorul programelor Arlequin, FSTAT, GenAlEx, Genepop și multe altele. AGARST, FSTAT și RSTCALC pot calcula RST (o estimare a subdiviziunii populației pentru procesele de mutație pas cu pas). FSTAT poate furniza o valoare p ajustată pentru a obține niveluri de semnificație pentru analizele care implică comparații multiple.

Analiza fluxului genetic

Modelele și analiza fluxului genetic furnizează informații importante despre modelul și capacitatea de dispersie a speciei studiate. Estimările indirecte ale fluxului genetic între populații pot fi măsurate prin diferite abordări. În primul rând, se poate calcula fluxul genetic bazat pe structura genetică a populației în conformitate cu relația $Nem = (1 - FST) / 4 FST$ (27), unde Nem reprezintă numărul efectivului de migranți pe generație, Ne este dimensiunea efectivului populațional pentru fiecare populație, iar m este rata de imigrație. Această analiză clasică a fluxului genetic se bazează pe echilibrul dintre forțele de imigrație și driftul genetic sub presupunerile modelului insular, adică migrația are loc între populații de dimensiuni egale cu rate simetrice de migrație. Estimările în perechi ale diferențierii genetice între subpopulații și semnificația acestora pot fi cuantificate prin FST (Weir și Cockerham, 1984) și RST (Slatkin, 1985) utilizând programul FSTAT și RSTCALC.

În al doilea rând, estimările Maximum likelihood ale fluxului genetic au fost calculate utilizând abordarea de simulare coalescentă bazată pe Markov Chain Monte Carlo (MCMC), care ia în considerare relația genealogică a eșantioanelor și asimetria fluxului genetic (Beerli și Felsenstein, 1999; Beerli și Felsenstein, 2001). Parametrii necesari de migrație, cum ar fi $4N\mu$, unde μ este rata de mutație a unui locus per generație, și $M = m/\mu$, pot fi calculate cu ajutorul programului Migrate (Beerli și Felsenstein, 1999).

Rata de migrație poate fi, de asemenea, calculată din frecvența alelelor private. O alelă privată sau rară este definită ca o alelă găsită într-o singură subpopulație, care nu este găsită în alte subpopulații. Estimarea fluxului genetic folosind alele private a fost dezvoltată de Slatkin (1985b) pe baza următoarei ecuații: $\ln[p(1)] \approx a \ln(Nm) + b$, unde $a = -0,505$ și $b = -2,440$, iar $p(1)$ reprezintă frecvențele alelelor private. Prin urmare, logaritmul frecvenței așteptate a unei alele private ($p(1)$) este aproximativ o funcție liniară descrescătoare a logaritmului lui Nm , cu o pantă de $-0,505$ (Slatkin, 1985b).

Simularea a arătat că această metodă este relativ insensibilă la modificările parametrilor modelului, în afara de Nm și a numărului de indivizi eșantionați per populație, iar autorul a furnizat o modalitate aproximativă de corectare a diferențelor în dimensiunea eșantionului (Slatkin, 1985b). Prin urmare, se poate utiliza valoarea lui $p(1)$ pentru a estima Nm cu ajutorul programului Genepop.

Structura populației și unitățile de management

Structura populației a fost dedusă folosind STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) utilizând fișierul de date de input generat în programul de MS Excel GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2006). Numărul de clustere de K v-a fi calculat după următoarele setări: 10 repetiții pentru fiecare K de la $K=1$ la $K=10$ cu o perioadă de burn-in de 50.000 de iterații urmate de 100.000 de pași ai lanțului Markov Monte Carlo (MCMC), folosind un modelul admixture cu frecvențele alelelor independente între populații. Numărul clustere K v-a fi identificat folosind Structure Harvester (Earl, 2012), rezultatul grafic al structurii populației v-a fi ulterior generat folosind aplicația web CLUMPAK (Kopelman, Mayzel, Jakobsson, Rosenberg și Mayrose, 2015). La final se vor obține numărul real de clustere, unități de management în conservarea speciei și respectiv structura genetică a populației.

Rezultate și discuții

Pentru a evalua diversitatea genetică a loturilor implicate în popularea de susținere, au fost analizate două



grupuri distincte: (i) grupul „Dunăre” - indivizi sălbatici capturați din Dunăre ($n = 10$) și (ii) grupul “Reproducere” - descendenții grupului „Dunăre” (generația F1), obținuți prin reproducere asistată ($n = 86$). Analiza a fost realizată pe baza datelor mitocondriale și microsatelitare, considerând caracterul tetrasomic al locilor.

Analiza variabilității mitocondriale a indivizilor utilizați în reproducerea asistată

Pentru evaluarea diversității mitocondriale, a fost analizată secvența regiunii *D-loop* (MT-CR) la cinci indivizi adulți de *Acipenser gueldenstaedtii* din grupul „Dunăre”, utilizați în reproducerea asistată: o femelă (23-1-12-F) și patru masculi (23-1-2-M, 23-1-3-M, 23-1-5-M și 23-1-8-M). Analiza a inclus un total de 801 poziții nucleotidice și a fost realizată în MEGA11, folosind modelul Tamura 3-parameter (T92).

Distanțele genetice: Estimările distanțelor genetice (numărul de substituții per situs) au evidențiat o diferențiere clară între femela 23-1-12-F și toți ceilalți indivizi masculi, astfel evitându-se riscul consangvinizării. În contrast, distanțele între masculi au fost mult mai mici, cu valori între 0.005 și 0.060, ceea ce indică o apropiere genetică între aceștia (Figura 5).

	23-1-12-F	23-1-2-M	23-1-8-M	23-1-5-M	23-1-3-M
23-1-12-F	0.00000				
23-1-2-M	0.07527	0.00000			
23-1-8-M	0.08927	0.01387	0.00000		
23-1-5-M	0.07118	0.00501	0.01769	0.00000	
23-1-3-M	0.03189	0.04676	0.06022	0.04282	0.00000

Figura 5. Matricea de distanță genetică între adulții de nisetru utilizați la reproducerea asistată

Rezultatul reconstrucției filogenetice: Reconstrucția relațiilor evolutive, realizată prin metoda Maximum Likelihood, a confirmat poziția distinctă a femelei 23-1-12-F în arborele filogenetic. Aceasta formează un ram principal separat, bine susținut de lungimea ramurilor și log-likelihood-ul ridicat (-1488.36), demonstrând divergența sa față de ceilalți indivizi analizați (Figura 6).

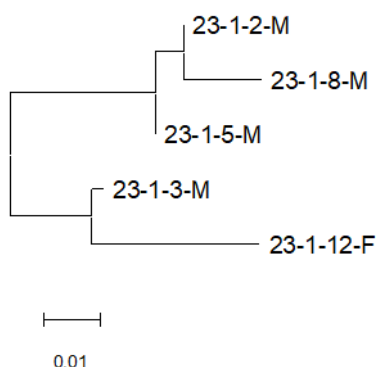


Figura 6. Relațiile filogenetice dintre reproducătorii de nisetru (*Acipenser gueldenstaedtii*) analizați. Topologia arborelui a fost estimată prin metoda ML pe baza modelului de substituție T92

Analiza cronologică a divergenței (RelTime – timetree): Arborele de tip timetree generat prin metoda RelTime a confirmat diferențierea semnificativă a femelei 23-1-12-F față de masculi, sugerând că aceasta provine probabil dintr-o linie maternă divergentă. Această distanțare genetică oferă garanții suplimentare

privind evitarea consangvinizării în cadrul reproducerii asistate (Figura 7).

Rezultatele analizei mitocondriale demonstrează în mod clar că **femelele 23-1-12-F este genetic distinctă față de cei patru masculi utilizați la reproducere**, aspect esențial pentru evitarea încrucișărilor între indivizi înrudiți matern. Diversitatea mitocondrială observată confirmă selecția riguroasă a reproducătorilor și susține validitatea schemei de reproducere asistată aplicate în cadrul programului de repopulare.

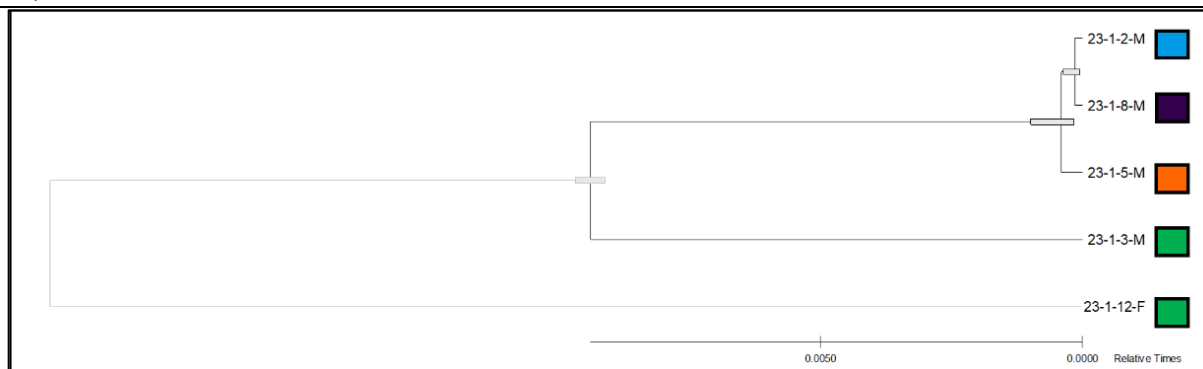


Figura 7. Analiza cronologică a divergenței pentru reproducătorii de nisetru (*Acipenser gueldenstaedtii*) analizați

Diversitatea genetică intra-populațională

Valoarea medie a numărului de alele diferite (N_a) a fost mai mare în grupul de puiet ($N=86$) rezultat din reproducere (7.75) comparativ cu lotul sălbatic ($N=10$) din Dunăre (6.00). Totuși, numărul mediu de alele efective (N_e), care reflectă diversitatea funcțională, a fost mai ridicat în grupul Dunăre (4.365) față de Reproducere (3.487), indicând o distribuție mai echilibrată a frecvențelor alelice în populația sălbatică. Indicele de informație Shannon (I), care surprinde atât bogăția cât și echilibrul frecvențelor alelice, a fost de asemenea mai mare în Dunăre (1.484) față de Reproducere (1.372). Heterozigozitatea observată (H_o) a avut valori apropiate între cele două grupuri: 0.738 pentru Dunăre și 0.740 pentru Reproducere, sugerând o frecvență similară a heterozigoților în cele două populații. Heterozigozitatea așteptată (H_e) și cea corectată (uHe) au fost ușor mai mari în populația sălbatică ($H_e = 0.714$, $uHe = 0.751$) față de Reproducere ($H_e = 0.674$, $uHe = 0.678$), indicând o ușoară reducere a diversității genetice în descendenți (Tabel 4).

Tabel 4. Indicii de diversitate genetică intra-populațională

Pop		N	N_a	N_e	I	H_o	H_e	uHe	F
Dunăre	Medie	10.000	6.000	4.365	1.484	0.738	0.714	0.751	-0.119
	SE	0.000	0.574	0.424	0.109	0.051	0.028	0.030	0.117
Reproducere	Medie	86.000	7.750	3.487	1.372	0.740	0.674	0.678	-0.167
	SE	0.000	0.781	0.272	0.091	0.056	0.024	0.024	0.118
Total	Medie	48.000	6.875	3.926	1.428	0.739	0.694	0.715	-0.143
	SE	5.543	0.496	0.257	0.071	0.038	0.019	0.020	0.082

N_a = No. of Different Alleles; N_e = No. of Effective Alleles = $1 / (\sum p_i^2)$; I = Shannon's Information Index = $-1 * \sum (p_i * \ln(p_i))$; H_o = Observed Heterozygosity = No. of Hets / N ; H_e = Expected Heterozygosity = $1 - \sum p_i^2$; uHe = Unbiased Expected Heterozygosity = $(2N / (2N-1)) * H_e$; F = Fixation Index = $(H_e - H_o) / H_e = 1 - (H_o / H_e)$. Where p_i is the frequency of the i th allele for the population & $\sum p_i^2$ is the sum of the squared population allele frequencies.

Alele private și comune

Numărul de alele private (unice pentru o singură populație) a fost semnificativ mai mare în grupul „Reproducere” (2.792), comparativ cu grupul „Dunăre” (1.042), ceea ce poate reflecta existența unor alele rare apărute prin recombinare sau segregare în timpul reproducerii asistate (Tabel 5). Niciuna dintre populații nu a prezentat alele comune locale frecvente (<25% sau <50%), sugerând un nivel relativ înalt de omogenitate locală.



Tabel 5. Numărul de alele private în cele două grupuri analizate

Population	Na	Na Freq. $\geq 5\%$	No. Private Alleles	No. LComm Alleles ($\leq 25\%$)	No. LComm Alleles ($\leq 50\%$)
Grupul "Dunare"	6.000	6.000	1.042	0.000	0.000
Grupul "Reproducere"	7.750	3.750	2.792	0.000	0.000

Na = No. of Different Alleles; **Na (Freq $\geq 5\%$)** = No. of Different Alleles with a Frequency $\geq 5\%$; **No. Private Alleles** = No. of Alleles Unique to a Single Population; **No. LComm Alleles ($\leq 25\%$)** = No. of Locally Common Alleles (Freq. $\geq 5\%$) Found in 25% or Fewer Populations; **No. LComm Alleles ($\leq 50\%$)** = No. of Locally Common Alleles (Freq. $\geq 5\%$) Found in 50% or Fewer Populations

Statistici F și fluxul de gene (Nm)

Valorile negative ale indicilor Fis (-0.142) și Fit (-0.126) reflectă un exces de heterozigoți față de așteptările Hardy-Weinberg la nivelul grupurilor analizate. Valoarea Fst obținută (0.018) indică o distanță genetică scăzută între cele două grupuri, sugerând o diferențiere populațională redusă (Tabel 6). Această valoare este susținută de estimarea fluxului genic Nm = 9.299, ceea ce denotă un schimb genetic ridicat între cele două grupuri, datorat selecției dirijate în cadrul programului de reproducere.

Tabel 6. Statistici F și fluxul de gene (Nm)

All Pops.	Fis	Fit	Fst	Nm
Medie	-0.142	-0.126	0.018	9.299
SE	0.115	0.116	0.003	1.558

$Fis = (Mean\ He - Mean\ Ho) / Mean\ He$; $Fit = (Ht - Mean\ Ho) / Ht$; $Fst = (Ht - Mean\ He) / Ht$; $Nm = [(1 / Fst) - 1] / 4$

Identitatea genetică (Nei)

Coeficientul de identitate genetică Nei între cele două grupuri este ridicat (0.913), ceea ce indică un grad înalt de similaritate genetică între indivizii sălbatici și cei obținuți din programul de repopulare, subliniind eficiența selecției reproducătorilor în menținerea diversității genetice naturale.

Acești indicatori arată că, deși lotul obținut prin reproducere asistată prezintă o diversitate genetică comparabilă cu populația sălbatică, se observă o ușoară tendință de scădere a alelelor efective și a echilibrului între frecvențele alelice, aspecte ce trebuie monitorizate în continuare în programele de conservare.

Structura populației și unitățile de management

Pentru a investiga structura genetică a populației de *Acipenser gueldenstaedtii*, au fost rulate analize STRUCTURE 2.3.4 folosind un model fără amestec (no admixture) și frecvențe corelate între populații, cu estimarea automată a parametrului lambda. Au fost testate valori ale numărului de clustere genetice (K) între 1 și 10, cu 10 rulări independente pentru fiecare K, folosind un burn-in de 5000 pași și 20,000 pași MCMC ulteriori.

Evaluarea valorii optime K a fost realizată cu ajutorul CLUMPAK, prin metodele Evanno și Pritchard, pe baza valorilor log-likelihood și a stabilității între rulări. Rezultatele (Figura 8) au indicat:

- Evanno: K=4 (DeltaK maxim = 10.20)
- Pritchard: K=6 (probabilitate maximă de 0.973)

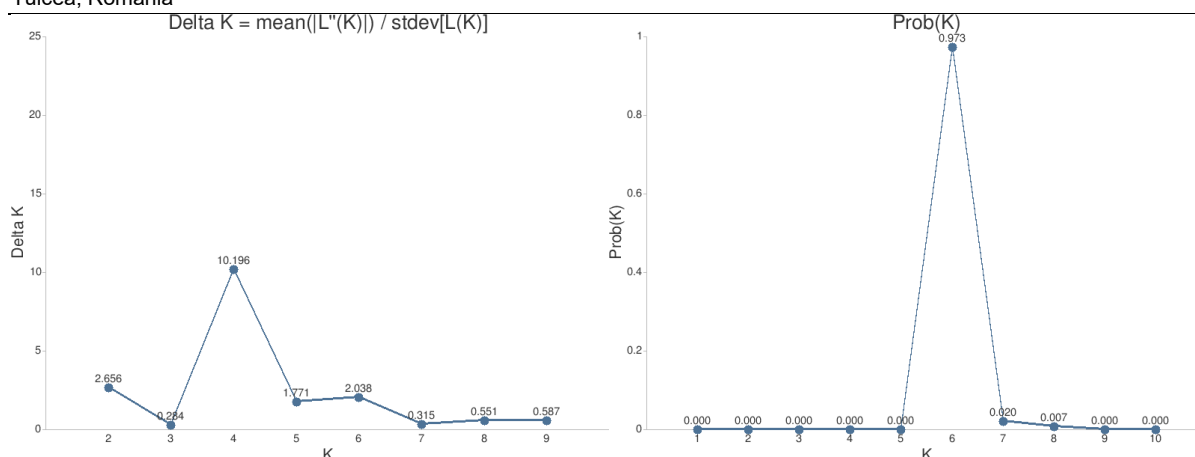


Figura 8. Valoarea cea mai probabilă estimată a lui K utilizând setul de date cu 12 loci: (stânga) metoda ΔK și (dreapta) valori $\ln(\text{Pr}(X|K))$.

Cu toate acestea, alegerea finală a fost $K=4$, susținută de distribuția consistentă a indivizilor în cadrul clusterelor și de stabilitatea între rulări.

Pentru $K=4$, analiza finală a fost refăcută cu 20 de rulări, cu burn-in de 10000 pași și 100000 pași MCMC, menținând același model de ancestor și aceleași frecvențe. ClumpaK a confirmat formarea unui mod major clar (13/20 rulări), cu o valoare de $H' = 0.986$, ceea ce denotă o structură genetică stabilă.

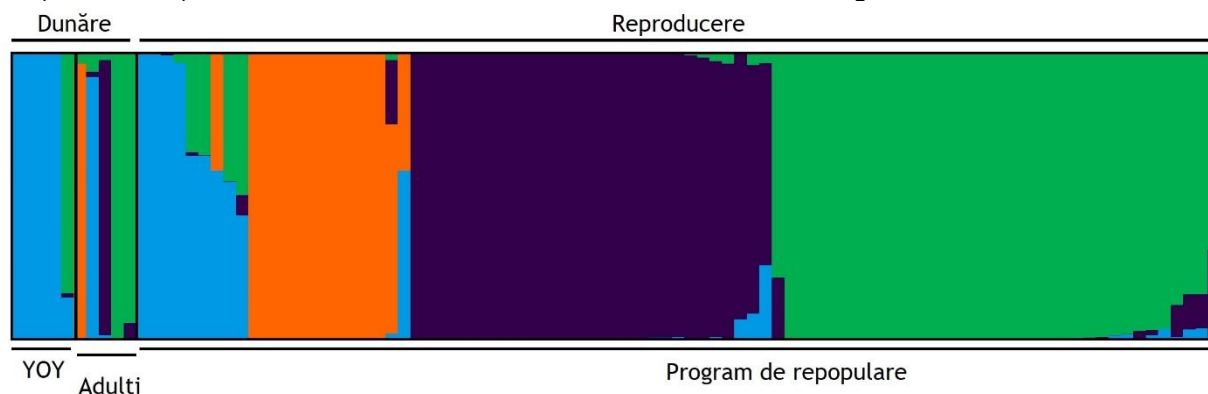


Figura 9. Rezultatele analizei STRUCTURE. Nivelul de similitudine genetică între indivizii de nisetru (*Acipenser gueldenstaedtii*) din grupul „Dunăre” și cei din grupul „Reproducere” este vizualizat cu patru grupuri genetice ($K = 4$). Fiecare linie verticală reprezintă un singur individ.

Rezultatele arată existența a patru cluster genetice distincte în cadrul grupurilor de nisetru (*Acipenser gueldenstaedtii*) studiate (Figura 9), fiecare reflectând cel mai probabil linii parentale distincte (pentru reproducători), materializate prin structuri genetice diferențiate în cadrul puietului. Distribuția indivizilor în clusterelor genetice a fost clară, fără amestec între grupuri, ceea ce sugerează că reproducerea asistată a menținut integritatea genetică a liniilor inițiale.

Implicații pentru managementul conservativ

Rezultatele analizei STRUCTURE, susținute de evaluările prin metodele Evanno și Pritchard și prelucrate cu ajutorul CLUMPAK, indică existența unei structuri genetice clare în setul de date de *Acipenser gueldenstaedtii* analizat. A fost identificată o valoare optimă a numărului de cluster genetice de $K=4$, confirmată de stabilitatea ridicată a rulărilor și de valoarea crescută a probabilității H' (0.986), ceea ce susține coerența modelului propus. Grupul denumit „Dunăre” cuprinde indivizii adulți capturați din mediul natural, care au fost utilizați ca reproducători în cadrul proiectului. Grupul denumit „Reproducere” include descendenții direcți ai acestora (generația F1) – puietul obținut în condiții controlate.

Identificarea a patru cluster genetice distincte, atât în rândul reproducătorilor cât și al puietului, reflectă conservarea unei părți importante din structura genetică parentală în generația F1, dar și o posibilă diferențiere



emergentă în cadrul lotului de puiet, ca urmare a segregării alelice și a efectului de eșantionare.

Recomandări privind managementul:

1. **Menținerea liniilor genetice distincte:** Având în vedere că acești reproducători sunt sursa directă a puietului, este esențială păstrarea separată a liniilor genetice identificate (clusterelor K1–K4). Aceasta va reduce riscul de pierdere a diversității și va contribui la protejarea potențialului adaptativ al speciei.
2. **Gestionarea controlată a încrucișărilor:** Recomandăm încrucișări dirijate între indivizi aparținând diferitelor clusteruri pentru a maximiza diversitatea genetică transmisă descendenților și a preveni consangvinizarea. Invers, încrucișările în cadrul aceluiași cluster pot fi monitorizate în vederea consolidării unor linii valoroase în scopuri specifice (ex. conservare *ex situ*).
3. **Monitorizarea pe termen lung a liniilor genetice:** Analiza a evidențiat o identitate genetică ridicată între generații ($N_e = 0.913$), dar și o ușoară reducere a numărului de alele efective în grupul Reproducere. Acest fenomen trebuie urmărit constant în generațiile următoare pentru a preveni acumularea derivației genetice sau a pierderii alelelor rare.
4. **Utilizarea reproducătorilor sălbatici în programe viitoare:** Având în vedere diversitatea ridicată a acestor indivizi ($N_e = 4.365$; $I = 1.484$), ei reprezintă resurse genetice de referință. Se recomandă reintroducerea lor periodică în ciclurile de reproducere, sau utilizarea altor indivizi sălbatici selecționați similar, pentru menținerea nivelului optim de variație genetică.

Faptul că structura genetică parentală s-a menținut, într-o proporție semnificativă, în descendență, indică eficiența strategiilor actuale de reproducere. Totuși, discrepanțele observate între N_a și N_e , împreună cu apariția unor alele private în lotul de puiet, subliniază necesitatea unui management genetic adaptiv, care să integreze:

- Controlul încrucișărilor,
- Separarea și conservarea liniilor genetice identificate,
- Evaluarea periodică a structurii genetice și a diversității în fiecare generație.

Astfel, aceste măsuri vor sprijini menținerea diversității genetice naturale și vor consolida eficiența programelor de repopulare, contribuind pe termen lung la conservarea sustenabilă a speciei *Acipenser gueldenstaedtii*.



- BEERLI, P., FELSENSTEIN, J. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152:763–773
- BEERLI, P., FELSENSTEIN, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4563–4568
- BERIDZE, T., BOSCARI, E., SCHEELE, F., EDISHERASHVILI, T., ANDERSON, C., CONGIU, L. 2022. Interspecific hybridization in natural sturgeon populations of the Eastern Black Sea: the consequence of drastic population decline? *Conserv Genet* 23, 211–216 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01413-7>
- BOSCARI, E., MARINO, I.A.M., CARUSO, C. GESSNER, J., LARI, M., MUGUE, N., BARMINTSEVA, A., SUCIU, R., ONARA, D., ZANE, L., CONGIU, L. 2021. Defining criteria for the reintroduction of locally extinct populations based on contemporary and ancient genetic diversity: The case of the Adriatic Beluga sturgeon (*Huso huso*). *Divers Distrib*. 27: 816– 827. <https://doi.org/10.1111/ddi.13230>
- CHAUHAN, T., RAJIV, K. 2010. Molecular markers and their application in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Technology* 1:281-291.
- CORNUET, J, LUIKART, G. 1996 Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014
- CORNUET, J.M., PIRY, S., LUIKART, G., ESTOUP, A., SOLIGNAC, M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153:1989–2000
- DAYANANDAN, S., RAJORA, O. P., BAWA, K. S. 1998. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 950-956.
- DI RIENZO, A., PETERSON, A.C., GARZA, J.C., VALDES, A.M., SLATKIN, M., FREIMER, N.B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3166–3170
- DUDU, A., GEORGESCU, S.E. COSTACHE, M. 2014. Molecular analysis of phylogeographic subspecies in three Ponto-Caspian sturgeon species. *Genetics and Molecular Biology*, 37, 3, 587-597
- EARL, D. A., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- EFRON, B., 1983. Estimating the error rate of a prediction rule: improvement on cross-validation. *J Am Stat Assoc* 78:316–331
- ESTEP, K., VANDEHEY, J., RAABE, J., SCHMALZ, P., WILFOND, D., PISZCZECK, P., BORKHOLDER, B. 2020. Genetic origins and diversity of lake sturgeon in the St. Louis River Estuary. *Journal of Great Lakes Research*, 46(4), 1028-1035.
- ESTOUP, A., WILSON, I.J., SULLIVAN, C., CORNUET, J.M., MORITZ, C. 2001. Inferring population history from microsatellite and enzyme data in serially introduced cane toads, *Bufo marinus*. *Genetics* 159:1671–1687
- EVANNO, G., REGNAUT, S., GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- FELSENSTEIN, J. 1993. PHYLIP-phylogenetic inference package, version 3.5c. University of Washington, Seattle, WA
- FRIEDRICH, T. LIECKFELDT, D. LUDWIG, A. 2022. Genetic Assessment of Remnant Sub-Populations of Sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) in the Upper Danube. *Diversity*, 14, 893. <https://doi.org/10.3390/d14100893>
- GARZA, J.C., WILLIAMSON, E.G. 2001. Detection of reduction of population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10:305–318
- GHASEMI, A., PORKAZEMI, M., KALBASI, M. 2005. Comparison of genetic variation of Ship sturgeon (*Acipenser nudiiventris*) in the southern Caspian Sea and Ural River using PCR-RFLP. *Iranian Scientific Fisheries* 14 (4), 151-164
- GOUDET, J. 1999 PCAGEN version 1.2. Population genetics laboratory, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland
- GRANDE, L., BEMIS, W. E. 1991. Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 11(S1), 1-121.
- HOLOSTENCO, D.N., CIORPAC, M., TAFLAN, E.; TOŠIC, K., PARASCHIV, M., IANI, M., HONT, S., SUCIU, R., RÎSNOVEANU, G. 2021. Genetic Diversity of Stellate Sturgeon in the Lower Danube River: The



- Impact of Habitat Contraction upon a Critically Endangered Population. *Water*, 13, 1115. <https://doi.org/10.3390/w13081115>
- HOLOSTENCO, D.N., CIORPAC, M., FIRIDIN, Ș., EROGLU, O., MEMIȘ D., PARASCHIV, M., HONȚ, Ș., IANI, M., TOȘIĆ, K., TAFLAN E., POREA, D., KERSTEN P., AYDIN I., SUCIU, R., GESSNER, J., RÎȘNOVEANU, G. 2022. Genetic population structure of the critically endangered stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) in the Black Sea basin: Implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 32(12), 1926-1939
- KHOSHKHOLGH, M., POURKAZEMI, M., NAZARI, S., PORMEHR, A.L. 2011. Genetic diversity in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. *Caspian J. Env. Sci.*, Vol. 9 No.1 pp. 17~25
- KIMURA M, OHTA T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:2868–2872
- KOPELMAN, N. M., MAYZEL, J., JAKOBSSON, M., ROSENBERG, N. A., MAYROSE, I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191.
- KRIEGER, J., FUERST, P. A. 2002. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order *Acipenseriformes*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(6), 891-897.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C. & TAMURA, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- LAIKRE, L., PALM, S. & RYMAN, N. 2005 Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio: A Journal of the Human Environment*, 34(2), 111–119
- LUIKART, G., ALLENDORF, F.W., CORNUET, J.M., SHERWIN, B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89:238–247
- MAUREEN, G. WALSH, A., BAIN M.B., SQUIERS, T., WALDMAN, J. R. WIRGIN, I. 2001. Morphological and Genetic Variation among Shortnose Sturgeon *Acipenser brevirostrum* from Adjacent and Distant Rivers. *Estuaries Vol. 24, No. 1*, pp. 41-48
- MILLIGAN, B.G., LEEBENS-MACK, J., STRAND, A.E. 1994 Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*, 3(4), 423–435.
- MOYER, G. R., SWEKA J. A., PETERSON, D. L. 2012. Past and Present Processes Influencing Genetic Diversity and Effective Population Size in a Natural Population of Atlantic Sturgeon, *Transactions of the American Fisheries Society*, 141:1, 56-67 DOI: 10.1080/00028487.2011.651073
- MUSCALU-NAGY, C., MUSCALU-NAGY, R. 2009. Observations regarding the embryony and larval development of sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Scientific Papers Animal Science And Biotechnologies*, 42(2), 71-71.
- NEI, M., TAJIMA, F., TATENO, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol* 19:153–170
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York
- O'LEARY, S.J., DUNTON, K.J., KING, T.L. 2014. Genetic diversity and effective size of Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* river spawning populations estimated from the microsatellite genotypes of marine-captured juveniles. *Conserv Genet* 15, 1173–1181. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0609-9>
- Park, L. K., Moran, P., Dightman, D. A. 1995. A polymorphism in intron D of the chinook salmon growth hormone 2 gene.
- PAETKAUM D., CALVERTM W., STIRLING, I., STROBECK, C. 1995 Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol Ecol* 4:347–354
- PAETKAU, D., SLADE, R., BURDENS, M., ESTOUP, A. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol* 13:55–65
- PEAKALL, R. O. D., SMOUSE, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. *Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155((2), 945–959
- RANNALA, B., MOUNTAIN, J.L. (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9197–9201
- RAYMOND, M., & ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248–249
- ROUSSET, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by



- distance. *Genetics* 145:1219–1228
- ROUSSET, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*, 8, 103–106
- SAITOU, N., NEI M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425
- SELLHEIM, K., WILLMES M., LEWIS L.S., SWEENEY J., MERZ J. AND HOBBS J.A. 2022. Diversity in Habitat Use by White Sturgeon Revealed Using Fin Ray Geochemistry. *Front. Mar. Sci.* 9:859038. doi: 10.3389/fmars.2022.859038
- SHEN, Z.Y., YU, D., GAO, X., ZHANG, F.T., LIU, H.Z. 2020. Genetic diversity and reproductive success of a wild population of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) from the Yangtze River inferred from juveniles born in 2014. *Zool Res.* 18; 41(4):423-430. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020.011.
- SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annu Rev Ecol Syst* 1985, 16:393–430.
- SLATKIN, M. 1985b. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39:53–65.
- SLATKIN, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47:264–279
- SNEATH, P.H.A., SOKAL R.R. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freedman and Co., San Francisco
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), 6463-6471.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538
- WALSH, M. G., BAIN, M. B., SQUIERS, T., WALDMAN, J. R., WIRGIN, I. 2001. Morphological and genetic variation among shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* from adjacent and distant rivers. *Estuaries*, 24, 41-48.
- WANG, J., WHITLOCK, M.C. 2003. Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics* 163:429–446
- WEBER, J. L., WONG, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human molecular genetics*, 2(8), 1123-1128.
- WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358–1370
- WILSON, G.A., RANNALA, B. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163:1177–1191
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28:114–138
- WRIGHT, J.M. 1993. DNA fingerprinting of fishes. In Hochachka, P.W. and Mommsen, T., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2. New York: Elsevier, pp. 57–91.
- WIRGIN, I. I., STABILE, J. E., & WALDMAN, J. R. 1997. Molecular analysis in the conservation of sturgeons and paddlefish. *Environmental Biology of Fishes*, 48, 385-398.
- ZHAO, N., AI, W., SHAO, Z. L., ZHU, B., BROSSE, S., & CHANG, J. 2005. Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(1), 7-13.
- ZHANG, X., WU, W., LI, L. XUFA, M., CHEN, J. 2013. Genetic variation and relationships of seven sturgeon species and ten interspecific hybrids. *Genet Sel Evol* 45, 21 <https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-21>



Cofinanțat de
Uniunea Europeană



DELTAICA NR. 8, 2025
TULCEA, ROMANIA

DELTAICA

BULETIN DE INFORMARE ȘTIINȚIFICĂ

EDITURA CITDDD TULCEA
ISSN 2286-0889



STATIESTURIONI.DDBRA.RO