

Contract PED 476/2020

**DENUMIREA PROGRAMULUI DIN PN III: PROGRAM 2- CRESTEREA
COMPETITIVITATII ECONOMIEI ROMANESTI PRIN CERCETARE,
DEZVOLTARE SI INOVARE**

RAPORTUL ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC (RST)

Etapa 3 din anul 2022

Etapa: 3

Titlul etapei: *Dezvoltarea suportului bioinformatic în practica de evaluare a calității biologice a apelor curgătoare folosind secvențe de ADN de referință*

Titlul proiectului: **Testarea metodelor genetice pentru îmbunătățirea practicii naționale de evaluare a calității apelor curgătoare: un experiment demonstrativ asupra nevertebratelor acvatice din sistemul Someșului Cald**

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2019-0214

Acronim proiect: GENIAS

Autoritatea contractantă: **Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFSCDI)**

Coordonator: **Universitatea Babeș-Bolyai Cluj Napoca**

Contract de finanțare: 476PED/2020

Termen etapă: 31.10.2022

This work was supported by a grant of the Romanian National Authority for Scientific Research and Innovation CNCS/ CCCDI-UEFISCDI, project number PN-III-P2-2.1-PED-2019-0214

within PNCDI III

Contract 476PED/2020

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

Cuprins:

1. Rezumatul etapei
2. Rezultatele etapei
3. Descrierea științifică și tehnică
4. Gradul de realizare a obiectivelor
5. Modul de diseminare a rezultatelor
6. Concluziile etapei

1. Rezumatul etapei:

1.1. Cuprins:

Etapa al 3-lea a proiectului își propune evaluarea eficienței utilizării secvențelor standard de ADN mitocondrial (secvențele "barcoding") în clasificarea, diferențierea genetică și evaluarea biologică a calității macro-nevertebratelor din diferite tipuri de ape localizate pe cursul superior al râului Someșul Cald. Scopul nostru principal a fost identificarea tuturor ecosistemelor acvatice din zonă pentru a cuprinde toată gama de macro-nevertebratelor de aici, ape cu o biodiversitate acvatică excepțională, cuprinzând un număr ridicat de specii regionale sau endemice pentru Munții Carpați sau limitate numai pentru Munții Apuseni. Pentru o evaluare corectă a biodiversității macro-nevertebratelor de aici, în cursul investigațiilor am inclus și un număr limitat de probe din ecosisteme acvatice similare din diferite regiuni ale Carpaților care ne va permite o evaluare mai cuprinzătoare a apelor interioare din regiunea biogeografică delimitată ca Ecoregiunea Carpaților (EC10), conform sistemului de clasificare a apelor interioare din Directiva Cadru a Apelor ale Uniunii Europene.

Lista speciilor obținută, cu un număr de 458 taxoni după evaluarea materialului colectat, a fost comparată cu lista oficială de nevertebrate folosită în evaluarea calității biologice ale apelor de către agențiile acreditate Apelor Române. Prin date genetice noi obținute în cadrul acestui proiect la un număr de 78 de specii de nevertebrate acvatice am reușit completarea lipsurilor majore din baze genetice internaționale (biblioteca genetică de referință a macro-nevertebratelor în cadrul proiectului ROMAC inițiat de noi în platforma BOLD), mai ales în cazul speciilor endemice sau regionale din Munții Carpați. Totodată am îmbunătățit considerabil

lista națională de bioindicatori cu un număr de 322 de specii. Propunem aceste specii ca bioindicatori ai apelor cu o calitate foarte bună, având condiții de referință, datorită exigenței ecologice ridicate ale acestor specii. Reprezintă un procent de 35% mai mult față de cele 600 de specii folosite în prezent în evaluarea calității biologice a apelor interioare.

Proiectul nostru pune, pentru prima dată, bazele unor proceduri și protocoale de identificare rapidă, obiectivă și eficientă a unor membri din macrozoobentos (compuși în marea majoritate din larve criptice) la care identificarea pe criterii morfologice la nivel de specie se face anevoios sau nu este posibilă. Pe baza asemănării genetice de 99-100% cu adulți cunoscuți (identificați la nivel de specie pe baza morfologiei aparatului genital la mascul de către experții taxonomiști implicați în acest proiect) și larve necunoscute a fost posibil identificarea la nivel de specie și clarificarea ecologiei unor specii cu un potențial real în evaluarea calității apelor.

Datele noastre oferă pentru prima dată instrumente de identificare genetica a macro-nevertebratelor cu acces deschis pe pagina web a proiectului, iar după publicarea rezultatelor noastre și prin platforma BOLD care va sprijini o identificare mai precisă la nivel de specie a unui număr important de specii de macro-nevertebrate. Cele 1167 secvențe standard de ADN mitocondrial extras din 1615 specimene oferă în prezent identificarea la nivel de specie a unui număr de 393 specii de macrozoobentos. Odată stabilite și testate, aceste protocoale pot fi îmbunătățite și completate ulterior, pentru a acoperi întreaga biodiversitate a macro-nevertebratelor de la noi și implementarea Biomonitoringului 2.0 pentru o evaluare detaliată, obiectivă și rapidă a diferitelor tipuri de ape de la noi.

1.2. Obiectivele Etapei 3 (2022)

În conformitate cu obiectivele generale ale proiectului au fost stabilite și obiectivele principale ale Etapei 3 după cum urmează:

OE3.1. – Finalizarea bazelor de date genetice care să sprijine identificarea genetică a tuturor speciilor (sau MOTU în cazul speciilor necunoscute) din ecosisteme acvatice investigate de noi

OE3.2. – Calcularea (recalcularea) indecșilor ecologici de evaluare a calității apelor pe baza speciilor (sau MOTU) identificate folosind tehnologia de ADN Barcoding.

OE3.3. – Diseminarea rezultatelor proiectului către agențiile interesate prin organizarea unui work-shop de training a unor biologi de la Apele Române, implicați în evaluarea calității biologice a apelor

OE3.4. – Participare la conferințe internaționale și naționale pentru prezentarea principalelor rezultate ale proiectului

OE3.5. – Publicarea rezultatelor obținute în reviste de specialitate

1.3. Descrierea activităților

Macro-nevertebratele acvatice sunt elemente cheie în evaluarea calității biologice ale apelor curgătoare, însă identificarea indivizilor la nivel de specie, folosind criteriile morfologice la majoritatea grupelor rămâne o problemă importantă (dacă nu imposibilă), mai ales în cazul larvelor criptice din punct de vedere morfologic. În vederea rezolvării acestor provocări importante în practica de evaluare a calității apelor au fost selectați un număr de 2410 indivizi, reprezentând 458 taxoni diferiți din totalul de 20.312 de specimene colectate în întreaga perioadă a derulării proiectului, cercetând toate tipurile de ape identificate din zona de izvoare a râului Someșul Cald. Pentru a evalua diversitatea genetică regională a macro nevertebratelor din regiunea cercetată, la anumite grupe de nevertebrate ”problematică” din punct de vedere taxonomic (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Diptera) au fost considerate și un număr limitat de probe din alte zone din Munții Carpați, mai ales în cazul speciilor endemice sau regionale. În total au fost generate și analizate un număr de 1167 secvențe standard de ADN mitocondrial aparținând la 393 BIN/MOTU (86% din speciile analizate), clasificate în 221 genuri, 100 familii și 21 grupe de macro-nevertebrate (reprezentate de adulți, pupe și larve). Indivizii cu secvențe de ADN standard generate cu succes au fost ulterior verificați morfologic de către experți în taxonomia grupului respectiv.

Stabilirea distanței intra- și interspecifice, distanțe care stau la baza identificării speciilor în tehnologii bazate pe folosirea secvențelor standard de ADN (așa numitul ”barcode-gap”), au fost analizate la acele grupele de macro-nevertebrate la care au fost identificate mai mult de 20 de specii diferite, după cum urmează: Coleoptera, Diptera, Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Trombidiformes (Hydrachnidia). Pentru delimitarea speciilor a fost implementată analiza indexului barcoding (BGA) și analiza automată a decalajului genetic (”gap”) prin metoda ABGA, iar pentru identificarea speciilor/larvelor necunoscute a fost aplicată metoda Neighbour Joining (NJ) și Maximum likelihood (ML). Pe baza identității haplotipurilor între stadiul de larvă și adult, grupând împreună pe arborele NJ sau ML cu o valoare a bootstrap-ului de 99-100% larvele pot fi identificate la nivel de specie cu o confidențialitate ridicată.

Activitățile desfășurate în cadrul acestei etape sunt conforme cu cele planificate în cadrul Etapei 3, din planul de realizare a proiectului. Rezultatele acestor activități se regăsesc ca atare în livrabilele etapei.

Activitate A.3.1. – Crearea unor baze de date pentru arhivarea și suportul datelor primare morfologice și genetice obținute, incluzând calcularea indecșilor pe baza listelor de specii generate prin tehnologia de secvențe de ADN standard ("barcoding"). Coordonator: Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj Napoca.

Activitate A.3.2. – Analiza eficienței utilizării datelor genetice pentru îmbunătățirea sistemului de evaluare a calității apelor curgătoare din bazinul hidrografic Someșul Cald. Coordonator: Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj Napoca.

Activitate A.3.3. – Livrarea produsului obținut către agențiile interesate (manageri implicați în controlul calității apelor interioare), publicarea rezultatelor în reviste științifice și diseminarea rezultatelor prin organizarea unui workshop pentru factorii interesați, acces gratuit la datele noastre prin pagina web a proiectului.

2. Rezultatele etapei:

Rezultatele activității de cercetare desfășurate în cadrul Etapei 3 a proiectului sunt constituite din următoarele livrabile:

L1: Listarea speciilor de macro-nevertebrate acvatice pe baza secvențelor standard de ADN obținute, compararea numărului de speciilor bioindicatoare din diferite tipuri de ape investigate față de listele naționale oficiale și calcularea indexului multimetric pentru evaluarea integrității ecologice a zonei de izvoare a Someșului Cald pe baza datelor generate. Livrabil pentru **Activitatea 3.1.**

L2: Obținerea și compararea secvențelor de ADN standard de referință și completarea lipsurilor din baze genetice internaționale (BOLD) pe baza materialului de macro-nevertebrate colectate pe durata proiectului, estimarea diversității criptice, detectarea de taxoni necunoscuți sau neevaluați, detectarea de larve necunoscute și identificare la nivel de specie pe baza asocierii genetice cu adulți cunoscuți. Livrabil pentru **Activitatea 3.2.**

L3: Dezvoltarea unei platforme cu acces deschis pentru datele morfologice și genetice obținute în cadrul acestui proiect și testarea tehnologiei de ADN în sistemul de evaluare a calității biologice a apelor interioare de la noi, prin instruirea managerilor implicați în

cadrul unui workshop și diseminarea rezultatelor prin publicarea rezultatelor, participări la conferințe interne și internaționale. Livrabil pentru **Activitatea 3.3.**

3. Descrierea științifică și tehnică:

În continuare se descriu succint, tehnic și științific, obiectivele și rezultatele obținute în cadrul Etapei 3 a proiectului, prezentate detaliat, în livrabilele mai sus enumerate.

L1: Listarea speciilor de macro-nevertebrate acvatice pe baza secvențelor standard de ADN obținute, compararea numărului de speciilor bioindicatoare din diferite tipuri de ape investigate față de listele naționale oficiale și calcularea indexului multimetric pentru evaluarea integrității ecologice a zonei de izvoare a Someșului Cald pe baza datelor generate. Livrabil pentru **Activitatea 3.1.**

Lista națională a speciilor bioindicatoare cuprinde un număr de 600 specii de macro-nevertebrate și a fost validată și publicată în cadrul unui document oficial al Ministerului Mediului și Gospodăririi Apelor pe baza ordinului nr. 161 din 16 februarie 2006, în conformitate cu Articolul 8 (1) al Directivei Cadru din domeniul apelor (2000/60/EC) pe baza căreia statele membre au stabilit programe de monitorizare pentru apele interioare în scopul cunoașterii și clasificării ”stării” sau integrității ecologice ale acestora în cadrul fiecărei district hidrografic, cu accent deosebit pentru zonele protejate și a corpurilor de ape de ”referință”. Aceste liste nu cuprind însă o mare parte din organisme bioindicatoare cu distribuție limitată (endemice sau regionale) de la noi, din cauza impedimentului taxonomic, marea majoritate a organismelor acvatice se găsesc în mediul acvatic în formă de larve criptice din punct de vedere morfologic, reprezintă specii endemice sau regionale cu stadiile larve necunoscute, sau sunt specii încă nedescrise (reprezintă ”dark taxa”).

Din cauza impedimentului taxonomic important, detaliat mai sus, neglijarea unei părți importante a biodiversității din apele interioare de la noi duce la imposibilitatea evaluării stării ecologice ale acestor ape la nivel calitativ corespunzător și evaluarea intensității și gradului de degradare a apelor în condițiile accentuării presiunilor antropice evidente, chiar și în cazul unor corpuri de ape de ”referință”. Biomonitoringul 2.0 propune un sistem nou de evaluare a calității biologice a apelor interioare prin implementarea tehnologiei de ADN barcoding care propune îmbunătățirea sistemului de evaluare prin identificarea tuturor organismelor de nevertebrate acvatice din probele de macrozoobentos și o valorificare la un nivel calitativ superior a

informațiilor biologice ale acestor ape și evidențierea particularităților locale sau regionale, sprijinind totodată și protecția biodiversității autohtone acvatice.

Pentru realizarea obiectivelor propuse am aplicat protocoale standard de colectare a macrozoobentosului, prezentate în detaliu în raportul științific și tehnic al etapei 1 a proiectului. În prezent lista finală a speciilor de macro-nevertebrate identificate de noi cuprinde 458 taxoni (din care la un număr de 393 taxoni au fost generate și date moleculare). Această listă poate fi consultată în formă de tabel sintetic în pagina web a proiectului: Tabel sintetic 1., <http://hidrobiologie.granturi.ubbcluj.ro/>. Tabelul cuprinde informații asupra stadiului de dezvoltare a taxonului identificat, numărul de secvențe genetice obținute, numărul BIN, lungimea secvenței de ADN standard, distanța intraspecifică maximă, distanța genetică față de cel mai apropiat taxon, numărul total de secvențe compatibile din punct de vedere taxonomic stocate în baze de date internaționale (BOLD), habitatul în care indivizii taxonului respectiv au fost identificați, similitudinea genetică cu indivizii aceluiași taxon existente deja în baze genetice internaționale, evaluarea speciei din punct de vedere conservativ (endemic/regional/comun) în ecosisteme acvatice din Munții Carpați (regiunea biogeografică EC10 ale organismelor acvatice conform standardelor europene).

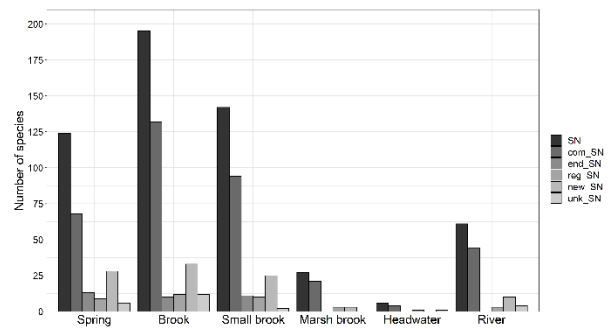
Activitățile cuprinse în **Act. 3.1.** au fost desfășurate în două planuri:

(1) În **prima etapă** am comparat speciile bioindicatoare din lista oficială a macro-nevertebratelor de la noi cu lista speciilor generate în cadrul prezentului proiect. Față de listele oficiale, în cadrul proiectului am reușit identificarea a unui număr de 322 specii bioindicatoare noi (din cele 393 specii identificare morfologic și molecular în cadrul proiectului doar un număr de 71 de specii se regăsesc în listele naționale de bioindicatori), și ne sugerează lipsuri mari și o estimare superficială a calității apelor din ecosistemele acvatice de la noi.

Lista celor 322 de specii bioindicatoare poate fi consultată pe pagina web a proiectului (Tabel listă bioindicatori noi propuși 3, <http://hidrobiologie.granturi.ubbcluj.ro/>) , cu indicele de saprobitate pe baza ecologiei generale ale speciilor și a valorilor parametrilor fizico-chimici a stațiilor de prelevare a probelor de unde au fost colectați indivizii respectivi. Tabelul nu va fi prezentat aici, din cauza limitei de pagini, prezentăm doar sinteza rezultatelor în Fig. 1.

Este important de menționat faptul, că utilizând tehnologia de generare a secvențelor standard de ADN s-au obținut informații taxonomice detaliate la un număr mare de specii în stadiul de larvă (la 168 de specii), care nu pot fi identificate pe baza criteriului morfologic.

Rezultatele sunt excepționale în cazul unor grupuri consecvent neglijate, cum ar fi dipterele acvatice, care domină aproape toate tipurile de ape interioare, dar nu pot fi identificate pe criterii morfologice până la nivel de specie. Prin asocierea genetică a larvelor cu forme adulte cunoscute (identificate până la nivel de specie pe baza aparatului genital mascul) pe baza identității haplotipurilor, identificarea larvelor până la nivel de specie devine o procedură de rutină, accesibilă oricărui biolog implicat în evaluarea calității apelor. O situație asemănătoare a fost depistată și la alte grupe de macro-nevertebrate, cum ar fi Trombidiformes (Hydrachnidia), Ephemeroptera, Plecoptera sau Trichoptera.



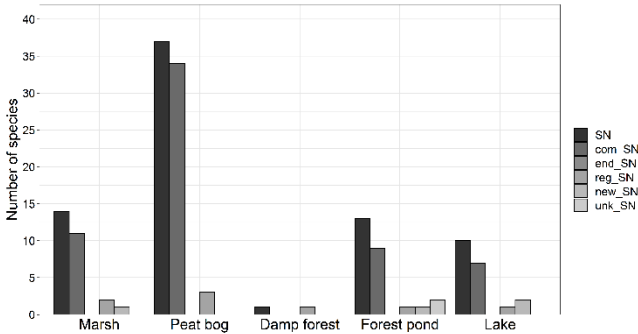


Figura 1. Numărul speciilor de macro-nevertebrate din diferite tipuri de ape analizate pe durata proiectului. SN-număr total specii, com-SN-specii comune, end-SN-specii endemice, reg-SN-specii regionale, new-SN-specii noi, unk-SN-

specii cu statut necunoscut.

În figura 1 se observă că cele mai multe specii au fost identificate în cazul pâraielor montane, în conformitate cu condițiile geografice a zonei cercetate. La toate tipurile de ape se observă prezența unui număr mare de specii endemice sau cu importanță regională, specii care lipsesc din listele oficiale ale speciilor de macro-nevertebrate de la noi, dar care sunt importante pentru delimitarea cursurilor de ape cu caractere de "referință", cum este considerată majoritatea cursurilor de ape din zona de izvoare a râului Someșul Cald. În afara pâraielor și râurilor montane, în cercetările noastre am inclus alte tipuri de ape, cu o biodiversitate acvatică unică, neconsiderate în sistemele naționale de evaluare a calității apelor, ape care influențează direct biodiversitatea acvatică din cursurile principale, sau reprezintă o rezervă genetică importantă cu o valoare conservativă excepțională, cum ar fi mlaștinile oligotrofe sau de tranziție de a lungul cursurilor principale de ape, izvoare minerale, izvoare mlăștinoase, bălți temporare și permanente.

Un alt aspect care merită subliniat este lipsa speciilor de macro-nevertebrate endemice sau cu răspândire regională în listele oficiale valabile, în marea majoritate identificate în ape cu o calitate excepțională, având condiții de referință. Neglijarea acestor specii în practica de evaluare a calității apelor interioare are ca rezultat pierderea unor informații biologice importante și o apreciere superficială a calității acestor ape, și implicit imposibilitatea de a delimita și caracteriza cu rigurozitate științifică acele corpuri de ape care sunt cruciale pentru managementul sustenabil al biodiversității acvatice unice a Munților Carpați. Pe baza acestor constatări se propune un număr de 78 de specii bioindicatoare care sunt specii cunoscute cu distribuție limitată în Carpați, dar lipsesc din bazele genetice internaționale, sau reprezintă specii noi pentru știință, având distanțe genetice mai mari de 2% față de specia cea mai apropiată din baza de date genetice

internaționale. La aceste cazuri s-au aplicat analize moleculare mai riguroase (analiza decalajului genetic prin metodele RESL, Barcode Gap Analyses, sau ABGA) pentru a aprecia semnificația taxonomică a distanței genetice depășind limita convențională de 2%.

Toate speciile identificate și analizate genetic din cadrul proiectului cu detalii asupra colectării, morfologiei și secvențele genetice pot fi consultate în platforma BOLD (din pagina web: <https://v4.boldsystems.org/>, vezi detalii în raportul științifico-technic al etapei 2 de raportare).

(2) În a **doua etapă** am comparat datele obținute pe baza identificării morfologice a probelor de macrozoobentos cu datele obținute după evaluarea moleculară a probelor colectate. Evaluarea calității biologice a apelor cercetate a fost făcută paralel în cazul stației de colectare din Valea Firei (stația FI2 din harta stațiilor de prelevare a probelor prezentată în raportul științifico-technic al etapei 1 de raportare). Protocoalele de prelevare și sortarea probelor au fost identice, respectând protocoalele de prelevare a probelor de macrozoobentos pro-rata Multi Habitat (MHS) realizate pe baza fiselor de teren și laborator încărcate pe pagina web a proiectului și detaliat în raportul științific ale etapei 1, în concordanță cu protocoalele oficiale AQUEM din 2012 (SR EN 16150). În final au fost identificate un număr de 46 specii, pe baza criteriului morfologic, și un număr de 66 specii identificate cu ajutorul secvențelor standard de ADN, deci cu o rezoluție taxonomică mai bună de aprox. 30%, și implicit o cantitate mai mare informații biologice pentru caracterizarea biodiversității ecosistemului acvatic respectiv (figura 2).

Evaluarea calității biologice a calității apei din Valea Firei (numită în continuare stația FI2), s-a realizat urmând valorile de referință valabile pentru cursuri de ape tip RO1. Au fost calculați: indicele de saprobitate IS, indicele IEPT (raportul indiviziilor din familiile Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera din toată proba de macrozoobentos), indicele Shannon-Wiener ISW, indicele familiilor (IFAM), Indicele Oligochata (IO), Indicele Grupelor Funcționale (IGF), Indicele de reobitate (IREO). Valorile indicilor individuali participă diferențiat în calcularea Indicelui Multimetric (IM) final, după cum urmează: IS 30%, IEPT 10%, ISW 20%, IFAM 10%, IO 10%, REO 10%, iar valoarea finală a IM este suma valorilor celor 7 indecși calculați, raportați la condițiile de referință. Rezultatele sunt sintetizate și prezentate în figura 2.

Metoda	Număr taxoni	Număr indivizi	IS	IEPT	ISW	IFAM	IO	IGF	IREO	IM
<i>Morfologică</i>	46	2184	1.51	74.09 %	2.66	20.00	0.90 %	32.03 %	94.66 %	0.93
<i>Moleculară</i>	66	1124	1.54	83.36 %	3.16	32.00	0.98 %	38.21 %	96.79 %	0.94

Figura 2. Numărul taxonilor și a indivizilor de macro-nevertebrate bentonice în cazul stației FI2 din Valea Firei (cursul superior al Someșului Cald) și valorile indecșilor calculați la cele 2 probe evaluate separat morfologic și molecular.

Datele noastre arată deși valoarea indicelui multimettric final (IM) nu se modifică semnificativ, toți cei 7 indici folosiți în evaluarea biologică a apelor curgătoare sunt mai mari față de cei obținuți pe baza criteriului morfologic

Lipsa majoră a metodologiei actuale de monitorizare a apelor nu consideră speciile endemice sau cu răspândire regională, care însă nu pot fi neglijate, pentru că subliniază calitatea superioară ale acestor ape, aceste ecosisteme fiind și importante rezerve genetice pentru biodiversitatea acvatică a Europei. Propunem introducerea unor indici de calitate care să fie mai sensibili pentru particularitățile regionale ale acestor tipuri de ape, și schimbarea accentului în procesul monitorizării cu o sensibilitate mai mare față de speciile autohtone, endemice sau regionale, care să reflecte mult mai complex condițiile locale ale biodiversității excepționale ale apelor din regiunea biogeografică EC10.

L2: Obținerea și compararea secvențelor de ADN standard de referință și completarea lipsurilor din baze genetice internaționale (BOLD) pe baza materialului de macro-nevertebrate colectate pe durata proiectului, estimarea diversității criptice, detectarea de taxoni necunoscuți sau neevaluați, detectarea de larve necunoscute și identificare la nivel de specie pe baza asocierii genetice cu adulți cunoscuți. Livrabil pentru **Activitatea 3.2.**

Activitățile cuprinse în **Activitatea 3.2** sunt organizate în vederea aplicării tehnologiei ADN pentru identificarea indivizilor colectați din diferite probe de macrozoobentos și construirea unei biblioteci de ADN de referință cât mai completă a ecosistemelor acvatice investigate.

Criteriile pentru selectarea markerelor moleculari și stabilirea metodologiei de prelucrare moleculară a probelor de macrozoobentos au fost deja prezentate detaliat în rapoartele științifico-tehnice ale etapelor 1 și 2 și pot fi consultate accesând pagina web a proiectului.

1. *Obținerea secvențelor prin platforma BOLD și metode de analiză bioinformatică a secvențelor obținute.*

Până la finalizarea proiectului a fost extras ADN mitocondrial standard din 1615 indivizi (vezi Tabelul sintetic 1 încărcat în pagina web a proiectului). Fragmente de țesut animal sau fragmente de picioare până la 2 mm au fost introduse în plăci genetice cu 96 locuri și trimise la Centrul Canadian pentru ADN Barcoding (CCDB) pentru extracția de ADN, PCR și secvențare a 658 perechi de baze din regiunea "barcoding" a genei COI mitocondrial. Protocolul de extragere a ADN-ului mitocondrial, PCR și secvențare aplicată pentru probele noastre poate fi accesat prin platforma BOLD (<http://ccdb.ca/resources.php>). Detaliile privind amorsele utilizate pentru PCR și secvențare pentru toate probele moleculare, secvențele barcoding obținute și documentele aferente au fost încărcate în pagina proiectului ROMAC din platforma Barcode of Life Data Systems (BOLD) pentru stocare și analiza datelor, împreună cu toate datele relevante de colectare și fotografii ale indivizilor analizați.

Denumirile științifice ale indivizilor de referință (specimene voucher) au fost introduse în baza de date BOLD după o examinare morfologică detaliată de către experți taxonomiști al proiectului (documentarea fotografică a indiviziilor poate fi consultată prin platforma BOLD al proiectului ROMAC). Vouchere au fost codificate individual și depozitate în colecția de insecte acvatice ale Laboratorului de Hidrobiologie Avansată și Biomonitoring (LabHAB) al Centrului 3B al Facultății de Biologie și Geologie, UBB, Cluj Napoca.

Pentru analiza moleculară a datelor am folosit numai secvențe de ADN mai lungi de 500 perechi de baze care sunt conforme cu criteriile compatibilității protoalelor "Barcoding". Datele noastre au fost analizate pe baza informațiilor prezente în platforma BOLD până la data de 12 Septembrie, 2022. Până la data menționată mai sus nu toate secvențele noastre au primit Barcode Index Number (BIN) (vezi raportul științifico-tehnic din Etapa 2 de raportare, accesibil și prin pagina web a proiectului). În aceste cazuri am utilizat procedeul "Cluster Sequences" oferit de platforma BOLD pentru a delimita unități taxonomice operaționale (OTU), dacă la secvențele respective nu am putut asocia o denumire științifică. Acest proces folosește algoritmul Refined Single Linkage (RESL) care este și baza delimitării BIN-urilor din secvențele de ADN

analizate. În cazul în care au fost detectate discrepanțe între speciile identificate morfologic și delimitarea moleculară a indivizilor în BIN-uri sau OTU,-uri, acei indivizi au fost reexaminați morfologic pentru a corecta posibile greșeli de identificare.

Fiecare individ a fost evaluat conform criteriilor:

1. **Potrivire:** toți indivizii ai unei specii se grupează într-un singur BIN.
2. **Împărțire:** indivizii unei specii se împart în 2 sau mai multe BIN-uri.
3. **Îmbinare:** toți indivizii a doi sau mai multor specii diferite sunt grupate într-un singur BIN.
4. **Amestecare:** situație incertă din punct de vedere taxonomic, când în cazuri de împărțire și îmbinare sunt implicate două sau mai multe specii.

Numărul de haplotipuri și locurile polimorfice (S), diversitatea haplotipurilor (Hd) și a nucleotidilor (π) au fost calculate în DnaSp 6. Distanțele genetice în interiorul speciilor (distanța intraspecifică), între speciile aparținătoare aceluiași gen (distanța congenerică) și în interiorul familiilor (distanța confamiliară) a fost estimată pe baza parametrului Kimura-2 (K2P) aplicând procedura Distance Summary accesibil prin platforma BOLD. Existența unui decalaj genetic ("barcode gap") între distanța genetică maximă intraspecifică și distanța interspecifică minimă a fost testată cu ajutorul procedurii "Barcode Gap Analyses" accesibil tot prin platforma BOLD.

Majoritatea ordinelor de macro-nevertebrate acvatice au fost reprezentate de mai puțin de 10 indivizi, fiind reprezentate în zona cercetată prin puține specii. Din această cauză calcularea distanțelor K2P și analiza decalajului genetic între secvențele de ADN barcoding au fost efectuate la șase ordine care au fost reprezentate de un număr mai mare de specii. Aceste grupe sunt: Coleoptera, Diptera, Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera și Trombidiformes (acarieni acvatice). Speciile care prezintă distanță minimă interspecifică mai mare decât distanța intraspecifică maximă au fost considerate delimitate cu succes.

Conformitatea delimitării moleculare a speciilor au fost analizate și comparate prin patru metode diferite:

1. Gruparea secvențelor în BIN/OTU individuale – metoda Barcoding Gap Analyses (BGA)
2. Detectarea automată a decalajului genetic – metoda Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)
3. Asamblarea speciilor prin partajare automată – metoda Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP)

4. Procedul Arborele Poisson – metoda Multi-rate Poisson Tree Processes (mPTP)

Toate aceste metode grupează secvențele de ADN mitocondrial COI în clustere de Unități Taxonomice Moleculare Operaționale (MOTU sau simplu OTU) pe baza similitudinii secvențelor genetice.

2. Analiza distanțelor genetice ale secvențelor obținute

La finalul proiectului un număr de 1615 indivizi de nevertebrate acvatice au fost selectați din toate probele colectate pe baza morfologiei distincte a indivizilor colectați și folosiți pentru generarea de secvențe standard de ADN. Un număr de 448 secvențe au fost considerate de calitate inferioară având lungimi prea scurte, incompatibil cu criteriul taxonomic molecular (mai mic de 500 de perechi de baze) și nu au fost incluse în analizele ulterioare. La final un număr de 1167 secvențe au fost generate la un nivel calitativ corespunzător, reprezentând unități taxonomice moleculare operaționale, 327 BIN și 463 OTU, reprezentând 377 specii din 209 genuri, 101 familii din 24 grupe de macro-nevertebrate (vezi Tabelul sintetic 1 încărcat în pagina web a proiectului). **Un număr de 78 BIN-uri noi au fost generate în cadrul acestui proiect, care până acum nu au fost introduse în baza de date genetice din BOLD.** Toate aceste unități moleculare reprezintă specii endemice sau unități genetice distincte încă nevalorificate din punct de vedere taxonomic, și reflectă o diversitatea autohtonă importantă a apelor cercetate de noi. Aceste BIN-uri noi pot fi consultate în formă de tabel în pagina web a proiectului.

Toate secvențele analizate prezintă un procent ridicat de adenzină și timidină (AT) (în medie 61,1%) care este în concordanță cu datele din literatura de specialitate. Procentul A-T cel mai ridicat a fost detectat în cazul ordinilor Diptera (Ceratopogonidae 46,1%) și Trichoptera (peste 75,8%), în timp ce un procent mai scăzut a fost identificat în cazul ordinii Coleoptera (*Deronectes platynotus* 37,6%).

Distanțele genetice între secvențele de ADN mitocondrial incluse în studiul nostru sunt prezentate în tabelul sintetic din pagina web a proiectului. Distanța intraspecifică K2P pentru datele noastre variază între 0 și 2,03%, cu o medie de 1,79%, în timp ce distanța interspecifică K2P în cadrul unui gen variază între 0% și 28,14%, cu o medie de 13,97%, care este conformă cu datele din literatura de specialitate, limita de aprox. 2% distanță genetică intraspecifică convențională este cel mai frecvent utilizată pentru delimitarea automată a unor specii necunoscute în sistemul BOLD. În cazul celor șase grupe de macro-nevertebrate majore analizate mai detaliate în cadrul proiectului numai trei prezintă un decalaj genetic clar între distanța

maximă intraspecifică și distanța minimă interspecifică (fig. 3). Aceste ordine sunt Coleoptera, Plecoptera și Trombidiformes).

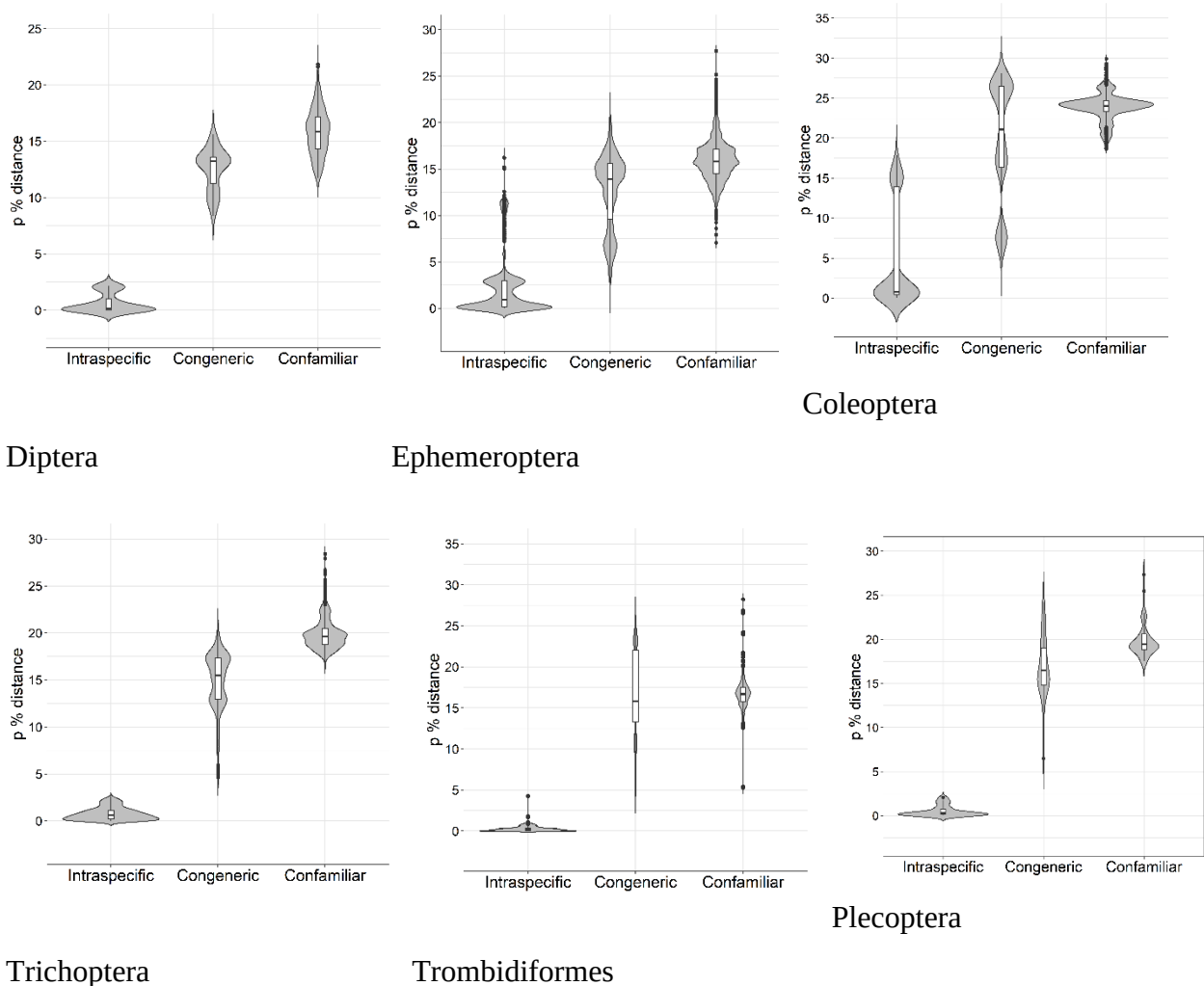


Figura 3. Distanțele intra- și interspecifice și frecvențele lor la cele 6 grupe majore de macro-nevrtebrate identificate în zona cercetată de noi.

Menționăm însă că decalajul genetic convențional de 2%, pentru delimitarea genetică automată a speciilor nu este aplicabil în majoritatea grupelor de macrozoobentos analizate de noi, și necesită o analiză riguroasă de la caz la caz. În continuare prezentăm mai detaliat 3 grupe de macrozoobentos unde distanța convențională de 2% nu poate fi aplicată din cauza existenței a numeroaselor cazuri de diversitate criptică nevalorificată încă din punct de vedere taxonomic.

În cazul ordinului Ephemeroptera distanța genetică medie intraspecifică a fost de 2,52%, cu o variabilitate între 0% și 17,83%. Valoare medie de 2,52% a distanței genetice este în concordanță cu datele din literatura de specialitate, unde în cazul genului *Baetis* se propune o distanță genetică de 3% pentru delimitarea moleculară a speciilor. Majoritatea (87,2%) secvențelor intraspecifice prezintă distanțe genetice între 0% și 3,13%. La cele 17,8% din secvențe distanțele genetice variază între 12,24% și 17,82%. În aceste cazuri distanța genetică între două BIN-uri (AEK8819 și AEL4495), reprezentând indivizi în stadiul larvar și identificați ca *Baetis alpinus*, două BIN-uri (AAE4621 și AEP5776) identificați ca *Baetis rhodani* și două BIN-uri identificați ca *Habroleptoides confusa* (AEP5777 și AEC7220) depășește 3%, variind între 4,84% și 28,15%, cu o medie de 19,73%. Distanța minimă interspecifică a fost de 4,84% și maximă de 28,15%, cu o medie de 19,73%.

La Diptere de asemenea nu am reușit identificarea unui decalaj genetic clar între distanța K2P intraspecifică maximă și distanța interspecifică minimă. Distanța medie în cadrul speciilor a fost de 1,91%, care corespunde în mare distanței generale de 2% în cazul insectelor, dar cu o variabilitate de 0% și 16,22%. Distanța genetică medie interspecifică a fost de 12,59%, cu o variabilitate între 0,93% și 21,86%. Cu toate că în cazul dipterelor nu am reușit identificarea unui decalaj genetic clar, în proporție de 62,26% a secvențelor arată o distanță genetică intraspecifică sub 3%, iar 82,42% distanța genetică este mai mare de 4%. Numai 2,1% dintre secvențe au distanță genetică interspecifică mai mică de 4%, majoritatea de 91,5% au distanță peste 6%

La Trichoptera speciile arată o medie a distanței genetice K2P de 0,3%, care însă variază între 0% și 4,31%. Valori peste 4% (4,24%-4,31%) au fost observate în cazul speciei endemice *Allogamus uncatus*, distanța maximă observată la toate speciile a fost de 1,8%. Valoarea medie a distanței genetice interspecifice a fost de 16,31%, cu o valoare minimă de 4,96% și un maximum de 25,82%.

3. Analiza filogenetică a datelor genetice și analiza cluster pentru identificarea unor larve necunoscute

Pentru analiza diversității criptice a materialului de macro-nevertebrate colectate în zona cercetată și identificarea unor larve necunoscute au fost implementată o analiză Maximum likelihood (ML), care se bazează pe analiza haplotipurilor, generate în programul MegaX. Principul metodei de bazează pe analiza clusterelor grupate pe arborele filogenetic, și validate de

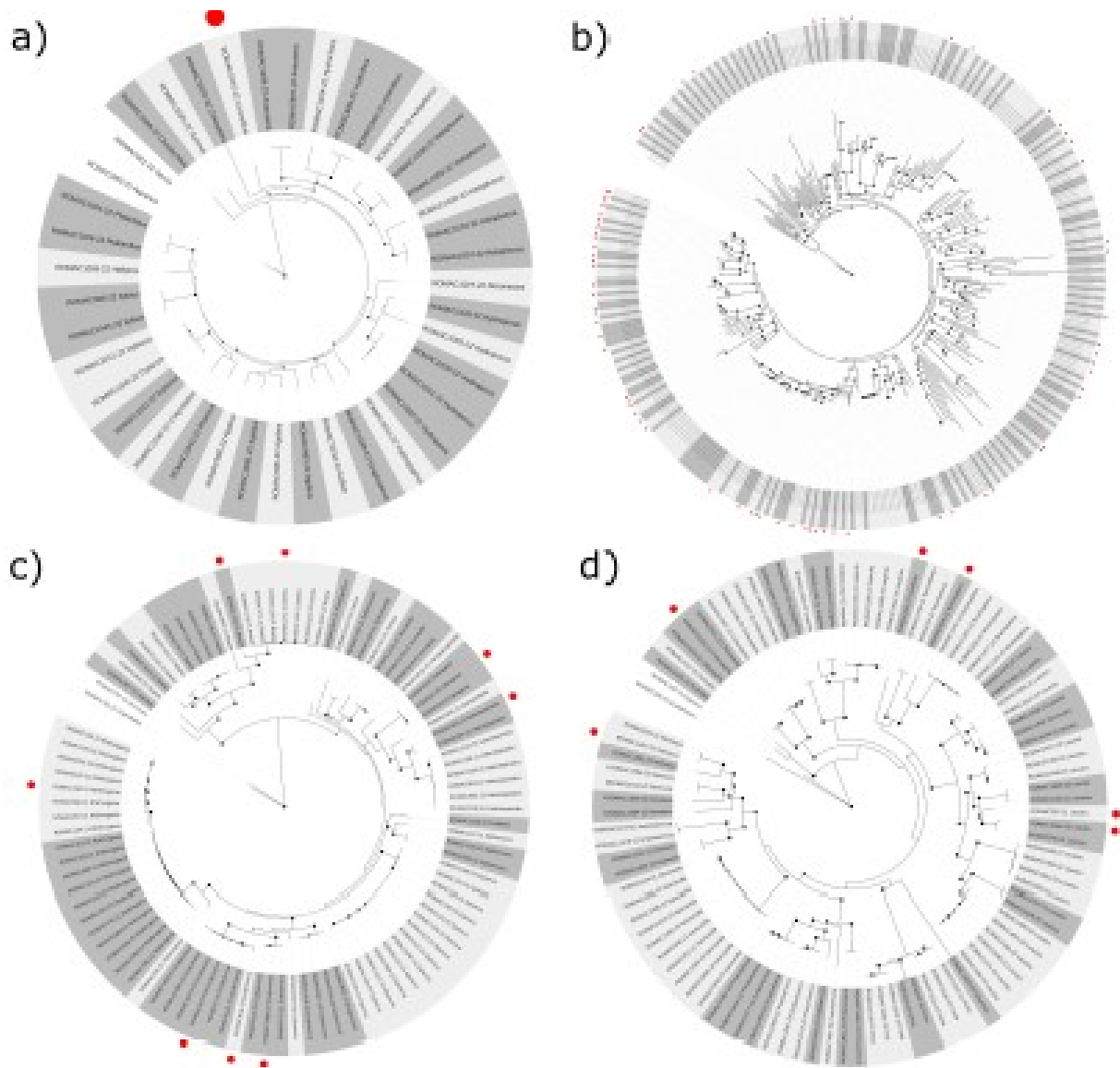
o valoare bootstrap mai mare de 99%. Această analiza permite și identificarea unor larve necunoscute prin grupare în același cluster cu adulți cunoscuți, având haplotipuri identice. Am aplicat această metodă la toate cele 6 grupe de macro-nevertebrate majore, identificate din apele cercetate de noi. Analiza rezultatelor au fost prin aplicarea modelelor evolutive GTR-I+G a evoluției nucleotidice, determinate de jModelTest ver 2.1.10, pe baza criteriului bioinformatic Bayesian (BIC) cu 1000 de replicații bootstrap nonparametrice. Această analiză ne-a permis identificarea la nivel de specie a unui număr de 168 taxoni, reprezentând larve cu morfologie criptică (Fig. 4). Totodată gruparea secvențelor în cluster pe arborele filogenetice generate ne arată prezența unei biodiversități criptice importante în zonă, cu implicații în evaluarea corespunzătoare a apelor curgătoare cercetate.

4. Gradul de realizare a obiectivelor

Etapa 3 a proiectului cuprinde finalizarea dezvoltării și testarea metodologiei de aplicare a tehnologiei secvențelor de ADN standard în delimitarea unităților taxonomice operaționale și identificarea indivizilor la nivel de specie în cazul cursului superior al Someșului Cald.

În conformitate cu obiectivul 1 din etapa 3 am reușit fondarea unei baze de date genetice cuprinzând un număr 1615 secvențe de ADN diferite, reprezentând 393 specii de macro-nevertebrate. În cazul unui număr de 327 taxoni au fost generate 393 BIN-uri unice, permițând identificarea la nivel de specie a unui număr de 168 larve criptice din punct de vedere criptic, îmbunătățind considerabil protocoalele de identificare rapidă și obiectivă a materialului de macrozoobentos colectat până la nivel de specie. În cadrul acestui proiect au fost generate 79 BIN-uri noi, care nu au fost încă încărcate în baza de date de referință BOLD.

Un număr de 322 specii bioindicatoare sunt propuse pentru completarea listei oficiale de 600 specii. Aceste specii noi propuse reprezintă specii având valoare bioindicatoare superioară,



fiind specii endemice sau au distribuție limitată și reflectă o condiții ecologice superioare, de ”referință” a apelor investigate de noi.

Fig. 4. Arborele filogenetic pe baza algoritmului ML pentru detectarea diversității criptice și identificarea larvelor necunoscute, exemple la Coleoptere (a), Diptere (b), Ephemeroptere (c) și Plecoptere (d). Liniile cenușii deschise – unități moleculare taxonomic

informatică (BIN), cenușii închise – BIN-uri noi, reflectând diversitatea criptică încă nevalorificată din punct de vedere molecular, puncte roșii – specii noi identificate în cursul analizelor moleculare.

Speciile (sau MOTU) identificate de noi folosind tehnologia de ADN Barcoding în conformitate cu obiectivul 2 al etapei 3 identifică un număr mare de cazuri unde s-a reușit identificarea cu succes a indivizilor până la nivel de specie, la care criteriul morfologic permite doar o apreciere a identității până la nivel de gen. Tehnologia de ADN barcoding poate fi utilizată deci cu un efort minim, dar cu rezultate net superioare față de identificare morfologică, rezultând o lista mai completă și mai reală de specii, care poate să caracterizeze mai complex ecosistemele acvatice investigate (fig. 5).

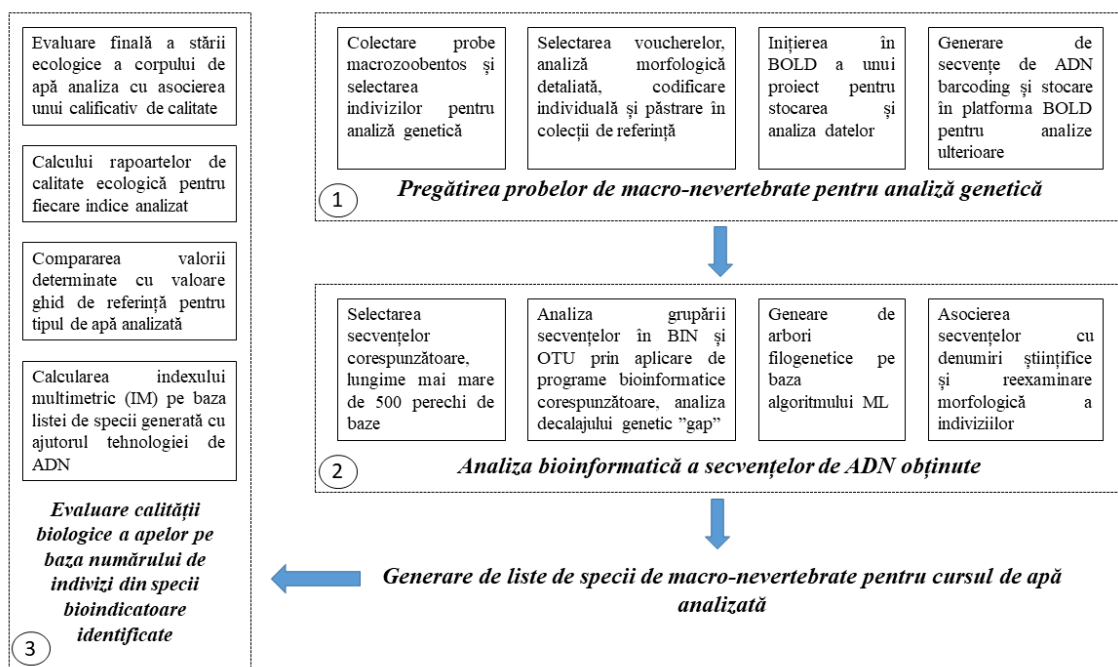


Fig. 5. Schemă de aplicare a tehnologiei de ADN barcoding pentru evaluarea calității apelor, cu pașii care se recomandă a fi urmăriți pentru a identificare obiectivă și rapidă a nevertebratelor acvatice până la nivel de specie.

Rezultatele obținute arată că toate activitățile propuse în Planul de realizare a proiectului pentru **Etapa 3** au fost realizate cu succes, iar obiectivele etapei au fost îndeplinite în totalitate

5. Modul de diseminare a rezultatelor

Rezultatele activităților din cadrul **Etapei 3** a proiectului au fost diseminate prin:

1. Organizare workshop

Conform planului de realizare a proiectului în cadrul activității **A.3.3**, s-a realizat diseminarea rezultatelor și training de taxonomie moleculară și bioinformatică, prin organizarea unui workshop cu titlul: **”Model experimental adecvat pentru aplicarea tehnologiei ADN barcoding în practica de evaluare a calității biologice a apelor curgătoare”**, activitate, care a avut loc în perioada 2-6.06.2022 în Laboratorul de Hidrobiologie Avansată și Biomonitorizare (LabHAB), afiliată Centrului de Biologie Sistemică, Biodiversitate și Bioresurse ”3B”, Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj Napoca. Această activitate a prevăzut și o ieșire de prelevare a probelor biologice de macro-zoobentos în bazinul superior al râului Someșul Cald. Participanții la workshop au fost reprezentați de un număr de 16 biologi din cadrul Administrației Naționale Apele Române, din cadrul SGA Maramureș, SGA Satu Mare, ABA Someș-Tisa, SGA Bistrița, ABA Mureș, ABA Siret, SGA Suceava, DGA Vrancea, SGA Mehedinți, SGA Caraș Severin, ABA Crișuri, SGA Ilfov-București și sediul central ANAR, conform listei de prezență încărcat pe pagina web a proiectului. Menționăm că Administrația Națională Apele Române este principalul beneficiar și factor interesat al rezultatelor proiectului, și ca a răspuns pozitiv și prompt invitației noastre, deschizând astfel calea unei colaborări pe termen lung între cercetare și monitorizare.

Workshop-ul s-a desfășurat în două zile. S-au prezentat problemele generale legate de aplicarea tehnologiei ADN în cazul probelor biologice de macrozoobentos, precum și obiectivele principale ale proiectului GENIAS. Prezentarea generală a tehnologiei ADN a fost prezentată de directorul proiectului, conf. dr. Lujza Keresztes, urmând o serie de demonstrații practice și studii de caz la următoarele grupe de macrozoobentos: Odonata – conf. dr. Zoltán László, Acarieni acvatice – șef. lucr. dr. Mirela Cîmpean, Heteroptere acvatice – post doc. Marius Berchi, Diptere acvatice – drd. biol. Andrei Bogdan Terec. Demonstrația practică s-a realizat prin prezentarea detaliată a pașilor necesari și cu precizarea etapelor necesare identificării speciilor folosind tehnologia ADN. Prezentările făcute și detalii privind organizarea și desfășurarea workshopului pot fi studiate accesând pagina web a proiectului: <http://hidrobiologie.granturi.ubbcluj.ro/genias/>.

2. Elaborare de articole științifice și participări la conferințe

În etapa 3 de implementare a proiectului am publicat 3 articole (1 ISI și 2 BDI). Totodată am finalizat redactarea în forma finală a 3 manuscrise care vor fi trimise spre publicare în reviste internaționale recunoscute.

Totodată membrii echipei au avut prezentări orale sau poster la o conferință națională și 4 conferințe internaționale, unde au fost prezentate principalele rezultate ale proiectului.

Toate aceste informații au fost încărcate pe platforma web a proiectului, la adresa: <http://hidrobiologie.granturi.ubbcluj.ro/>, de unde pot fi descărcate și studiate

6. Concluziile etapei

În conformitate cu rezultatele obținute în cadrul etapei 3 de implementare a proiectului prezentăm în continuare principalele concluzii:

1. Studiile noastre asupra macro-nevertebrărilor bentonice (reprezentând organisme din diferite stadii de dezvoltare, adult, larvă, nimfă, pupă, sau fragmente de indivizi) arată că **ADN-ul mitocondrial, subunitatea COI oferă rezoluție net superioară față de metodele morfologice** pentru identificarea indivizilor la nivel de specie.

2. Răspândirea generală a metodelor de secvențare a ADN mitocondrial transformă aceste tehnologii în **metode rapide, obiective și eficiente în procesarea unui volum mare de probe biologice** de către relativ puțini specialiști (eficientizarea costurilor în programele de biomonitoring).

3. Dezvoltarea rapidă a tehnologiilor avansate de ADN (așa numitele "OMICS"), vor avea calitatea de "game-changers" în evaluarea calității biologice a diferitelor tipuri de ape în viitor, și chiar vor depăși performanțele metodelor de identificare pe criteriile morfologice, **dar numai în cazul în care vor exista baze de date genetice de referință calitativ corespunzătoare**, cu includerea a cât mai multor grupe/specii neglijate, endemice sau regionale.

4. Instruirea a cât mai multor specialiști biologi implicați în evaluarea calității apelor de la noi capabili pentru evaluarea stării ecologice a apelor la un nivel calitativ superior, prin identificarea tuturor speciilor din ecosistemele acvatice investigate și valorificarea informațiilor biologice cât mai complexe în vederea **organizării unui management sustenabil și eficient ale acestor resurse naturale** neprețuite. Aceste deziderate se regăsesc și în preocupările majore ale conservării resurselor de ape dulci ale Uniunii Europene prin Directiva Cadru Apă și vor fi implementate în viitorul apropiat în cazul tuturor statelor membre.

1 octombrie, 2022

DIRECTOR DE PROIECT, Conf. dr. Keresztes Lujza