

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
Facultatea de Biologie și Geologie
ȘCOALA DOCTORALĂ BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

Rezumatul tezei de doctorat

**Biogeografia conservativă și reevaluarea refugiului
pontic în menținerea diversității genetice a speciei
Palingenia longicauda (OLIVIER, 1791)
(Ephemeroptera, Palingeniidae)**



Coordonator științific:

Conf. Dr. habil KERESZTES Lujza

Doctorand:

VAIDA Romina Mirabela
(căs. TINTELECAN)

Cluj- Napoca

2024

CUPRINS

Introducere generală	3
CAP.I	4
1.1 Ephemeropterele (Insecta: Ephemeroptera)	4
1.1.1 Originea și evoluția ephemeropterelor.....	4
1.1.2 Încadrarea sistematică a ephemeropterelor.....	4
1.1.3 Biologia și ecologia ephemeropterelor.....	4
CAP.II	5
Filogeografia și biogeografia conservativă a speciei <i>Palingenia longicauda</i> (OLIVIER,1791);	5
<i>Studiu de caz- Revenirea rusaliilor Palingenia longicauda (OLIVIER,1791) (Ephemeroptera:Palingenidae) în S-E Europei</i>	5
1. Introducere.....	5
2. Materiale și Metode.....	6
3. Rezultate.....	9
4. Discuții.....	14
5. Concluzii.....	17
CAP.III	17
Revizia taxonomică a speciei <i>Palingenia longicauda</i> (OLIVIER,1791);	17
<i>Studiu de caz:- Dilema de zeci de ani, rezolvată? Taxonomia integrativă susține una și nu mai multe specii de Palingenia din sud-estul Europei (Insecta, Ephemeroptera, Palingeniidae)</i> ...	17
1. Introducere.....	17
2. Materiale și metode.....	19
3. Rezultate.....	22
4. Discuție.....	26
CAP.IV	28
Impactul social asupra conservării speciei <i>Palingenia longicauda</i> (OLIVIER,1791) în România	28
CONCLUZII FINALE	30
Bibliografie selectivă	31
Lista publicațiilor	38

Introducere generală

Genul *Palingenia* BURMEISTER, 1839, este un gen mic, dar intens dezbătut de ephemeroptere, datorită taxonomiei controversate a speciilor care îi aparțin.

Genul conține cele mai mari ephemeroptere existente din lume, cu dimensiunea corpului între 25-40 mm și lungimea aripilor anterioare de până la 30 mm.

Doar patru specii au distribuție paleartică (Demoulin 1965; Bauernfeind și Soldán 2012; Soldán și Landa 1986): *P. anatolica* Jacob, 1977, *P. fuliginosa* (Georgi, 1802), *P. longicauda* (Olivier, 1791) și *P. sublongicauda* Tshernova, 1949. Datele despre specia afrotropică, *P. apatris* (Demoulin, 1965) și cea indomalayană, *P. orientalis* Chopra, 1927, sunt considerate îndoielnice sau insuficient cunoscute (Bauernfeind și Soldán 2012), la fel ca datele despre distribuția *P. anatolica* Jacob, 1977, care a fost descrisă din partea asiatică a Turciei de Jacob (1977) pe baza unui singur individ de sex masculin.

Trei specii au fost înregistrate până în prezent în limitele geografice ale Europei. Specia tip a genului, *P. longicauda* (Olivier, 1791), este probabil cea mai cunoscută ephemeropteră, datorită roirii sale impresionante și a duratei scurte de viață a adultului.

Cercetările noastre în vederea elaborării tezei de doctorat s-au desfășurat pe raza **Rezervației Biosferei Delta Dunării (RBDD)**, a **râului Prut** (RONPA0573 Râul Prut; ROSCI0213 Râul Prut, ROSPA0168 Râul Prut), pe raza **râului Mureș** (Parcul Natural Lunca Mureșului; ROSPA0069 și ROSAC0108 Lunca Mureșului Inferior) și pe raza **râului Bega**, iar pe baza unui efort mare de eșantionare al speciei *P. longicauda* în arealul său cunoscut în prezent, în sud-estul Europei și prin colaborare cu cercetători din Ungaria, Ucraina și Slovacia, am analizat mai multe populații și am comparat cu exemplare suplimentare, inclusiv *P. fuliginosa* și probabil *P. sublongicauda* din colecția lui Landa și Soldán.

Obiectivele studiului:

- ✚ Estimarea arealului de răspândire actuală a speciei pe teritoriul României și detectarea tendințelor de evoluție a efectivelor populaționale de-a lungul Dunării și principalii afluenți;
- ✚ Estimarea diversității genetice a populațiilor de *Palingenia longicauda* din România, identificarea haplotipurilor și compararea cu populațiile din bazinul Tisei;
- ✚ Reexaminarea colecției originale a lui Soldán pentru a clarifica prezența celor trei specii de *Palingenia* în sud-estul Europei, folosind metode integrative;
- ✚ Identificarea populațiilor criptice aplicând metodologia "citizen science";

- Reevaluarea statutului de protecție a speciei *Palingenia longicauda* de-a lungul Dunării și includerea în Listele Roșii Naționale, precum și dezvoltarea unui management eficient pentru conservarea durabilă a acestei specii.

Cuvinte cheie: Biogeografie conservativă, râuri, *Palingenia longicauda*, taxonomie integrativă, refugii, diversitate genetică, Delta Dunării, Prut, Mureș, servicii către societate

CAP.I

1.1 Ephemeropterele (Insecta: Ephemeroptera)

1.1.1 Originea și evoluția ephemeropterelor

Ephemeroptera este un ordin ancestral de insecte, care datează din Carboniferul târziu, de aproximativ 290 milioane de ani (Brittain and Sartori, 2003; Barber-James și colab., 2008). Perioada Permiană confirmă faptul că grupul era deja prezent la sfârșitul Paleozoicului (Sartori and Brittain, 2015). Se consideră că au atins diversitatea maximă în Mezozoic (Brittain and Sartori, 2003), în special Jurassic și Cretacic (Sartori și Brittain, 2015).

Ephemeropterele sunt considerate ca fiind cele mai vechi și mai primitive grupe de insecte existente în prezent (Edmunds and McCafferty, 1988). Ephemeropterele se găsesc în aproape toate apele dulci din lume, cu excepția Antarcticii, regiunea înaltă a Arcticii și câteva insule oceanice. Câteva specii de Baëtidae din America de Sud sunt aparent semiterestriale (Brittain, 1982).

1.1.2 Încadrarea sistematică a ephemeropterelor

Încadrarea sistematică a ordinului Ephemeroptera:

(Bauernfeind și Soldán 2012; <http://www.faunaeur.org>)

Regnul Animalia

Subregnul Eumetazoa

Încregătura Hexapoda

Subîncregătura Hexapoda

Clasa Insecta

Ordinul Ephemeroptera

1.1.3 Biologia și ecologia ephemeropterelor

În Bauernfeind și Soldán, 2012, ephemeropterele sunt descrise ca insecte hemimetabole, ce sunt caracterizate printr-un ciclu de viață complex, format dintr-un stadiu acvatic (*ou*, *nimfă*) și stadiu aerian (*subimago*, *imago*). Sunt unice printre insecte în a avea două etape înaripate pentru

aduți, *subimago* și *imago* (Brittain,1982). Aduții nu se hrănesc, ci se bazează pe rezervele acumulate în timpul vieții lor nimfale. Ca aduți, în general, trăiesc de la 1 la 2 ore până la câteva zile, iar cea mai mare parte a vieții lor o petrec în mediul acvatic, fie ca ouă, fie ca nimfe. Durata de viață nimfală la ephemeroptere variază de la 3 la 4 săptămâni, până la mai mult de 2 ani (Studemann și colab, 1992; Sartori și Brittain, 2015).

Nimfele suferă o serie de năpârliri pe măsură ce cresc, numărul precis fiind variabil în cadrul unei specii, în funcție de factorii externi, cum ar fi temperatura, disponibilitatea alimentelor și viteza curentă (Brittain și Sartori, 2003). Au fost înregistrate între 10 și 50 stadii de năpârlire (Ruffieux și colab., 1996, Barber-James și colab., 2008).

Din nimfe, apare un stadiu foarte asemănător cu aduții, așa numiții *subimago*. Există o diferență vizibilă între aduți, *imago* și *subimago*. Vârsta *subimago*-ului diferă, după gen, de la câteva minute, până la 2-3 zile. La sfârșitul perioadei el năpârlește încă o dată ca să devină *imago*, având o colorație mai vie, iar aripile hialine (Bogoescu, 1958; Sartori și Brittain, 2015).

CAP.II

Filogeografia și biogeografia conservativă a speciei *Palingenia longicauda*

(OLIVIER,1791);

*Studiu de caz- Revenirea rusaliilor Palingenia longicauda (OLIVIER,1791)
(Ephemeroptera:Palingeniidae) în S-E Europei¹*

¹Acest capitol conține părți ușor modificate din următorul articol publicat:

Avar L. DÉNES · Romina M. VAIDA · Emerencia SZABÓ · Alexander V. MARTYNOV · Éva VÁNCSA · Beáta UJVÁROSI · Lujza KERESZTES (2022) *Cryptic survival and an unexpected recovery of the long-tailed mayfly Palingenia longicauda (Olivier, 1791) (Ephemeroptera: Palingeniidae) in Southeastern Europe*. Journal of Insect Conservation, <https://doi.org/10.1007/s10841-022-00425-z>.

1. Introducere

În a doua jumătate a secolului al XX-lea *P. longicauda* a fost considerată dispărută în cea mai mare parte a arealului său istoric (Russev 1987; Soldán și colab. 2009; Bauernfeind și Soldán 2012). În deceniile anterioare, *P. longicauda* a fost considerată a fi limitată doar la râul Tisa (sau Tisza, Tysa) și la râul inferior al afluenților săi și la râul Rába (sau Raab) (Andrikovics și colab.1992; Kovács și colab. 2001). Această zonă corespunde cu aproximativ 2% din arealul său

anterior. În 2012, Bálint și colab. au publicat un studiu cuprinzător care au inclus 245 de exemplare din populațiile existente din bazinul râului Tisa și râul Rába, care a evaluat pierderea diversității genetice cauzată de pierderea pe scară largă. Rezultatele lor au arătat o diversitate genetică mare neașteptată și o diferențiere genetică semnificativă între populațiile din râul Tisa (228 exemplare) și râul Rába (17 exemplare). Autorii au ajuns la concluzia că specia a supraviețuit probabil în ultima mare Glaciațiune (LGM) în două refugii mijlocii ale Dunării, sugerând posibilitatea ca specia să fi persistat în cursul secolului al XX-lea în râul Rába, în populații mici și nedetectate.

În ultimii ani au fost publicate câteva noi rapoarte ale *P. longicauda*, care indică prezența speciei în fluviul Dunărea din Ungaria (Málnás și colab. 2016), Delta Dunării din România (Soldán și colab. 2009; Bulánková și colab. 2013; Pavel și colab. 2019) și Ucraina (Afanasyev și colab. 2020), râurile Prut și Nistru din Republica Moldova (Munjiu, 2018) și în râul Styr și râul Horyn' (adică bazinul râului Pripyat) din Ucraina (Martynov, 2018 – ca *Palingenia fuliginosa* (Georgi, 1802), identificare greșită).

În contextul acestor populații recent raportate, ne-am concentrat pe identificarea de noi habitate potențiale și pe detectarea coloniilor de larve de *P. longicauda* pe marile râuri ale României. Obiectivele noastre au fost să evaluăm condițiile ecologice ale tronsoanelor de râu în care este prezentă specia, densitatea (numărul de indivizi *P. longicauda* pe m²) a populațiilor locale și diversitatea genetică moleculară a speciei în întreaga zonă de distribuție extinsă.

Prin urmare, prezentul studiu se concentrează pe două ipoteze alternative:

Ipoteza 1. Prezența speciei în sectorul inferior al Dunării (inclusiv în Delta Dunării și râurile care sunt legate de aceasta) este rezultatul unor evenimente recente de recolonizare din refugiile medi-dunărene deja raportate sau din bazinul râului Tisa. Noi prezicem că nu există o diferențiere genetică între populațiile din sistemele fluviale Tisa sau Rába și populațiile studiate din sud-estul Europei. Mai mult, prezicem că diversitatea genetică a populațiilor din Delta Dunării și râul Prut este considerabil mai scăzută, datorită efectului fondator al recolonizării recente.

Ipoteza 2. În schimb, prezența masivă a speciei în Delta Dunării și râul Prut reprezintă populații trecute cu vederea, sugerând o refacere a unor populații autohtone. În acest caz, prezicem o mare diversitate genetică și o diferențiere semnificativă între populațiile studiate, similar modelului descoperit de Bálint și colab. (2012) între râul Rába și bazinul hidrografic Tisa.

2. Materiale și Metode

2.1 Metode de eșantionare

Între anii 2018 și 2020, prezența speciei a fost identificată și studiată în 20 de situri: râul Mureș (4 situri), râul Prut (6 situri), Delta Dunării (6 situri) din România; Râul Styr (3 locații) și râul Horyn' (1 sit) în Ucraina (Fig.1). Un individ adult a fost recoltat în orașul Timișoara, indicând

astfel și prezența speciei pe râul Bega. Din păcate, locația coloniei de larve nu a fost încă identificată, prin urmare, acest râu nu a putut fi inclus în nicio analiză ulterioară.

Acolo unde au fost identificate maluri abrupte de argilă, un sector lung de 1 km al malului a fost cercetat pentru a găsi dovezi ale activității larvelor. Larvele au fost colectate cu o versiune îmbunătățită a dispozitivului „Bager”, așa cum este descris în literatură (Lengyel *și colab.* 2004), o lopată semicilindrică cu diametrul de 25 cm și adâncimea de 30 cm, atașată unui mâner modular de 2,5 m, care este similar cu unealta pe care o folosesc pescarii pe râul Prut (Fig.2). La fiecare loc de colectare, din malul râului au fost realizate câte trei prelevări, prin introducerea dispozitivului la o adâncime maximă de aproximativ 2,5 m de la suprafața apei. În acest fel s-a extras o secțiune de 1 m² / 30 cm (aproximativ) din albia râului. Larvele au fost numărate din fiecare unitate de probă (trei probe Bager pe 1 m²). A fost estimată starea coloniilor, pe baza numărului mediu de larve din fiecare unitate de prelevare, iar abundența a fost estimată pe baza valorilor care au fost recomandate de Russev (1987) și Lengyel *și colab.* (2004).

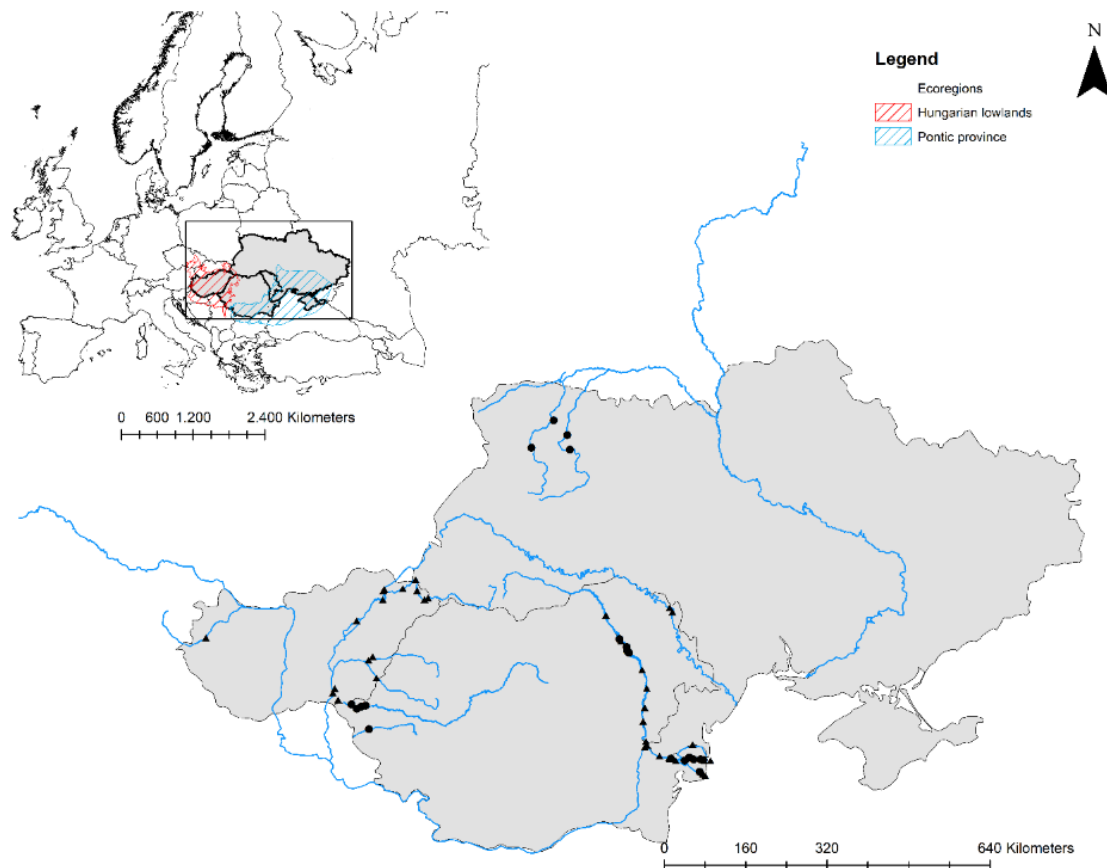


Fig. 1 Distribuția speciei *P. longicauda*.

Punctele reprezintă situri identificate prin acest studiu în România (Mureș, Delta Dunării, râurile Prut și Bega) și Ucraina (Styr și Horyn'). Triunghiurile arată prezența speciei raportată de literatură în Ungaria (râul Rába și bazinul râului Tisa – Bálint *și colab.* 2012), în Republica Moldova (râurile Prut și Nistru – Munjiu, 2018) și în România (Delta Dunării – Pavel *și colab.* 2019). Harta mică indică ecoregiunile zonelor joase din Ungaria și regiunii pontice conform ecoregiunilor Uniunii Europene (UE) pentru râuri și lacuri (Agenția Europeană de Mediu, <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/ecoregions-for-rivers-and-lakes>).

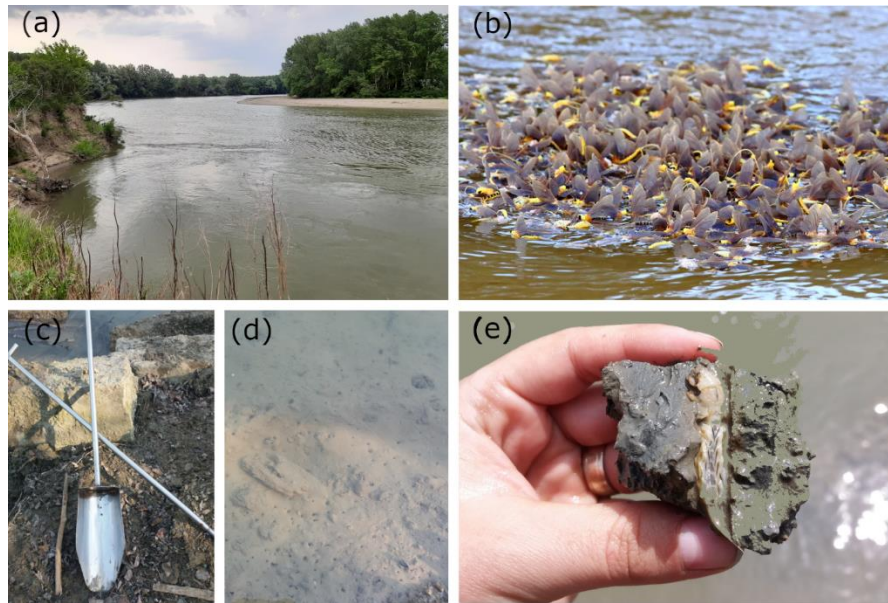


Fig. 2 (a) Habitat tipic pentru *P. longicauda* cu maluri abrupte de argilă (Râul Mureș, Nădlac, jud. Arad, foto: Vaida R.M); (b) grup de indivizi care participă la o roire masivă (Delta Dunării, Maliuc, jud. Tulcea, foto: Petrescu D.); (c) dispozitiv “Bager” modificat; (d) galerii de larve în formă de U (Râul Prut, jud. Iași, foto: Vaida R.M.); (e) larvă de *P. Longicauda* în galerie (Râul Mureș, Nădlac, jud. Arad, foto: Vaida R.M.).

2.2 Secvențierea ADN-ului

Am considerat că toți indivizii care au fost colectați dintr-un râu aparțin aceleiași populații, prin urmare, nu am inclus în analiza genetică exemplare din fiecare loc de colectare. Indivizii colectați din râul Styr (7 exemplare) și râul Horyn (5 exemplare) au fost grupați împreună în analiză ca bazin al râului Pripyat.

ADN-ul genomic a fost extras din 196 de specimene, folosind kitul ISOLATE II Genomic DNA (Bioline Meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, OH, SUA). Pentru a putea integra datele de secvență ale populațiilor maghiare (Bálint *și colab.* 2012), au fost amplificate o secțiune de 471 de perechi de baze (bp) a genei *mtCOI* și un fragment de 464 bp din *mt16S* LSU. Secvențele *mtCOI* au fost amplificate folosind perechea de primeri Jerry (Simons *și colab.* 1994) – S20 (Pauls *și colab.* 2006). Perechea de primeri 16Sar (Simons *și colab.* 1994) – 16SB2 (Monaghan *și colab.* 2007) a fost utilizată pentru amplificarea *mt16S* LSU. Produsele PCR purificate au fost trimise la MacroGen Europe (Amsterdam, Olanda) pentru secvențiere. Secvențele rezultate au fost verificate pe site-ul web NCBI utilizând un instrument de căutare de aliniere locală de bază (BLAST) (Johnson *și colab.* 2008). Secvențele au fost aliniat în BioEdit versiunea 7 (Hall, 1999) folosind algoritmul de aliniere multiplă Clustal W, iar concatenarea a fost efectuată manual. Secvențele consens au fost depuse în GenBank (numere de acces, *mtCOI*: MW716042 – MW716237; *mt16S* LSU: MW717693 – MW717888).

2.3 Estimarea diversității genetice

Numărul de haplotipuri și situsuri polimorfe (S), haplotipul (Hd), diversitatea nucleotidelor (π) ale *mtCOI*, *mt16S* LSU și seturile de date concatenate au fost calculate în DnaSp 6 (Rozas și colab. 2017). Indicii de diversitate genetică au fost calculați separat pentru setul de date care a fost generat de prezentul studiu și de Bălint și colab. (2012), precum și pentru seturile de date combinate. Diversitatea genetică a fost estimată și pentru secvențele care au fost grupate, pe baza râurilor studiate.

2.4 Teste de diferențiere între populații

Seturile de date *mtCOI* și *mt16S* LSU au fost verificate în raport cu informații filogenetice conflictuale, pe baza topologiei arborilor Neighbour-Joining, care au fost generate folosind 10.000 de replici bootstrap în Mega X (Kumar și colab 2018). Filogeniile au fost estimate în continuare pentru *mtCOI*, *mt16S* LSU și setul de date concatenat folosind o rețea de haplotip Median-Joining (MJ) care a fost implementată în PopArt 1.7 (Leigh și Bryant 2015).

Diferențierea genetică între populațiile care reprezintă diferite râuri studiate a fost estimată folosind un test exact de diferențiere a populației (ETPD) bazat pe frecvențele haplotipurilor (Raymond și Rousset 1995) și cu valorile F_{ST} pe perechi folosind Arlequin 3.5 (Excoffier și Lischer 2010). Diferențierea genetică a fost evaluată în continuare folosind analiza ierarhică a varianței moleculare (AMOVA), care a fost implementată în Arlequin 3.5 (Excoffier și Lischer 2010).

2.5 Distribuțiile nepotrivite și testele de neutralitate selective

Distribuțiile de nepotrivire au fost calculate pentru a identifica modelele demografice istorice pentru populațiile râurilor studiate. Calculele au fost efectuate folosind setul de date concatenat din Arlequin 3.5 (Excoffier și Lischer 2010) sub un model de expansiune bruscă, cu 10.000 de replici bootstrap. O distribuție unimodală arată că o descendență a suferit o expansiune recentă a populației, în timp ce o distribuție multimodală sugerează o dimensiune constantă a populației sau o subdiviziune geografică (Marjoram și Donnelly 1994). Adecvarea acestui model a fost evaluată utilizând suma deviațiilor pătrate (SSD) și indicele de raggedness al lui Harpending (RI) (Harpending 1994). Indicele D al lui Tajima (Tajima 1989) și testul F_s al lui Fu (Fu 1997) au fost de asemenea calculate folosind Arlequin 3.5 (Excoffier și Lischer 2010), cu 10.000 de eșantioane simulate. Cele două teste sunt utilizate frecvent în combinație cu distribuțiile de nepotrivire pentru a indica expansiunea demografică recentă.

3. Rezultate

3.1 Noi populații de *Palingenia longicauda* în sud-estul Europei

Pe râul Mureș din România, coloniile de larve au fost identificate pentru prima dată în apropierea limitei de vest a orașului Arad și au fost prelevate din malul argilos al râului spre orașul

Nădlac (zona Parcului Natural Lunca Mureșului), cu o lungime totală de aproximativ 88 km, sectorul de râu fiind investigat cu barca. Numărul mediu de larve a fost mare, 83,25 indivizi/m² (N=36 eșantion), ceea ce reprezintă o densitate mare și o stare „bună” a coloniilor, conform Russev (1987) și Lengyel și colab. (2004). Numărul de larve a fost variabil între situri, de la 69 indivizi/m² (Semlac, România) până la 99 indivizi/m² (lângă Nădlac, România).

În cazul râului Prut, care reprezintă granița dintre România și Republica Moldova, am investigat malul românesc, o porțiune de 60 km a râului între localitățile Șendreni și Țuțora și au fost prelevate cinci situri cu condiții de habitat aproape naturale.

Colonii de larve au fost prezente și eudominante în fundul argilos al fiecărui sit, cu un număr mediu de 69,6 indivizi/m² (N=45 eșantion). Coloniile au prezentat condiții similare cu cele din râul Mureș, cu densități individuale mari în fiecare locație. Cu toate acestea, s-au observat diferențe importante în numărul de indivizi între diferitele locuri de colectare, variind de la 50 indivizi/m² (Șendreni) până la 108 indivizi/m² (Țuțora), fără nicio modificare aparentă antropică a malului râului.

3.2 Estimări ale diversității genetice

Am generat 196 de secvențe atât pentru markerii *mtCOI*, cât și pentru *mt16S* LSU, reprezentând populații din România și Ucraina. În plus, au fost descărcate 245 de secvențe pentru fiecare marker, reprezentând populațiile maghiare. Doar un individ a fost colectat din râul Bega și a corespuns haplotipului H3. Acest râu nu a fost folosit în nicio analiză ulterioară din cauza lipsei de informații. Cele două râuri din Ucraina, râul Styr (7 indivizi) și râul Horyn' (5 indivizi), au fost grupate ca afluenți ai râului Pripyat.

Rezultatele estimărilor diversității genetice au arătat o diversitate mare de haplotip și o diversitate scăzută de nucleotide pentru fiecare set de date. Secvențele din studiul lui Bálint și colab. (2012) au arătat 31 de haplotipuri pentru *mtCOI*, 53 pentru *mt16S* LSU și 87 pentru alinierea concatenată. Secvențele generate de prezentul studiu au arătat 32 de haplotipuri *mtCOI*, 42 de *mt16S* LSU și 75 de haplotipuri pentru setul de date concatenat. Seturile de date combinate de 441 de secvențe pentru fiecare marker au arătat 57 de haplotipuri *mtCOI* (6 prezente în ambele seturi de date), 86 de haplotipuri *mt16S* LSU (9 partajate de ambele seturi de date) și 148 de haplotipuri (14 partajate între cele două seturi de date) pentru markerii concatenați. Estimările diversității genetice au arătat rezultate similare atunci când secvențele au fost grupate în funcție de râuri. Diversitatea haplotipului a variat de la 0,67 la 0,81 pentru secvențele *mtCOI*, de la 0,45 la 0,81 pentru secvențele *mt16S* LSU și de la 0,76 la 0,93 pentru setul de date concatenat. Distribuția geografică a haplotipurilor este rezumată în rețeaua filogenetică (Fig.3).

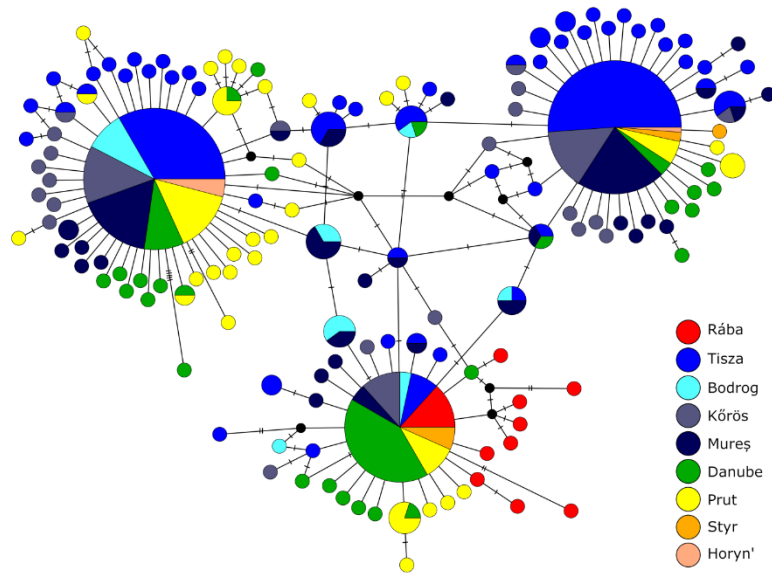


Fig.3 Rețeaua haplotipului median-Joining generată pentru setul de date concatenat folosind PopArt 1.7. Fiecare cerc reprezintă un haplotip unic, iar dimensiunea cercului este proporțională cu numărul de mostre observate pentru acel haplotip. Numărul de mutații este reprezentat de semne de hașura pe linii. Culoarea corespund diferitelor râuri. H1, H2 și H3 corespund celor trei haplotipuri majore discutate în text.

3.3 Structura populației și modele de diversitate

Arborele Neighbour-Joining au arătat rezultate similare atât pentru alinierea secvenței *mtCOI* și *mt16S* LSU, cât și pentru setul de date concatenat. Deoarece nu au fost observate informații filogenetice contradictorii, iar topologiile arborelui au fost similare cu cele arătate de analiza rețelei MJ, aceste date nu au fost prezentate sau discutate în continuare (Figura 3, Figura S1).

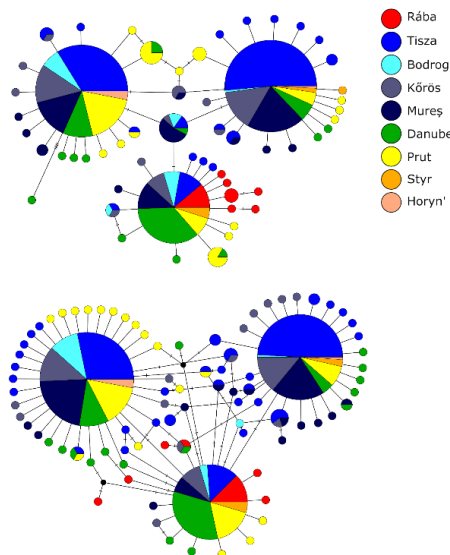


Fig. S1 Rețeaua haplotipului median-Joining generată pentru alinierea secvenței *mtCOI* (sus) și *mt16S* LSU (jos) folosind PopArt 1.7.

Rețelele MJ au avut topologii similare în formă de stea pentru ambii markeri separat, precum și pentru setul de date concatenat (Fig. 3) prin urmare, doar acesta din urmă a fost discutat în continuare. Rețeaua nu prezintă nicio structură geografică în distribuția haplotipului. Trei haplotipuri frecvente domină rețeaua (denumite în continuare H1, H2 și H3), reprezentate de indivizi din aproape fiecare râu (Fig.3). Dintre aceste haplotipuri comune, doar H1 a fost găsit în populația râului Rába. Tisa și afluenții săi (râul Bodrog, două râuri Kőrös și râul Mureș) au două haplotipuri suplimentare cu Delta Dunării și unul cu râul Prut, pe lângă cele trei comune. Populațiile Deltei Dunării și a râului Prut au trei haplotipuri comune suplimentare (Fig.3). Majoritatea haplotipurilor identificate au fost limitate doar la unul dintre râurile studiate. Exemplarele care au fost colectate din râul Bodrog au reprezentat 7 haplotipuri, dintre care doar 1 era privat. În bazinul râului Pripyat, din 4 haplotipuri 1 a fost privat. În schimb, din cele 10 haplotipuri care au fost identificate în populația râului Rába, doar 1 a fost comun, iar celelalte 9 au fost endemice. Numărul de haplotipuri private în alte râuri a variat de la 55,17% din numărul total de haplotipuri, la 78,12%, cu o medie de 69,92%.

Calculul F_{ST} pe perechi de populație au arătat o diferențiere semnificativă statistic între râul Rába și populațiile prezente pe fiecare râu studiat, cu o medie de $F_{ST} = 0,310$ (Tabel 1). Cea mai mică diferență pe perechi a fost prezentată între râul Rába și Delta Dunării ($F_{ST} = 0,155$, $p < 0,001$). ETPD nu arată nicio diferențiere între populațiile celor două râuri ($p = 0,19$; Tabel 1). Valorile F_{ST} au fost semnificative statistic atunci când râul Tisa a fost comparat cu Delta Dunării ($F_{ST} = 0,128$; $p < 0,001$) și râul Prut ($F_{ST} = 0,111$; $p < 0,001$). Aceste diferențe au fost susținute și de valorile de diferențiere semnificative statistic ($p < 0,001$) ale ETPD (Tabel 1). O diferență mai mică, dar și semnificativă statistic a fost observată între Delta Dunării și râul Prut ($F_{ST} = 0,064$, $p < 0,001$), cu un puternic suport pentru diferențiere la $p < 0,001$ (Tabel 1).

Analiza varianței moleculare a arătat că cea mai mare parte a variației a fost găsită în locurile de colectare individuale (89,20%, $F_{ST} = 0,108$, $p < 0,001$), urmată de varianța între populațiile din diferite râuri (7,85%, $F_{CT} = 0,078$, $p < 0,001$). Cea mai mică variație a fost găsită între locurile de colectare din cadrul diferitelor râuri (2,95%, $F_{SC} = 0,032$, $p < 0,05$). Analiza varianței moleculare (AMOVA) a arătat că există o structură genetică puternică la două dintre nivelurile testate ale ierarhiei structurale (în locurile de colectare: $F_{ST} = 0,108$, $p < 0,001$; printre râuri: $F_{CT} = 0,078$, $p < 0,001$). În aceste cazuri, ipoteza nulă a lipsei de diferențiere poate fi astfel respinsă.

Tab.1 Diferențierea genetică a populațiilor din diferitele râuri. Valori perechi F_{ST} (stânga jos) și rezultate semnificative ale ETPD (dreapta sus) ale populațiilor existente. Valorile boldate sunt semnificative la: **<0,001 și *<0,01.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1) Rába		+**	+**	+**	+**	-	+	-
(2) Tisa	0.372**		-	-	-	+**	+**	-
(3) Bodrog	0.382**	0.174**		-	-	-	-	-
(4) Körös	0.333**	0.002	0.107*		-	+**	-	-
(5) Mureș	0.346**	0.001	0.117*	-0.009		+**	+**	-
(6) Delta Dunării	0.155**	0.128**	0.060	0.073*	0.082**		+**	-
(7) Prut	0.312**	0.111**	0.022	0.054*	0.069**	0.064**		-
(8) bazin Pripyat	0.276**	0.006	0.089	-0.028	-0.022	-0.011	0.026	

3.4 Distribuțiile nepotrivite și testele de neutralitate selective

Analiza istoriei demografice pentru întregul set de date arată o abatere semnificativă de la echilibru. Atât indicele D al lui Tajima, cât și testul F_s al lui Fu au arătat valori negative cu un sprijin semnificativ (D Tajima = -2,393, $p < 0,001$; F_s al lui Fu = -25,762, $p < 0,001$), iar diagrama de distribuție a nepotrivirii (Figura S2) se potrivește bine cu modelul de expansiune bruscă a populației (SSD = 0,0119, $p = 0,062$; indicele de raggedness = 0,028, $p = 0,16$).

Rezultate similare au fost observate la scară regională. D-ul lui Tajima și F-urile lui Fu au arătat valori negative și abateri semnificative de la echilibru pentru fiecare populație, cu excepția râului Bodrog și a afluenților Pripyat (Tabelul 2). Valorile semnificativ negative indică o expansiune demografică recentă. Diagramele de distribuție a nepotrivirii arată distribuția unimodală și, împreună cu valorile SSD și Raggedness, susțin o expansiune demografică recentă pentru populațiile fiecărui râu, cu excepția afluenților Pripyat (Tabelul 2, Figura S2).

Tab.2 Rezultatele testelor de distribuție nepotrivită și de neutralitate pentru întregul set de date, cele două linii identificate de BAPS și pentru populațiile din diferite râuri.

	Mismatch distribution				Test of selective neutrality			
	SSD	p	RI	p	Tajima's D	p	Fu's F_s	p
All	0.011	0.062	0.028	0.162	-2.393	0.000	-25.762	0.000
Rába	0.049	0.078	0.199	0.046	-1.818	0.021	-5.399	0.0008
Tisa	0.015	0.290	0.032	0.461	-1.801	0.008	-26.433	0.000
Bodrog	0.006	0.736	0.029	0.908	-0.258	0.442	-1.556	0.152

Körös	0.021	0.093	0.047	0.191	-1.515	0.044	-15.278	0.000
Mureș	0.015	0.115	0.041	0.183	-1.335	0.068	-23.833	0.000
Delta	0.016	0.317	0.034	0.452	-1.938	0.008	-23.071	0.000
Prut	0.008	0.054	0.026	0.199	-1.829	0.012	-25.914	0.000
Pripyat	0.120	0.009	0.284	0.043	1.159	0.880	1.578	0.809

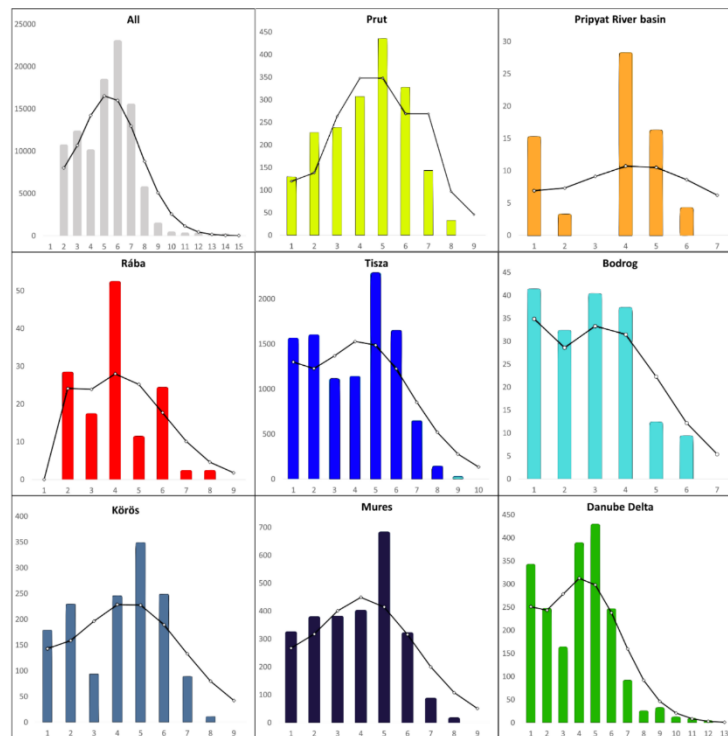


Fig. S2 Histogramele de distribuție nepotrivite, pentru întregul set de date (All) și pentru populațiile din fiecare râu. Barele indică valorile observate, iar liniile negre arată distribuția așteptată în cadrul modelului de expansiune bruscă.

4. Discuții

4.1 Diversitatea genetică a speciei *P. longicauda*

Extinderea analizelor moleculare la aria de distribuție mai largă a speciei *P. longicauda* ne-a permis să avem o perspectivă mai cuprinzătoare asupra structurii genetice a speciei. Cei doi markeri mitocondriali studiați arată o diversitate mare de haplotip și o diversitate scăzută de nucleotide pentru specie. Acest model a fost observat la fiecare populație studiată din România și Ucraina, ceea ce este similar cu modelul care a fost observat pentru populațiile din Ungaria (Bálint și colab. 2012).

Indivizii care au fost colectați din râul Styr (7 exemplare) și râul Horyn (5 exemplare) au fost grupați împreună în analiză ca bazin al râului Pripyat. Aceste probe au fost înregistrate ca *P. fuliginosa* de către Martynov (2018), pe baza unui studiu morfologic al larvelor și subimago-urilor. Materialul ADN al acestor specimene a fost planificat inițial pentru a fi utilizat ca specie din afara

grupului în studiul de față, dar investigarea secvențelor lor mitocondriale a arătat că acestea aparțin defapt speciei *P. longicauda*.

Această identificare greșită a fost confirmată ulterior de o investigație a organelor genitale imago -masculine. Grupul bazinului râului Pripyat nu a arătat nicio diferențiere semnificativă statistic față de niciunul dintre râurile studiate. Acest lucru se datorează probabil dimensiunii reduse a eșantionului și frecvenței ridicate a celor trei haplotipuri comune și arată necesitatea unui studiu mai intens de eșantionare și a unui studiu genetic al populației, cu accent pe această regiune.

Rezultatele sugerează că există o structură genetică semnificativă în setul de date concatenat al celor doi markeri studiați. Calculele diferențierilor pe perechi indică diferențe semnificative statistic între populațiile Deltei Dunării, râului Prut, râului Rába și râului Tisa. Cea mai mică valoare semnificativă statistic a diferențierii pe perechi a fost prezentată între populațiile râului Rába și din Delta Dunării. În acest caz, ETPD nu a confirmat diferențierea. Aceste rezultate au fost confirmate în continuare de AMOVA, care a arătat o structură genetică puternică la cele mai înalte niveluri testate ale ierarhiei structurale (între râuri: $F_{CT} = 0,078$, $p < 0,001$).

Trei haplotipuri (H1, H2 și H3) au reprezentat 56,13% din totalul indivizilor și au fost prezente în mod obișnuit în aproape fiecare râu. Majoritatea celorlalte haplotipuri au fost endemice pentru diferitele râuri studiate (Fig.3). Frecvența medie a haplotipurilor endemice în râuri a fost de 59,86%, variind de la 25% la 90%.

Șaizeci și unu (61) de haplotipuri au fost identificate în regiunea inferioară a Dunării, cu toate acestea, pe lângă cele trei haplotipuri frecvente (H1 – H3), doar trei haplotipuri suplimentare (H111, H120 și H121) au fost împărtășite de Delta Dunării și populațiile râului Prut. (Fig.3).

În studiul anterior, concentrat pe diversitatea genetică a speciei *P. longicauda*, Bálint și colab. (2012) au stabilit că populațiile din bazinul hidrografic Tisa și populația Rába sunt diferențiate, identificând două regiuni importante pentru conservarea speciei, sugerând că ratele de mutație mitocondrială care au fost observate la alte insecte nu ar fi putut duce la acumularea unui semnal genetic suficient în ultimii 50-60 de ani pentru a avea ca rezultat divergența identificată.

Numărul mare de haplotipuri endemice și diferențierea semnificativă statistic constatată între populațiile din Delta Dunării și râul Prut sunt în concordanță cu constatările acestora, confirmând că populațiile acestor două râuri au avut și istorii independente.

Diversitatea ridicată a haplotipurilor și diversitatea scăzută a nucleotidelor, împreună cu numărul mare de haplotipuri private, endemice, pot sugera o creștere a populației după o perioadă de dimensiune efectivă scăzută a populației (Grant și Bowen 1998). Acest lucru este susținut și de rezultatele D și F_s ale lui Tajima semnificative și negative din punct de vedere statistic (Alcaraz

și Gholami 2020; Ivanova, 2021). Aceste constatări sunt în concordanță cu Ipoteza 2 și arată că indivizii colectați pe Dunăre (în Delta Dunării) și râurile Prut reprezintă populații locale trecute cu vederea. Prin urmare, studiul nostru identifică două regiuni fluviale suplimentare care pot contribui în mare măsură la eforturile de conservare a *P. longicauda* și confirmă supraviețuirea și recuperarea acestei specii în sud-estul Europei.

Regiunea Dunării mijlocii (Rába și bazinul râului Tisa) și sectorul inferior al fluviului Dunărea (Delta Dunării și râul Prut) au doar trei haplotipuri (H20, H38 și H39) în afară de cele trei haplotipuri comune. Specia este considerată a fi un element biogeografic pontic (Haybach, 1998), iar această regiune este acceptată ca un important centru de diversificare și zonă de refugiu pentru multe specii de apă dulce (de exemplu, Bănăduc *și colab.* 2016; Bauernfeind și Soldán 2012; Csapó *și colab.* 2020).

Recolonizarea postglaciară în amonte a Europei de Nord-Vest prin Bazinul Dunării este o paradigmă bine stabilită a zoogeografiei de apă dulce (Bănărescu 1991; Varga 2010). Prin urmare, putem presupune că cele trei haplotipuri frecvente și majore care sunt prezente în aproape fiecare râu din acest studiu ar putea reflecta un efect fondator al unei colonizări în amonte, toate trei ajungând în bazinul Panonic.

Populația din râul Rába reprezintă cea mai vestică și cunoscută distribuție existentă a speciei. Indivizii din acest râu corespund exclusiv lui H1 și haplotipurilor private legate de acesta, arătând că H1 ar fi putut migra mai departe în amonte, ajungând în părțile de vest ale Europei. Acest lucru este confirmat și de Bálint *și colab.* (2012), care nu au găsit diferențe genetice între populațiile Rába și cele dispărute din Rin, pe baza analizei unei secvențe mitocondriale de 196 bp a specimenelor de muzeu și a populațiilor existente. Distribuția haplotipului nu prezintă un model clar de diferențiere între regiunea Dunării mijlocii (regiunea Panonică) și Dunărea inferioară (regiunea pontică), pe baza celor doi markeri studiați. Cu toate acestea, numărul mare de haplotipuri endemice și numărul redus de haplotipuri comune, împreună cu diferențierea semnificativă statistic care se observă între râurile din cele două regiuni, indică necesitatea unui studiu mai cuprinzător, bazându-se pe un număr mai mare de markeri genetici, sau asupra tehnicilor de secvențiere de generație următoare, pentru a înțelege mai bine istoria filogeografică a *P. longicauda*.

Prezența speciei în cele două râuri ucrainene (râul Styr și râul Horyn') poate fi explicată și printr-o colonizare din regiunea pontică. Râul Pripyat este un afluent al râului Nipru (sau Nipro), care, împreună cu râul Buh de Sud (sau Pivdennyi Buh) și râul Nistru (sau Nistru), este, de asemenea, recunoscut ca un coridor de migrație pentru biota acvatică de pe coasta Mării Negre spre nord-vestul Europei (Bij de Vaate *și colab.* 2002; Jażdżewska *și colab.* 2020; Sworobowicz

și colab. 2020). Prezența speciei în această regiune indică necesitatea unei căutări mai concentrate a acesteia de-a lungul acestui coridor central de migrație.

5. Concluzii

Acesta este primul studiu genetic molecular al populațiilor recent descoperite din sud-estul Europei. Această lucrare confirmă prezența raportată anterior a populațiilor de *P. longicauda* în Delta Dunării și pe râul Prut și arată prezența speciei pe râul Mureș în România. De asemenea, arată prezența speciei pe râul Bega din România și pe râul Styr și râul Horyn' din Ucraina, deși aceste locații necesită investigații suplimentare. Rezultatele, care se bazează pe markerii ADN mitocondrial analizați (mtCOI și mt16S LSU), indică faptul că populațiile de pe râul Prut și râul Dunăre (în Delta Dunării) sunt bine diferențiate de populațiile din bazinul râului Tisa.

Numărul mare de haplotipuri endemice și diferențierile semnificative statistic sugerează că acestea sunt populații locale recuperate, care au fost trecute cu vederea în ultimele decenii. Prin urmare, aceste populații pot oferi o contribuție importantă la supraviețuirea pe termen lung și la conservarea durabilă a speciilor în această parte a Europei. Pe baza observațiilor de teren, prezența speciei este strâns legată de tronsoane de râu aproape naturale din România, unde integritatea hidromorfologică a albiei nu a fost perturbată. Colonii importante de larve au fost detectate doar pe malurile argiloase abrupte cu un debit constant de apă.

CAP.III

Revizia taxonomică a speciei *Palingenia longicauda* (OLIVIER,1791);

Studiu de caz:- Dilema de zeci de ani, rezolvată? Taxonomia integrativă susține una și nu mai multe specii de Palingenia din sud-estul Europei (Insecta, Ephemeroptera, Palingeniidae)²

²Acest capitol conține părți ușor modificate din următorul articol publicat:

Peter Manko¹, **Romina Mirabela Vaida**^{2,*}, Lujza Keresztes², Alexander Martynov³, Emerencia Szabó², Beáta Baranová¹, Béla Kis⁴, Éva Vánca⁵, Avar-Lehel Dénes⁶ - *Integrative taxonomy supports one rather than several species of Palingenia in South-Eastern Europe (Insecta, Ephemeroptera, Palingeniidae)- The European Zoological Journal* 296-306, Vol.90, No.1; <https://doi.org/10.1080/24750263.2023.2191622>

1. Introducere

Palingenia Burmeister, 1839, este un gen mic al familiei de ephemeroptere *Palingeniidae* (Insecta, Ephemeroptera) care are o valoare importantă de conservare pentru integritatea ecologică

a râurilor mari (Bálint și colab., 2012). Genul conține cele mai mari ephemeroptere existente din lume, cu dimensiunea corpului între 25-40 mm și lungimea aripilor anterioare de până la 30 mm, iar caracterele lor morfologice majore au fost rezumate recent de Bauernfeind și Soldán (2012).

Doar patru specii au distribuție paleartică (Demoulin 1965; Bauernfeind și Soldán 2012; Soldán și Landa 1986): *P. anatolica* Jacob, 1977, *P. fuliginosa* (Georgi, 1802), *P. longicauda* (Olivier, 1791) și *P. sublongicauda* Tshernova, 1949. Datele despre afrotropic *P. apatris* (Demoulin, 1965) și indomalayan *P. orientalis* Chopra, 1927, sunt considerate îndoielnice sau insuficient cunoscute (Bauernfeind și Soldán 2012).

Trei specii au fost înregistrate până în prezent în limitele geografice ale Europei. Specia tip a genului, *P. longicauda* (Olivier, 1791), este probabil cea mai cunoscută ephemeropteră, datorită roirii sale impresionante și a duratei scurte de viață a adultului (Russev 1987; Soldán 1997; Haybach 2007).

A doua specie europeană a genului, *P. fuliginosa* (Georgi, 1802), a fost numită și descrisă de Boeber și observată de Georgi în 1802 din Caucaz (vezi referințele în Bauernfeind și Soldán 2012), dar și din Azerbaidjan, Rusia și Iran (Kasymov și Agaev 1986). Specia are o istorie taxonomică controversată, deoarece a fost considerată un sinonim junior al speciei *P. longicauda* pentru o lungă perioadă de timp, dar a fost redescrisă de Tshernova (1949) din partea de sud a Rusiei europene. De asemenea, a fost menționat în mod surprinzător de către Landa (1969) și Landa și Soldán (1985) în simpatie cu *P. longicauda* din râurile Latorica inferioară și râurile Bodrog superioare (bazinul râului Tisa) din Slovacia. Mai târziu, Godunko și Kłonowska-Olejnik (2003) au înregistrat și câțiva indivizi din râul Latorca (Latorca) din Ucraina.

Soldán (1978) a publicat o revizuire generală a speciilor europene de *Palingenia* și conține cele mai cuprinzătoare chei de identificare pentru a distinge între cele trei specii europene de *Palingenia*, bazate în principal pe populațiile slovace (cu excepția *P. sublongicauda*, care au fost cel mai probabil obținute prin împrumut de la Tshernova, din sudul Rusiei).

Cea de-a treia specie europeană, *P. sublongicauda* Tshernova, 1949, a fost descrisă din partea de sud a Rusiei (Tshernova 1949) de Soldán (1978).

Obiectivul prezentei lucrări a fost de a reexamina colecția originală a lui Soldán (Fig.4) pentru a clarifica prezența acestor trei specii de *Palingenia* în sud-estul Europei. Am folosit morfologia cantitativă și secvențele de ADN mitocondrial pentru a testa ipotezele taxonomiei ale speciilor pe baza datelor integrative și a revizui distribuția speciilor pe baza populațiilor nou detectate din sud-estul Europei.



Fig. 4. Colecția de referință a lui Soldán și Landa de *Palingenia* europeană din anii 1970, depusă la Institutul de Entomologie, České Budějovice, Republica Cehă.

2. Materiale și metode

2.1. Eșantionarea și colectarea datelor

Materialul tip al celor trei specii (*P. fuliginosa*, *P. longicauda* și *P. sublongicauda*) înregistrat din Europa nu a fost disponibil în timpul investigațiilor noastre. Cu toate acestea, prezența *P. fuliginosa* în zona studiată a fost raportată de Soldán și Landa; prin urmare, am reexaminat colecția lor de referință de *Palingenia* europeană din anii 1970, depusă la Institutul de Entomologie, Centrul de Biologie CAS, České Budějovice, Republica Cehă (Fig.4). Colecția conține sute de indivizi de *Palingenia* etichetați ca *P. longicauda* și *P. fuliginosa*. Din păcate, colecția nu conține indivizi marcați ca *P. sublongicauda*, în ciuda faptului că Soldán pare să fi lucrat cu indivizi identificați ca *P. sublongicauda* în revizuirea sa (referindu-se la 6 larve, 3 masculi, 1 femelă și 1 subimago din râul Volga, din 1935, fără date de colectare) (Soldán, 1978).

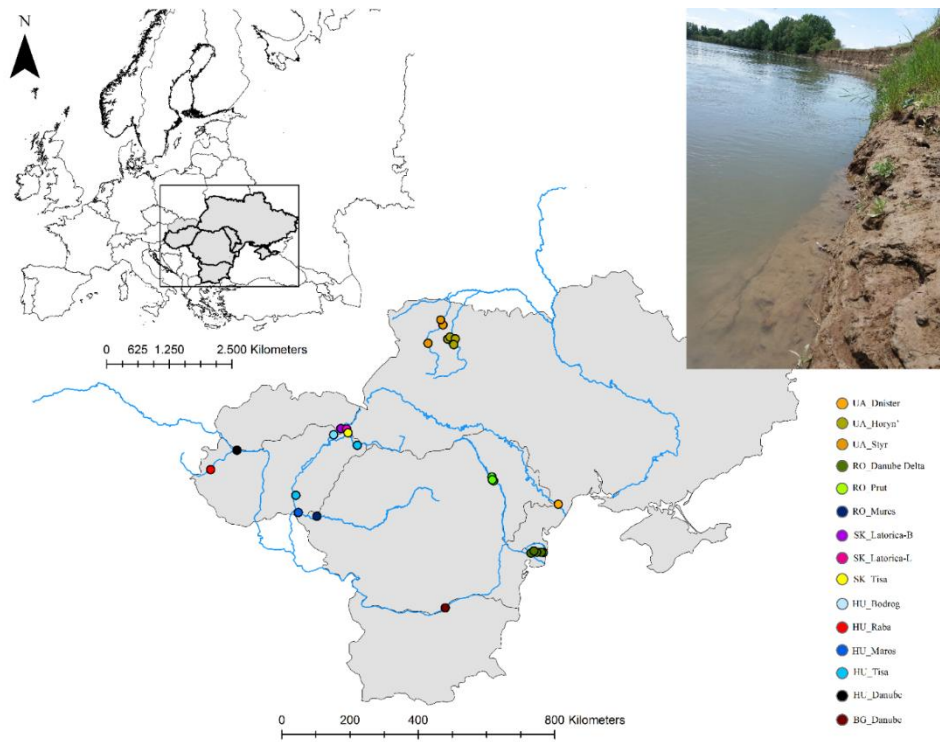


Fig. 5. Harta indică distribuția locațiilor de prelevare analizate. Fotografia din colțul din dreapta sus prezintă un habitat tipic *P. longicauda* cu maluri de argilă abrupte (râul Mureș, Nădlac, județul Arad, foto: Vaida R.)

În revizuirea noastră morfologică, au fost analizate 174 de exemplare de *Palingenia* masculi, din 11 locații diferite de prelevare, reprezentând 7 râuri (Fig. 5). Indivizii analizați din colecția lui Soldán au reprezentat populații din Latorica (Slovacia), Tisa (Slovacia) și Dunăre (Bulgaria). Materialul proaspăt de *Palingenia* a fost colectat din Dunăre (Ungaria și România), Latorica (Slovacia), Tisa (frontiera maghio-slovacă), Mureș (România), Prut (România), Horyn' (Ucraina) și Nistru (Ucraina). Analiza moleculară a inclus material de larve din 5 râuri suplimentare: râul Raba (Ungaria), Tisa (Ungaria), Bodrog (Ungaria), Maros (Ungaria) și Stry (Ucraina) (Fig.5).

2.2 Morfometrie și analize statistice

S-a aplicat morfometria liniară pentru a cuantifica variabilitatea morfologică posibilă între populații. În special, rapoartele caracterelor au fost calculate așa cum sunt utilizate și în revizuirea lui Soldán (1978) și sunt invariante pentru o anumită măsură a mărimii (Mosimann 1970). Caracterele morfometrice analizate în acest studiu au inclus raportul dintre dimensiunea și distanța ochilor compuși, raportul dintre lungimea lobului penisului și distanța dintre vârful lobului penisului, raportul dintre lungimea lobului penisului și lățimea bazei, precum și unghiul lobului penisului a fost calculat pentru a verifica diferențele descrise de Soldán (1978). Măsurătorile au fost făcute folosind fotografiile realizate cu un stereomicroscop echipat cu o cameră digitală.

Analizele ulterioare de imagine (măsurătorile) ale fotografiilor obținute au fost efectuate în ImageJ (ver. 1.53k, Schneider și colab., 2012), așa cum se arată în Fig.6, iar apoi au fost calculate rapoartele date. Analizele statistice rezumative de bază (univariate) ale măsurătorilor morfologice (mediană, medie, abatere standard, minimă, maximă) și analiza componentelor principale (PCA) au fost efectuate în software-ul Past (ver. 4.09; Hammer și colab., 2001).

Unele caractere nu au fost măsurate la fiecare individ din cauza deformărilor cauzate de malformații genitale și modificări (în principal colapsuri oculare compuse) în material mai vechi sau depozitat incorect.

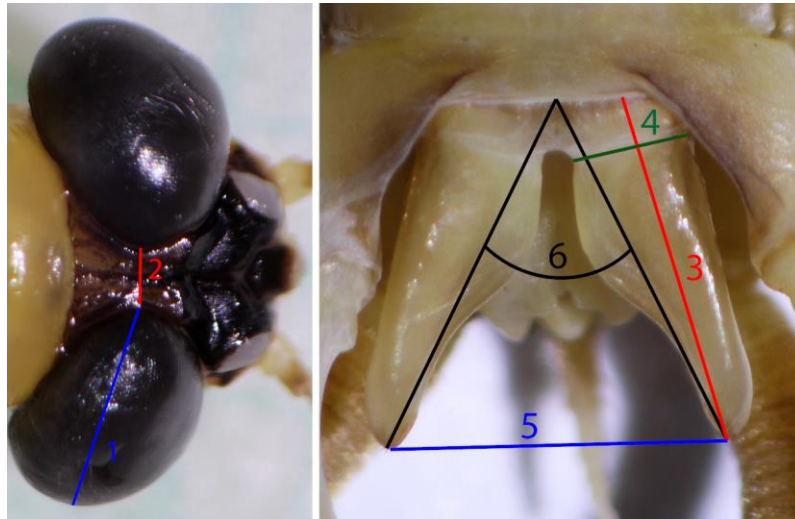


Fig.6 Caractere măsurate pe specimene masculine de *Palingenia* (1 – dimensiunea ochiului compus, 2 – distanța dintre ochii compuși, 3 – lungimea lobului penisului, 4 – lățimea bazei penisului, 5 – distanța dintre vârfurile lobului penisului, 6 – unghiul lobului penisului)

2.3 Metode moleculare și analize de date

Probele de țesut de la 27 de indivizi au fost pregătite și livrate în conformitate cu standardele prescrise către Centrul canadian pentru codificarea ADN-ului (CCDB, Institutul pentru biodiversitate din Ontario, Universitatea Guelph), unde codurile de bare ADN au fost obținute folosind protocolul standard de mare capacitate descris în deWaard și colab., 2008. Datele de colectare a specimenelor, fotografiile, secvențele, PCR, primerii de secvențiere și fișierele de urme sunt disponibile prin intermediul sistemelor de date cu coduri de bare de date (BOLD; Sujeevan și Hebert 2007) sub numele de proiect Macro-zoobentos din apă dulce românească [ROMAC]. Alte trei secvențe au fost generate și la CCDB prin Barcoding Diptera din proiectul românesc de apă dulce [RODI]. Alți 43 de indivizi au fost prelucrați la Institutul de Cercetare Interdisciplinară de Bio–Nano–Științe al Universității Babeș–Bolyai. ADN-ul genomic a fost extras folosind un kit comercial (Kit ADN genomic ISOLATE II, Bioline), iar secvențele *mtCOI*

au fost amplificate folosind perechea de primeri standard LCO1490 și HCO2198 (Folmer și colab. 1994) într-un volum de 50 pl la 42°C. Secvențierea a fost efectuată de Macrogen Inc. (Europa).

Numărul de haplotipuri și situsuri polimorfe (S), haplotipul (Hd) și diversitatea nucleotidelor (π) au fost calculate în DnaSp 6 (Rozas și colab., 2017). O rețea de haplotip a fost construită prin implementarea algoritmului Median-Joining (MJ) în PopArt 1.7 (Leigh și Bryant 2015). Indivizii au fost colorați pe rețea pe baza râurilor pe care au fost colectați, pentru a vizualiza distribuția geografică a haplotipurilor. Distanța p dintre haplotipuri și între populațiile diferitelor râuri a fost calculată în Mega X (Kumar și colab., 2018).

3. Rezultate

3.1 Rezultate morfometrie

Rezultatele analizelor morfologice indică o variabilitate relativ mare între populații, cu diferențe semnificative între medianele eșantionului ale diferitelor populații în toate caracterele morfologice analizate (Tab. 3). Cu toate acestea, diferențele au fost mari și în cadrul populațiilor, prezentând adesea valori duble sau triple. Acest lucru s-a observat, de exemplu, în raportul dintre lungimea și distanța lobilor penisului între mai multe populații (Dunăre – Bulgaria, Delta Dunării – România, Nistru, Horyn – Ucraina, Latorica, Tisa – Slovacia, Mureș – România); în unghiul dintre lobi penisului (delta Dunării – România, Nistru, Horyn – Ucraina, Latorica, Tisa – Slovacia, Mureș – România); sau raportul dintre distanța și lățimea ochilor compuși (Horyn – Ucraina) (Tab.4).

Analiza componentelor principale utilizată pentru a explora structura variației pe baza setului de caractere nu a arătat nicio separare a populațiilor sau speciilor (Fig.7).

Tab 3. Rezultatele testului Kruskal-Wallis de egalitate a medianelor

Kruskal-Wallis	L-D-ratio	Ratio-lobes	Angle-lobes	Ratio-eyes
H (chi2)	48.03	42,00	59.28	62.68
p (same)	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

Tab 4. Rezultatele statisticilor univariate ale caracterelor morfologice particulare ale indivizilor colectați în diferite locații de eșantionare/populații diferite

Population	Danube-BG	Danube-Del-C-RO	Danube-Del-RO	Danube-HU	Dnister-UA	Horyn-UA	Latorica-SK	Latorica-SK1	Mureș-RO	Prut-RO	Tisa-SK
Raportul dintre lungimea și distanța lobilor penisului											
N	12	4	22	2	2	22	24	17	25	30	14
Median	1.009	1.159	1.154	1.136	1.747	1.099	1.079	1.255	1.428	0.997	1.251
Mean	1.070	1.155	1.250	1.136	1.747	1.105	1.153	1.302	1.506	1.006	1.462
Std. Deviation	0.212	0.069	0.401	0.008	1.053	0.147	0.258	0.288	0.438	0.092	0.506
Minimum	0.829	1.071	0.812	1.130	1.002	0.895	0.950	0.962	0.944	0.851	1.043
Maximum	1.597	1.231	2.135	1.141	2.491	1.625	2.179	2.241	3.009	1.232	2.907
Raportul dintre lungimea și lățimea lobilor penisului											
N	12	4	22	2	2	22	24	17	25	30	14
Median	2.705	2.588	2.530	2.811	1.997	2.466	2.518	2.814	2.538	2.591	2.655
Mean	2.629	2.537	2.494	2.811	1.997	2.439	2.485	2.788	2.521	2.587	2.728
Std. Deviation	0.262	0.142	0.220	0.169	0.355	0.119	0.165	0.171	0.208	0.193	0.261
Minimum	2.014	2.333	1.998	2.691	1.746	2.191	2.124	2.423	2.071	2.283	2.389
Maximum	2.893	2.639	3.032	2.931	2.248	2.641	2.817	3.021	2.851	3.000	3.213
Unghiul dintre lobi penisului											
N	12	4	22	2	2	22	24	17	25	30	14
Median	56.471	47.746	47.918	51.691	32.661	50.847	50.695	50.943	40.218	56.554	51.035
Mean	56.411	47.832	48.794	51.691	32.661	50.641	49.959	50.031	40.912	55.545	45.568
Std. Deviation	8.543	4.079	13.609	0.022	16.851	6.573	7.805	8.616	10.493	5.121	11.093
Minimum	38.356	43.289	26.463	51.675	20.746	32.847	26.107	26.633	17.804	45.493	19.225
Maximum	67.216	52.546	68.633	51.706	44.577	64.279	65.175	62.127	64.123	64.539	58.208
Raportul dintre distanța și lățimea ochilor compuși											
N	11	4	22	2	2	23	24	20	8	30	7
Median	5.130	3.881	4.442	3.778	5.594	4.397	4.044	3.905	5.831	5.135	4.238
Mean	5.476	4.004	4.466	3.778	5.594	4.558	4.082	3.945	5.625	5.115	4.467
Std. Deviation	0.841	0.667	0.540	0.145	0.421	0.834	0.465	0.540	1.039	0.692	0.600
Minimum	4.606	3.408	3.407	3.675	5.297	3.331	3.148	3.178	4.121	3.659	3.582
Maximum	7.108	4.847	5.216	3.881	5.892	6.869	5.107	5.329	7.026	6.632	5.208

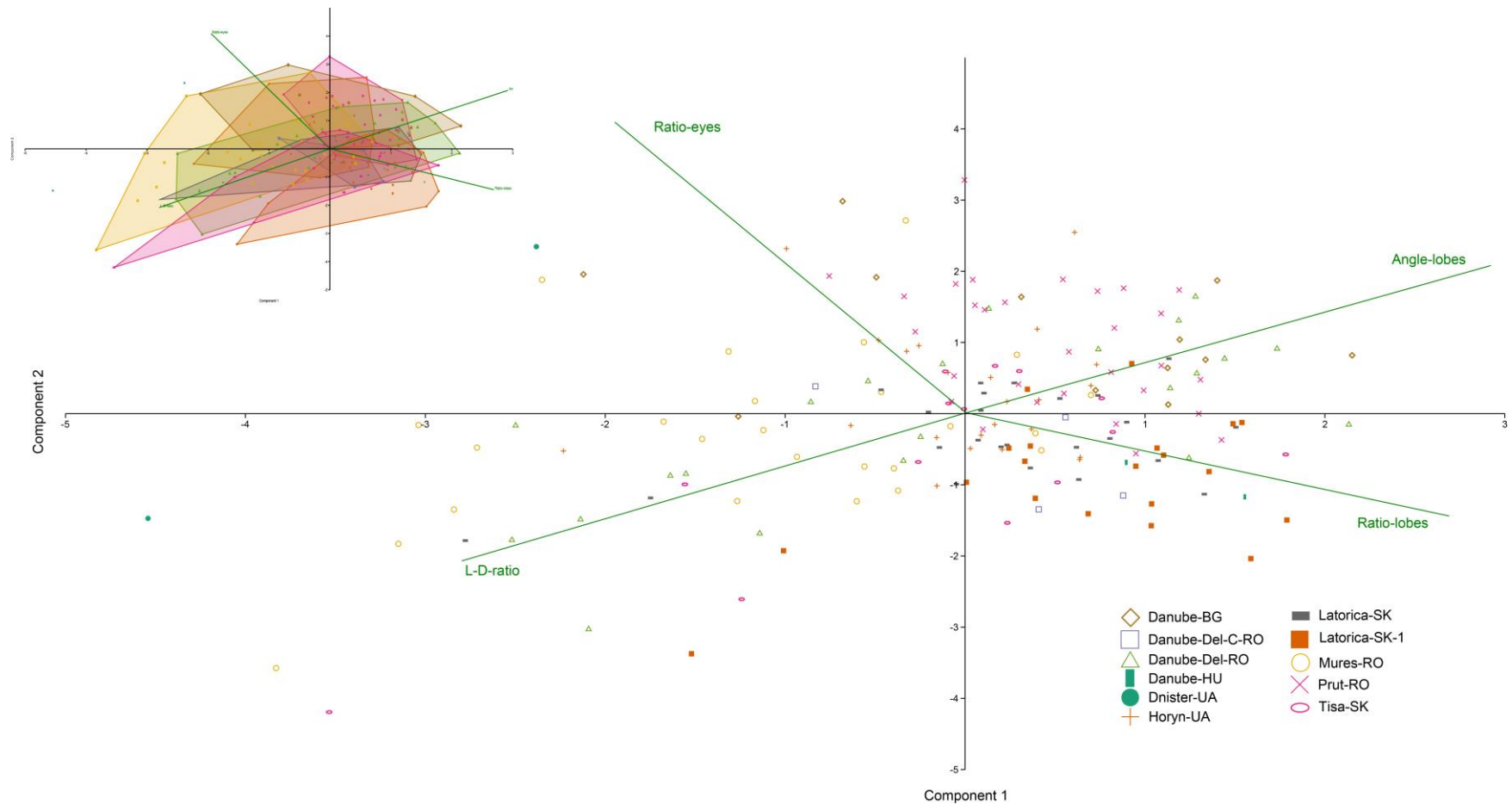


Fig 7. Analiza componentelor principale (PCA) biplot pentru caracterele morfometrice (procentul varianței totale asociate cu PC1: 68,82%; PC2: 22,00%). Culorile și simbolurile diferite reprezintă locații diferite de eșantionare. În colțul din stânga sus, este afișat un grafic identic cu marcarea poligoanelor corespunzătoare diferitelor populații pentru a arăta suprapunerea.

3.2 Rezultate moleculare

Cele 73 de secvențe au prezentat 15 situsuri polimorfe care conduc la 15 haplotipuri, cu o diversitate de haplotipuri de $Hd = 0,576$ și o diversitate de nucleotide de $\pi = 0,00252$. Două haplotipuri au fost comune, corespunzând la 46 și 13 indivizi, iar un haplotip a fost împărțit de două specimene colectate în aceeași locație. Celelalte 12 haplotipuri au fost unice, reprezentate de un singur individ (Fig.8). Distanța p dintre haplotipuri a variat între 0,159 și 1,297. Când secvențele au fost grupate în funcție de diferite râuri, distanța p a arătat valori între 0,22 și 0,89 (Tab.5).

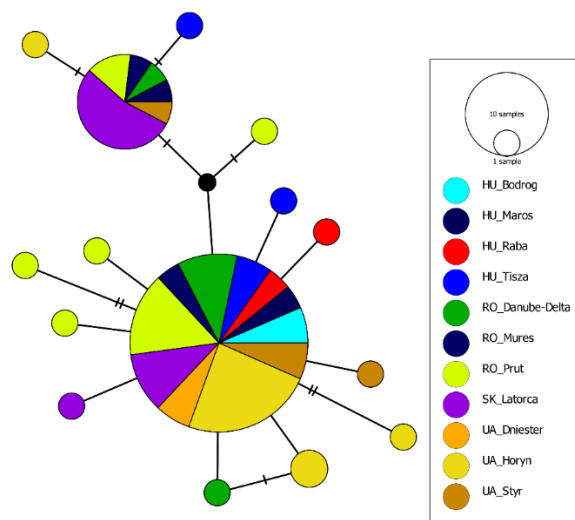


Fig.8 Rețeaua haplotipului median-Joining generată pentru setul de date concatenat folosind PopArt 1.7.

Fiecare cerc reprezintă un haplotip unic, iar dimensiunea cercului este proporțională cu numărul de mostre observate pentru acel haplotip. Numărul de mutații este reprezentat de semne de hașura pe linii. Culorile corespund diferitelor râuri.

Tab. 5 p -distanța (%) între populațiile diferitelor râuri.

	1.	2.	3	4	5	6	7	8	9	10
1. RO_Prut										
2. Hu_Maros	0.43									
3. Hu_Bodrog	0.65	0.60								
4. HU_Raba	0.38	0.39	0.62							
5. HU_Tisa	0.57	0.51	0.59	0.54						
6. UA_Horyn	0.41	0.41	0.61	0.31	0.54					
7. UA_Dniester	0.31	0.34	0.45	0.30	0.44	0.27				
8. SK_Latorca	0.56	0.46	0.89	0.49	0.66	0.56	0.53			
9. RO_Danube Delta	0.40	0.38	0.63	0.25	0.53	0.35	0.29	0.50		
10. RO_Mureș	0.44	0.39	0.72	0.37	0.56	0.42	0.36	0.46	0.39	
11. UA_Styr	0.42	0.38	0.72	0.22	0.56	0.36	0.34	0.45	0.32	0.38

4. Discuție

Pe baza rezultatelor noastre de morfometrie a morfologiei penisului și a distanțelor oculare la masculi, nicio diferență semnificativă nu susține separarea clară a populațiilor analizate și dovezile a mai mult de o specie de *Palingenia* (*P. longicauda*) în Europa.

Redescrierea speciilor europene aparținând genului *Palingenia* (Soldán, 1978) s-a bazat cel mai probabil pe presupunerea incorectă a apariției *P. fuliginosa* în Slovacia. Caracteristicile enumerate de autor ca fiind distinctive în identificarea speciilor au fost reanalizate și s-au dovedit a fi bazate pe variabilitatea intraspecifică observată în acest studiu (Fig.9). Mai mult, este, de asemenea, important de remarcat faptul că unele caracteristici sunt foarte influențate de momentul în care indivizii au fost fixați în etanol după ce subimagourile s-au mutat. Acest lucru se aplică în special, de exemplu, unghiului dintre lobi penisului. În cazul unui subimago, unghiul dintre lobi este foarte ascuțit, iar lobi penisului sunt în esență paraleli. După năpârlire, unghiul crește până se stabilizează. Dacă indivizii sunt colectați și fixați în perioada de prestabilizare, unghiul variază considerabil. Astfel, avem în vedere diferențele morfologice menționate de Soldán (1978) între masculii celor două specii, *P. longicauda* și *P. fuliginosa*, foarte provocați și extrem de variabili, chiar și în cadrul aceleiași populații, depinzând în principal de starea de năpârlire a indivizilor examinați.

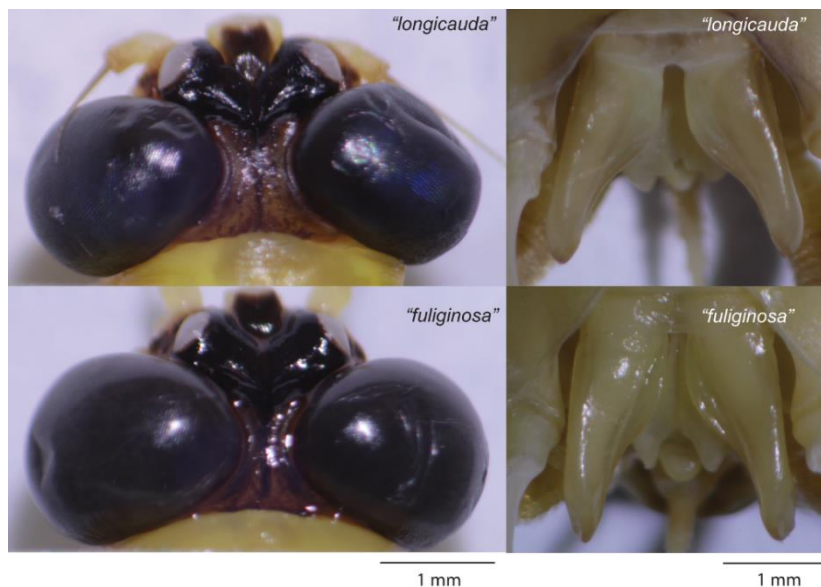


Fig. 9 Diferențele dintre structurile genitale masculine și dimensiunile ochilor compuși la indivizi cu structuri *mtCOI* foarte asemănătoare și eșantionate în același timp dintr-o singură populație (Latorica, Slovacia). Exemplarele descrise aici sunt apropiate din punct de vedere morfologic de descrierea și caracterele prezentate în revizuirea lui Soldán ca *P. longicauda* și *P. fuliginosa* (denumite „*longicauda*” și, respectiv, „*fuliginosa*”).

Analiza ADN mitocondrial a arătat modele similare cu cele observate în studiile genetice moleculare anterioare ale *P. longicauda* (Bálint și colab., 2012; Dénes și colab., 2022), cu un

număr redus de haplotipuri prezente în întreaga zonă de distribuție și alte câteva haplotipuri private. prezente în diferite râuri. Rețeaua de haplotipuri MJ nu a arătat nicio structură evidentă sau bine diferențiată pentru a indica faptul că secvențele ar putea reprezenta mai mult de o unitate taxonomică. Distanțele p scăzute, atât atunci când au fost comparate haplotipurile (0,159 – 1,297) cât și când au fost comparate diferitele populații de râuri (0,22 – 0,89) sunt în concordanță cu valorile distanței intraspecifice publicate anterior pentru specia *Palingeniidae* (Webb și colab., 2012: 1,6 % maxime intraspecifice și 12,7% minime interspecifice). Aceste rezultate susțin datele de micromorfologie, confirmând astfel prezența unei singure specii de *Palingenia*, *P. longicauda*, în partea de sud-est a Europei.

Potrivit Soldán (1978) și, în consecință, adoptat de un număr important de autori care urmează (Andrikovics și Turcsányi 2001; Martynov, 2018), argumentul major pentru prezența *P. fuliginosa* în Europa este stăpânirea speciei pentru diferite cerințe ecologice în comparație cu *P. longicauda*. Nimfele lor au fost colectate frecvent în râuri mai mici, cu ape nepoluate și cu curgere rapidă și aport mare de oxigen, în timp ce *P. longicauda* este prezent doar în sectoarele inferioare ale râurilor mari cu un conținut mai scăzut de oxigen. Cu toate acestea, au existat și unele contribuții care au observat prezența celor două morfotipuri de *Palingenia* într-un același sector de râu (ex. Bodrog în Ungaria; Málnás și colab., 2016) sau chiar specii diferite în același eșantion (Bodrog în Slovacia) (Mišíková Elexová și colab., 2015), ceea ce face ca argumentul menționat mai sus să fie discutabil, iar prezența *P. fuliginosa* în bazinul hidrografic al sectorului mijlociu al râului Tisa foarte îndoielnică. În schimb, aceste constatări resping argumentul lui Soldán și susțin indirect prezența unei singure specii, *P. longicauda*, în partea de sud-est a Europei.

Statutul taxonomic al *P. fuliginosa* rămâne însă contestat, deoarece materialul tip lipsește sau locația lui este necunoscută, iar eforturile noastre repetate de a obține material proaspăt din afara Europei (din Iran, Armenia, Azerbaidjan, de exemplu) au eșuat. Până la găsirea unei soluții taxonomice mai bune, sugerăm reinstalarea *P. fuliginosa* ca sinonim junior al *P. longicauda*.

Situația celei de-a treia specii europene, *P. sublongicauda*, este similară, deoarece nu ne-a fost disponibil niciun material de masculi adulți înainte de investigația morfologică și nici un material tip nu a fost disponibil în timpul studiului de față. Deși statutul taxonomic al acestor specii este discutabil, ele nu pot fi contestate până când nu poate fi efectuată o revizuire taxonomică mai cuprinzătoare a *Palingeniei*, inclusiv specii suplimentare din Asia și regiunile Indomalaya și Afrotropicale.

Contribuția majoră a lucrării de față este prima analiză integrativă a datelor morfologice și moleculare ale speciilor *Palingenia* înregistrate din sud-estul Europei. Pe lângă argumentul nostru puternic privind prezența a doar una, în loc de trei specii de *Palingenia* în Europa, sunt foarte

recomandate eforturi suplimentare de eșantionare cuprinzătoare, inclusiv o analiză a tuturor speciilor din zona paleartică, dar și o revizuire a reprezentanților Indomalayeni și Afrotropici, astfel o revizuire taxonomică bine susținută a genului.

Studiul nostru are, de asemenea, implicații importante de conservare, deoarece toate speciile de *Palingenia* au o valoare mare de bio-indicație a integrității ecologice a râurilor curate de dimensiuni medii până la mari și sunt amenințate critic în mare parte a ariei de distribuție cunoscute (Russev, 1987; Soldán și colab., 2009; Bauernfeind și Soldán 2012).

CAP.IV

Impactul social asupra conservării speciei *Palingenia longicauda* (OLIVIER,1791) în România

Identificarea populațiilor criptice pe baza metodologiei "citizen science"

Fenomenul natural real al roirii în masă al adulților de *Palingenia longicauda* a avut un interes social important în trecut, deoarece se cunoaște încă din literatura de specialitate că această specie era utilizată pe scară largă ca momeală la pescuit. Era cunoscută popular sub varii denumiri: "oeveraas" și "haft" în Olanda, "Spork-Oese", "Sprock", "Spaargos", "Spaargaanse" în Germania, "Tiszavirag" în Ungaria, "gandatsi" pentru larve și "rusalki" sau "karchani" pentru adulți în Bulgaria (Russev, 1987). În România este cunoscută popular sub denumirea de "floarea râurilor" pe Crișuri, "rusalii" în Delta Dunării și Mureș, iar pe râul Prut, sub denumirea de "vetrică". În rețeaua actuală de informații digitalizate, inclusiv diferite platforme de socializare, apar numeroase informații cu privire la această specie, fie ca și o atracție turistică, fie ca informații importante printre pescari; sunt date nesigure, dar care documentează o recuperare neașteptată a speciilor într-o zonă îndepărtată, cum ar fi Delta Dunării, Mureș sau râul Prut din România.

Datorită faptului că s-au înmulțit informațiile de pe rețelele de socializare, am hotărât să apelăm la acești „citizen science” pentru a valorifica datele observate de aceștia, printr-un sondaj. Sondajul a fost realizat cu ajutorul unui chestionar care a avut la bază întrebări referitoare la recunoașterea speciei *P. longicauda* pe baza unor fotografii (atât larva cât și insecta adultă), practici de pescuit (colectarea insectei și folosirea ei ca momeală), cât și întrebări referitoare la locația unde specia e prezentă, cunoștințe despre prezența speciei înainte de anul 2000, și opinia respondenților legată de mărimea populațiilor observate. Chestionarul a fost aplicat locuitorilor, pasionaților de natură și în special pescarilor de pe râurile Prut, Mureș și Delta Dunării. În total

160 de persoane au completat chestionarul: 60 persoane pe râul Prut, 50 pe Mureș și 50 în Delta Dunării.

Chestionarul a fost completat doar de persoanele care au recunoscut specia, majoritatea dintre acestea majoritatea au văzut personal o roire a insectei (Delta Dunării – 76%; Mureș – 98%; Prut – 91.66% dintre respondenți) la sfârșitul lunii Mai – începutul lunii Iunie. Pe baza informațiilor obținute, prezența speciei *P. longicauda* a fost confirmată în partea inferioară a Dunării, lângă localitățile Spantov, Borcea, Capidava și Galați, în Brațul Măcin-Dunărea Veche, și în mai multe locații în Delta Dunării. Rezultate asemănătoare au fost obținute și pe râul Mureș, unde specia a fost raportată pe mare parte a secțiunii dintre localitatea Sâmbeteni și Nădlac și pe râul Prut între Lunca Banului (cel mai sudic punct raportat) până în nordul țării, la localitatea Rădăuți-Prut.

Răspunsurile privind prezența speciei înaintea anilor 2000 diferă în cazul celor trei râuri studiate. În Delta Dunării mai mult de jumătate dintre respondenți (55.1%) au răspuns că au observat prezența speciei înainte de 2000, pe râul Prut aproximativ un sfert (26.67%) au confirmat prezența speciei, iar pe râul Mureș aproape două treimi (68%) (Figura 10). Efectivele speciei în prezent sunt văzute ca fiind în creștere în Delta Dunării de către 44 % din respondenți, iar 26% consideră că numărul indivizilor e stabil. Pe râurile Prut și Mureș aproximativ jumătate din cei întrebați consideră mărimea populațiilor ca fiind stabilă, și un număr egal de persoane văd acest număr ca fiind în creștere sau în scădere (Figura 10).



Figura 10. Răspunsurile privind prezența speciei înaintea anilor 2000 (stânga). Răspunsurile privind efectivele speciei în prezent (dreapta)

Aceste observații sunt în conformitate cu rezultatele obținute pe baza studiului de genetică populațională. Specia a fost considerată extinsă în aceste râuri, deoarece mărimea populațiilor a scăzut drastic în urma poluării și a intervențiilor hidromorfologice, făcând ca specia să fie mai greu de detectat, efectivele mici neavând roiri spectaculoase.

În România, ca și la nivel European și global, această specie nu este evaluată, iar pe baza rezultatelor noastre am propus schimbarea statutului IUCN al acestei specii din specie neevaluată (Not Evaluated) în România, în specie - Least Concern. În vederea atingerii acestui obiectiv, demersul principal a fost reevaluarea speciei pe baza ghidului propus de Uniunea Internațională pentru Conservarea Naturii (International Union for Conservation of Nature (IUCN)), care se face de către membrii Autorității Listei Roșii (Red List Authorities) pe baza datelor științifice existente.

Identificarea unor noi zone de distribuție ale speciei *Palingenia longicauda* și semnalarea populațiilor viabile din aceste zone, arată un grad mic de periclitare din punct de vedere al Listei Roșii IUCN, iar datorită eforturilor depuse în cadrul acestei cercetări, am furnizat toate datele necesare pentru reevaluarea speciei pe baza ghidului propus de Uniunea Internațională pentru Conservarea Naturii (International Union for Conservation of Nature (IUCN)), astfel că , *P. Longicauda* este acum încadrată în categoria speciilor nepericlitare (Least Concerning - LC) (Macadam, C.,2023).

CONCLUZII FINALE

Rezultatele obținute în urma activității de cercetare desfășurate în cadrul tezei de doctorat, sunt în conformitate cu obiectivele propuse:

✚ Am identificat, colectat și prelucrat cu metode de genetică populațională mai multe populații din România, iar pe baza unui efort mare de eșantionare a speciei *P. longicauda* în arealul său cunoscut în prezent, în sud-estul Europei și prin colaborare cu cercetători din Ungaria, Ucraina și Slovacia, am analizat mai multe populații, și am comparat cu exemplare suplimentare, inclusiv *P. fuliginosa* și probabil *P. sublongicauda* din colecția lui Landa și Soldán, confirmând în acest fel prezența speciei *P. longicauda* cu efective viabile în sud-estul Europei.

✚ Diferențele genetice bazate pe secvențele mitocondriale studiate, arată o diferențiere semnificativă între populațiile din bazinul râului Tisa și din râul Rába în comparație cu populațiile din Delta Dunării și Prut, sugerând că această specie a avut minim un refugiu în zona Pontică.

✚ Diferențierea genetică observată confirmă faptul că populațiile redescoperite după anii 2000 în România, sunt populații autohtone care au supraviețuit prin efective mici în Delta Dunării și în Prut, nu sunt rezultatul unei migrații recente dinspre bazinul Tisa.

✚ Am realizat prima analiză integrative a datelor morfologice și moleculare ale speciilor *Palingenia* înregistrate din sud-estul Europei. Rezultatele noastre morfometrice și de genetică moleculară arată prezența unei singure specii de *Palingenia* în zona studiată, astfel că semnalarea speciei *P. fuliginosa* din Ucraina și Slovacia, este rezultatul identificării greșite a variabilității mari reprezentate de indivizii speciei *P. longicauda*.

✚ Chestionarele realizate confirmă prezența continuă a speciei în Delta Dunării și pe râurile Mureș și Prut, arătând ca aceasta este răspândită în cursurile inferioare și medii ale râurilor studiate.

✚ Identificarea unor noi zone de distribuție ale speciei *Palingenia longicauda* și semnalarea populațiilor viabile din aceste zone, arată un grad mic de periclitare din punct de vedere al Listei Roșii IUCN, iar datorită eforturilor depuse în cadrul acestei cercetări, am furnizat toate datele necesare pentru reevaluarea speciei pe baza ghidului propus de Uniunea Internațională pentru Conservarea Naturii (International Union for Conservation of Nature (IUCN), astfel că, *P. Longicauda* este acum încadrată în categoria speciilor nepericlitare (Least Concerning - LC).

Bibliografie selectivă

1. **Afanasyev S., Lyashenko A., Iarochevitch A., Lietytska O., Zorina-Sakharova K., și Marushevskia O.** 2020, Pressures and Impacts on Ecological Status of Surface Water Bodies in Ukrainian Part of the Danube River Basin. In D Bănăduc, A. Curtean-Bănăduc, F. Pedrotti, K. Cianfaglionne, & J. R. Akeroyd (Eds.), *Human Impact on Danube Watershed Biodiversity in the XXI Century* (pp. 327–358). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37242-2_16;
2. **Akimov I.A.** 2009, *Red Data Book of Ukraine. Animals*. 3rd ed. Global Consulting, Kyiv, Ukraine;
3. **Alcaraz C, Gholami Z.** 2019, Diversity and structure of fragmented populations of a threatened endemic cyprinodontid (*Aphanius sophiae*) inferred from genetics and otolith morphology: Implications for conservation and management. *J Zool Syst Evol Res.* 2019;00:1–15. <https://doi.org/10.1111/jzs.12333>
4. **Andrikovics S., Fink T.J și Cser B.** 1992: *Tiszavirág monográfia, Palingenia longicauda (Olivier, 1791)*- Tisza Klub Füzetek 2: 1-35, Szolnok;
5. **Andrikovics S., Turcsanyi I.** 2001, *Tiszavirag*. Tisza Klub Fuzetek 10: 1–69;
6. **Băcescu, M.** 1943. Rusaliile, hrana și nada principală pentru cei mai valoroși pești de fluvii. *Buletinul de Informații al Institutului de Cercetări Piscicole al României* 2(11): 203-207.
7. **Balint M., Malnas K., Nowak C., Geismar J și Vancsa É și colab.** 2012, *Species History Masks the Effects of Human-Induced Range Loss – Unexpected Genetic Diversity in the Endangered Giant Mayfly Palingenia longicauda*, PLoS ONE 7(3): e31872. doi:10.1371/journal.pone.0031872;
8. **Bănăduc D., Rey S., Trichkova T., Lenhardt M. și Curtean-Bănăduc A.** 2016, The Lower Danube River-Danube Delta-North West Black Sea: A pivotal area of major interest for the past, present and future of its fish fauna - A short review. *Science of the Total Environment*, 545–

546, 137–151.

9. **Bănărescu P.** 1991, *Zoogeography of fresh waters*. Distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia, volume 2. AULA-Verlag, Wiesbaden. 1091 p;
10. **Barber-James H., Gattolliat J.L., Sartori M. și Hubbard M.D.** 2008, *Global diversity of mayflies (Ephemeroptera, Insecta) in freshwater*, *Hydrobiologia* 595:339-350;
11. **Bauernfeind E.și Soldan T.**2012, *The Mayflies of Europe (Ephemeroptera)*, Apollo Books, Ollerup, Denmark;
12. **Bij de Vaate A., Jazdzewski K., Ketelaars H.A.M., Gollasch S. și Van der Velde G.** 2002, Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **59**, 1159–1174.
13. **Bogoescu C.** 1958, *Fauna Republicii Populare Române*, Insecta, VOL VII, Fascicula III, Ephemeroptera, Editura Academiei Republicii Populare Române, 1-187;
14. **BOLD**, <http://www.boldsystems.org>;
15. **Brittain J.E. și Sartori M.** 2003, *Ephemeroptera (Mayflies)*, *Enciclopedia of Insects*, 373-380;
16. **Brittain J.E.**1982, *Biology of mayflies*, *Ann. Rev. Entomol*, 27:119-47;
17. **Bulánková E., Beracko P., Derka T.** 2013, *Occurrence of protected species (Gomphus flavipes, Odonata and Palingenia longicauda, Ephemeroptera) in the Danube River and its deltas (Romania, Slovakia)*, *Scientific Annals of the Danube Delta Institute*, vol.19, Tulcea, 21-24;
18. **Csapó H., Krzywoźniak P., Grabowski M., Wattier R., Baćela-Spychalska K., Mamos T., Jelić M. și Rewicz, T.** 2020, Successful post-glacial colonization of Europe by single lineage of freshwater amphipod from its Pannonian Plio-Pleistocene diversification hotspot. *Scientific Reports*, **10**, 18695.
19. **Demoulin, G.** 1965, Contribution a l'étude des Palingeniidae (Insecta, Ephemeroptera). *Nova Guinea (Zoology)*, 33, 305–344.
20. **Dénes A.L., Vaida R.M, Szabó E., Martynov A.V., Vácsa É., Ujvárosi B. și Kersztes L.** 2022, *Cryptic survival and an unexpected recovery of the long-tailed mayfly Palingenia longicauda (Olivier, 1791) (Ephemeroptera: Palingeniidae) in Southeastern Europe*. *Journal of Insect Conservation*; <https://doi.org/10.1007/s10841-022-00425-z>;
21. **deWaard, J.R., Ivanova, N.V., Hajibabaei, M. & Hebert, P.D.N.**2008, Assembling DNA Barcodes: Analytical Protocols. Pp. 275–293 In: Martin CC (Ed.) *Methods in Molecular Biology: Environmental Genomics*. Humana Press Inc., Totowa, USA, 364 pp 10.1007/978-1-59745-548-0_15

22. **Edmunds G.F.Jr. și Mccaffery W.P.** 1988, *The mayflies subimago*, Ann. Rev. Entomol.1988,33:509-29;
23. **Excoffier L. și Lischer H.E.L.** 2010, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564–567.
24. **Fu Y.X.** 1997, Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
25. **Grant WS, Bowen Bowen BW.**1998, Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89:415–426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>
26. **Hall T.A.** 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, **41**, 95–98.
27. **Harpending H.C.** 1994, Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**, pp. 591–600.
28. **Haybach, A.** 2007, Hinweise auf ein historisches Vorkommen von *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791) in Bayern (Insecta: Ephemeroptera). Evidence for a historical occurrence of *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791) in Bavaria (Southern Germany) (Insecta: Ephemeroptera). *Lauterbornia* 59:77-83.
29. **Haybach, A.** 1998, *Die Eintagsfliegen (Insecta: Ephemeroptera) von Rheinland Pfalz. Zoogeographie, Faunistik, Ökologie, Taxonomie und Nomenklatur*. Dissertation Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 417 pp;
30. **Ivanova P, Dzhembekova N, Atanassov I, Rusanos K, Raykov V, Zlateva I, Yankova M, Raev Y, Nikolov G** .2021, *Genetic diversity and morphological characterisation of three turbot (Scophthalmus maximus L., 1758) populations along the Bulgarian Black Sea coast*. *Nature Conservation* 43:123–146. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.43.64195>
31. **Jażdżewska AM, Rewicz T, Mamos T, Wattier R, Bączela-Spychalska K, Grabowski M.** 2020, Cryptic diversity and *mtDNA* phylogeography of the invasive demon shrimp, *Dikerogammarus haemobaphes* (Eichwald, 1841), in Europe. *NeoBiota* 57:53–86. <https://doi.org/10.3897/neobiota.57.46699>
32. **Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. & Madden, T.L.** 2008, NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 3:5–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
33. **Jourdan, J., Plath, M., Tonkin, J.D., Ceylan, M., Dumeier, A.C., Gellert, G., Graf, W., Hawkins, C.P., Kiel, E., Lorenz, A.W., Matthaei, C.D., Verdonschot, P.F.M., Verdonschot,**

- R.C.M. și Haase, P. 2018, Reintroduction of freshwater macroinvertebrates: challenges and opportunities. *Biological Reviews* 94: 368-387.
34. Kasymov, F.G. & Agaev, N.B. 1986, On the biology of ephemeron *Palingenia fuliginosa* (Ephemeroptera, Palingeniidae) from the Kura River. *Doklady Akademii Nauk Azerbaidzhanskoi SSR* 48(8):65-67.
35. Kovács T., Ambrus A. 2001, *Ephemeroptera, Odonata and Plecoptera larvae from the rivers of Ra'ba and Lapincs (Hungary)*. *Folia Historico-Naturalia Musei Matraensis* 25: 145–162;
36. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018, MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
37. Landa, V. & Soldán, T. 1985, Distributional patterns, chorology and origin of the Czechoslovak fauna of mayflies (Ephemeroptera). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 82:241-268.
38. Landa, V. 1969, Jepice-Ephemeroptera. *Fauna CSSR* 18:1-352.
39. Leigh, J.W. & Bryant, D. 2015, POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6:1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
40. Lengyel Sz., Kiss B., Muller Z. și Aradi Cs. 2004; *Colony location, colony structure, and population status of the Long-tailed Mayfly on certain sections of the upper Tisza river*; *Természetvédelmi Közlemények* 11;
41. Liska I. 2015, Managing an international river basin towards water quality protection: The Danube Case. *The Handbook of Environmental Chemistry, 39, The Danube River Basin*. (ed. by Liška, I.), pp. 1–19. Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin, Germany.
42. Macadam C., 2023, *Palingenia longicauda, Tisa Mayfly*, The IUCN Red List of Threatened Species; <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T162571250A162571252.en>;
43. Málnás K., Ambrus A., Müller Z., Tóth Áp și Kiss B. 2016, *Re-appearance of Palingenia longicauda (Olivier, 1791) (Ephemeroptera, Palingeniidae) on the Hungarian Danube section—range recovery of the species at the Rába district*; *Folia Historico Naturalia Musei Matraensis* 40:21-25;
44. Málnás K., Polyák L., Prill É., Hegedüs R., Kriska G., Dévai G., Horvát G. și Lengyel S. 2011, *Bridges as optical barriers and population disruptors for the mayfly Palingenia longicauda: an overlooked threat to freshwater biodiversity?*; *J Insect Conserv* (2011) 15:823–832, DOI 10.1007/s10841-011-9380-0;

45. **Marjoram P. și Donnelly P.** 1994, Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics*, **136**, 673–683.
46. **Martynov, A.V.** 2018, New records of some rare mayflies (Insecta, Ephemeroptera) from Ukraine. *Ecologica Montenegrina* 16:48–57. <https://doi.org/10.37828/em.2018.16.6>
47. **Mišíková Elexová, E., Ščerbáková, S., Lešťáková, M., Kováč, V., Plachá, M., Bitušík, P., Očadlík, M., Brúderová, T., Vráblová, Z. & Haviar, M.,** 2015. Výsledky monitorovania vodných útvarov povrchových vôd Slovenska, Zoznam taxónov, Vodná fauna, Bentické bezstavovce, mihule a ryby. Bratislava: Výskumný ústav vodného hospodárstva. 329pp. ISBN 978 – 80 – 89740 – 04 – 8
48. **Monaghan M.T., Inward D.J., Hunt T. și Vogler A.P.** 2007, A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45**, 674–692.
49. **Manko P., Vaida R.M. , Keresztes L., Martynov A., Szabó E., Baranová B., Kis B., Vánca E, Dénes A.L.** 2023, *Integrative taxonomy supports one rather than several species of Palingenia in South-Eastern Europe (Insecta, Ephemeroptera, Palingeniidae)*- The European Zoological Journal, 296-306, Vol.90, No.1; <https://doi.org/10.1080/24750263.2023.2191622>;
50. **Mosimann, J. E.** 1970, Size allometry: size and shape variables with characterizations of the lognormal and generalized gamma distributions. *Journal of the American Statistical Association*, 65(330), 930-945.
51. **Motas C.** 1936, *Zborul nupțial al Vetrițelor sau rusaliilor la Ada-Kaleh*, Revista Științifică V.Adamachi, Vol XVII, nr.2;
52. **Munjiu O.** 2017, *Distribution of endangered mayfly Palingenia longicauda (Olivier, 1791) (Ephemeroptera, Palingeniidae) on the territory of the Republic of Moldova*, *Lauterbornia* 84: 39-51, D-86424 Dinkelscherben, 2017-12-15;
53. **Pauls S. U., Lumbsch H. T. și Haase P.** 2006, Phylogeography of the montane caddisfly *Drusus discolor*: evidence for multiple refugia and periglacial survival. *Molecular Ecology*, **15**, 2153–2169.
54. **Pavel A.B., Menabit S., Skolka M., Lupascu N., Pop I.C., Opreanu G., Stanescu I, Scrieci A.** 2019, *New data regarding the presence of two insect larvae species-Gomphus (Stylurus) flavipes (Odonata) and Palingenia longicauda (Ephemeroptera)-In the lower sector of the Danube River*; *Geo-Eco-Marina* 25/2019;
55. **Raymond M. și Rousset F.** 1995, An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280–1283.

56. Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. & Sanchez-Gracia, A. 2017, DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34:3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
57. Ruffieux L., Sartori M. și L'eplattenier G. 1996, *Palmen body: a reliable structure to estimate the number of instars in Siphonurus aestivalis (Eaton) (Ephemeroptera: Siphonuridae)*. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25: 341–344;
58. Russev B.K. 1987, *Ecology, life history and distribution of Palingenia longicauda (OLIVIER)(EPHEMEROPTERA)*, *Tijdschrift voor Entomologie* 130:109-127;
59. Russev Bk. 1987: *Ecology, life history and distribution of Palingenia longicauda (Olivier) (Ephemeroptera)*; *Tijdschrift voor Entomologie* 130: 109–127;
60. Sartori M. și Brittain J.E. 2015, *-Order Ephemeroptera, Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, Academic Press, 873-891;
61. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. 2012, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. [doi:10.1038/nmeth.2089](https://doi.org/10.1038/nmeth.2089)
62. Simons C., Frati F., Beckenbach A. și Crespi B. 1994, Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651–701.
63. Soldan T., Godunko J.R., Ahradkova S. și Sroka P. 2009, *Palingenia longicauda (OLIVIER, 1791) (Ephemeroptera, Palingeniidae): Do refugia in the Danube basin still work?*; A communication presented at the 21st SIEEC, České Budějovice, June 28 – July 3;
64. Soldan T. 1978, *Revision of the genus Palingenia in Europe (Ephemeroptera, Palingeniidae)*, *Acta entomologica bohemoslovaca*, 75:272-284;
65. Soldán, T & Landa, V. 1986, Life cycle of *Palingenia fuliginosa* (Ephemeroptera, Palingeniidae) in Czechoslovakia, pp. 143-146, 1 fig., IN: Velthuis, H. H. W. (ed), Proc. 3rd European Congr. Entomol., pt. 1. Amsterdam.
66. Soldán, T. 1997, Mayflies (Ephemeroptera): one of the earliest insect groups known to man. Pages 511-513 in Landolt P & Sartori M. *Ephemeroptera & Plecoptera. Biology-Ecology-Systematics*. Mauron - Tinguely & Lachat, SA. Fribourg.
67. Stoica C., Stanescu E., Paun I., Banciu A., Gheorghe S., Lucaciu I., Vasile G.G. și Nita-Lazar M. 2019, Danube Delta: monitoring and ecological status. A link between the past and the future. *Romanian Journal of Ecology & Environmental Chemistry*, **1**(1), 72–82.

68. **Studemann D., Landolt P., Sartori M., Hefti D și Tomka I.** 1992. *Ephemeroptera - Insecta*. Helvetica Fauna 9:1-175;
69. **Sujevan R. și Hebert P.** 2007, *BOLD: The Barcode of Life Data System*. Molecular Ecology Notes: 355–364;
70. **Sworobowicz L., Mamos T., Grabowski M. și Wysocka A.** 2020, Lasting through the ice age: The role of the proglacial refugia in the maintenance of genetic diversity, population growth, and high dispersal rate in a widespread freshwater crustacean. *Freshwater Biology*, **65**, 1028–1046.
71. **Tajima F.** 1989, The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 597–601.
72. **Tittizer T., Fey D., Sommerhauser M., Malnas K. și Andrikovics S.** 2008, Versuche zur Wiederansiedlung der Eintagsfliegenart *Palingenia longicauda* (Olivier) in der Lippe.-Lauterbornia 63: 57-75, Dinkelscherben;
73. **Tshernova, O.** 1949, Kpoznaniiyu roda *Palingenia* Burm. (Ephemeroptera, Palingeniidae). Entomologicheskoe Obozrenie 39(3-4):303-307.
74. **Varga Z.** 2010, *Extra-Mediterranean Refugia, Post-Glacial Vegetation History and Area Dynamics in Eastern Central Europe*. In J. C. Habel & T. Assmann (Eds.), *Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology* (pp. 57–117). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92160-8>;
75. **Vidinova Y.** 2018, *Long-tailed palingeniid mayfly :Red Data Book of Bulgaria*;
76. **Webb M.J., Jacobus M.L., Funk S.H., Zhou X., Kondratieff B., Geraci C.J., DeWalt R.E., Baird D.J., Richard B., Phillips I. și Hebert P.D.N.** 2021, A DNA Barcode Library for North American Ephemeroptera: Progress and Prospects, *PLoS ONE* 7(5): e38063. doi:10.1371/journal.pone.0038063;
77. **Witkowski Z.J., Krol W. și Salarz.** 2003, *Carpathian list of endangered species*.- WWF and Institute of Nature Conservation, Polish Academy of Sciences, 64 pp;

Lista publicațiilor

1. Manko P., **Vaida R.M.** *, Keresztes L., Martynov A., Szabó E., Baranová B., Kis B., Vánca E, Dénes A.L. 2023, *Integrative taxonomy supports one rather than several species of Palingenia in South-Eastern Europe (Insecta, Ephemeroptera, Palingeniidae)*- The European Zoological Journal, 296-306, Vol.90, No.1; <https://doi.org/10.1080/24750263.2023.2191622>;
2. Dénes A.L., **Vaida R.M.**, Szabó E., Martynov A.V., Vácsa É., Ujvárosi B. și Keresztes L. 2022, *Cryptic survival and an unexpected recovery of the long-tailed mayfly Palingenia longicauda (Olivier, 1791) (Ephemeroptera: Palingeniidae) in Southeastern Europe*. Journal of Insect Conservation; <https://doi.org/10.1007/s10841-022-00425-z>;
3. Macadam C.,2023, *Palingenia longicauda, Tisa Mayfly*, The IUCN Red List of Threatened Species; (Contributor(s): Denes, A.-V., Keresztes, L. și **Vaida-Tintelecan, R.**); <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T162571250A162571252.en>;
4. Denes A., Denes A.L.,Battes K., Cimpan M., Terec A.B., Berchi M., Szabo E., Laszlo Z., **Vaida R.M.**, Keresztes L., *Species level identification of bethic macro-invertebrates using DNA Barcode data: assessment aquatic biodiversity hotspots, the Carpathians, Romania*, Freshwater Science – în curs de publicare;
5. Broșură popularizare- Vánca E, **Vaida R.M.**,- 2022, (SOR) *Un altfel de rusalii* <https://www.sor.ro/un-altfel-de-rusalii/>