



Universitatea
Transilvania
din Brașov

TEZĂ DE ABILITARE

Titlu: Evaluarea diversității genetice a speciilor de rășinoase din
România

Domeniul: Silvicultură

Autor: Conf. Dr. Ing. Elena CIOCÎRLAN

Universitatea Transilvania din Brașov

BRAȘOV, 2025

CUPRINS

Mulțumiri	2
(A) Summary	3
(B) Realizări științifice și profesionale și planuri de evoluție și dezvoltare a carierei.....	5
(B-i) Realizări științifice și profesionale	5
Capitolul 1. Introducere.....	5
1.1 Aspecte generale.....	5
1.2. Lucrări cuprinse în teza de abilitare.....	7
Capitolul 2. Diversitatea genetică a molidului (<i>Picea abies</i>) în livezi de semințe și populații naturale.....	9
Capitolul 3. Diversitatea genetică a bradului (<i>Abies alba</i>) în populații naturale din România..	18
Capitolul 4. Diversitatea și structura genetică spațială în populații naturale de pin silvestru (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	37
4.1. Diversitatea genetică a pinului silvestru la nivel nuclear	37
4.2. Diversitatea genetică a pinului silvestru la nivel cloroplastic	53
Capitolul 5. Evaluarea diversității genetice cu ajutorul markerilor nucleari în populații de pin negru (<i>Pinus nigra</i> Arn.)	58
Capitolul 6. Evaluarea diversității genetice și a structurii unor plantații de duglas (<i>Pseudotsuga menziesii</i>) din România	74
(B-ii) Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei	87
(B-iii) Bibliografie	93

Mulțumiri

Elaborarea acestei teze de abilitare marchează un moment important în parcursul meu profesional și academic, fiind o oportunitate de a reflecta asupra contribuțiilor științifice realizate până în prezent, precum și asupra direcțiilor viitoare de cercetare. Domeniul silviculturii, în care m-am format și îmi desfășor activitatea, reprezintă un domeniu care leagă științele naturii de provocările și necesitățile societății. În acest context, studierea diversității genetice și a structurii populațiilor de arbori devine esențială pentru gestionarea durabilă a pădurilor și pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de adaptare a speciilor la provocările schimbărilor climatice.

Această lucrare reflectă eforturile depuse de-a lungul anilor pentru a înțelege procesele genetice care influențează diversitatea și adaptabilitatea speciilor forestiere. Scrierea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă fără sprijinul și încurajările valoroase ale colegilor mei din domeniul geneticii și al dendrologiei. Colaborarea cu aceștia a reprezentat nu doar o sursă de cercetare și cunoaștere, ci și o motivație constantă de a-mi depăși limitele și de a explora noi direcții de cercetare. Proiectele de cercetare, discuțiile și schimburile de idei pe care le-am avut cu dumneavoastră au contribuit semnificativ la dezvoltarea mea profesională. Totodată, rezultatele obținute nu ar fi fost posibile fără sprijinul profesorilor, cercetătorilor și colegilor din cadrul Universității Transilvania din Brașov, precum și al cercetătorilor din cadrul Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare în Silvicultură „Marin Drăcea” sau a altor colegi de la diverse instituții din țară și străinătate.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc familiei mele, care a fost alături de mine în fiecare pas al acestui drum. Sprijinul lor necondiționat, înțelegerea și sacrificiile făcute au fost esențiale pentru realizările mele. Deși drumul a fost adesea plin de provocări, am reușit să le depășesc gândindu-mă cu recunoștință la tatăl meu căruia îi dedic această lucrare.

În memoria tatălui meu,

„Oricât de departe ar pleca cineva, iubirea și amintirile rămân mereu aproape”

(Johann Wolfgang von Goethe)

(A) Summary

Genetic diversity determines tree populations adaptability, evolution, and long-term survival. Historical processes, environmental conditions, past management practices, and forest reproductive material influence the distribution of genetic diversity within and among populations. This research aimed to evaluate the population structure and genetic diversity of coniferous species in Romania using nuclear and chloroplast microsatellites markers.

The analysis of genetic diversity in Norway spruce, Romania's most widespread conifer species, revealed slightly lower genetic diversity in clonal seed orchards compared to natural populations. In the first stage, the genetic identity of ramets within a clone was tested using three nSSR genetic markers. A small number of divergences were identified among ramets, attributed to the growth of the rootstock to the detriment of scion or sampling errors. In the second stage, Bayesian analysis results indicated a genetic structure consisting of two groups: one corresponding to seed orchards and the other to natural stands. The pattern of genetic variation was influenced by both adaptive divergences within seed orchards and the limited number of clones used for their establishment.

The analysis of Carpathians silver fir populations, conducted using nuclear EST-SSR markers, revealed high levels of genetic diversity across the 36 populations sampled across Romanian Carpathians. However, the silver fir populations from the Eastern Carpathians showed higher levels of genetic diversity, reflected in greater allelic richness and expected heterozygosity, as well as greater genetic differentiation compared to populations from the Southern Carpathians. Additionally, genetic differentiation was observed among the regions of origin. Although overall genetic differentiation among the analyzed populations was low, the genetic structure was less homogeneous, particularly in the North-Eastern Carpathians.

Nuclear DNA analyses of natural Scots pine populations showed that the populations from the Eastern and Southern Carpathians still maintain high genetic diversity within populations despite the fragmentation and relatively recent reduction of the species' natural range. Moreover, lower genetic diversity was observed in populations from peatland compared to those growing on rocky slopes with acidic, nutrient-poor soils. The statistically significant spatial genetic structure has been detected in nearly all studied Scots pine populations. At the chloroplast level, the analysis based on 10 microsatellite markers identified three common chloroplast DNA haplotypes shared among populations from two

geographically distant regions (the Carpathians and Central Siberia), suggesting the existence of long-distance pollen-mediated gene flow or common ancestry.

Nine nSSR genetic markers were used to examine the differences among four subspecies of black pine: *banatica*, *nigra*, *pallasiana*, and *laricio*. The analyses revealed low genetic differentiation, which cannot dismiss the possibility of stratification within intraspecific taxonomic units. However, a distinct genetic structure was identified for the subspecies *banatica*, suggesting a unique origin for the Banat black pine populations and supporting the hypothesis of a Pleistocene refugium in Southwestern Carpathians region.

Genetic diversity analyses of Douglas-fir plantations in Romania revealed a high level of gene diversity and limited genetic differentiation, suggesting that the forest reproductive materials used to establish these plantations originated from a narrow range of provenances.

In conclusion, as shown by various arrays of molecular markers, conifer species in Romania are characterized by a high level of genetic diversity, which suggests a considerable degree of adaptability and stability of the populations, thus conferring resilience against anticipated foreseen climatic pressures and environmental changes. These research findings may help develop sustainable management practices and formulate strategies and programs for the conservation and improvement of forest genetic resources of conifer species in Romania.

(B) Realizări științifice și profesionale și planuri de evoluție și dezvoltare a carierei

(B-i) Realizări științifice și profesionale

Capitolul 1. Introducere

1.1 Aspecte generale

Pădurile reprezintă un element fundamental al ecosistemelor globale, acoperind aproximativ 31% din suprafața terestră (4 miliarde de hectare) (FAO, 2020). Aceste ecosisteme complexe sunt esențiale pentru menținerea echilibrului ecologic al planetei, reglează ciclurile de carbon și oxigen, protejează solul, reglează fluxurile de apă și contribuie semnificativ la biodiversitatea globală. Aproape 80% din speciile terestre de floră și faună depind direct sau indirect de păduri (Pan et al., 2011). În acest context, gestionarea sustenabilă a pădurilor devine o prioritate globală, iar în contextul schimbărilor climatice și al degradării ecosistemelor, conservarea și protejarea lor sunt esențiale pentru menținerea echilibrului ecologic pe termen lung (Chapin et al., 2010).

De cele mai multe ori, diversitatea genetică a speciilor nu este considerată o temă de interes public, fiind mai degrabă percepută ca o problemă de interes academic. Dar dispariția unor specii, pierderea pădurilor seculare și degradarea calității aerului și a apei sunt probleme din ce în ce mai cunoscute. În consecință, este important de știut faptul că genele reprezintă unitatea fundamentală a biodiversității, materia primă a evoluției și sursa diversității pentru plante, animale, comunități și ecosisteme, iar variația genetică modelează și definește indivizii, populațiile, speciile și subspeciile (Mukhopadhyay și Bhattacharjee, 2016). Diversitatea genetică a arborilor, ca element fundamental al biodiversității forestiere, joacă un rol important în adaptabilitatea acestora la schimbările climatice preconizate. Astfel diferențierea genetică la speciile de arbori este legată de scara spațială a eterogenității de mediu și de echilibrul dintre selecție și fluxul de gene (Savolainen et al., 2007). Diversitatea genetică nu se limitează doar la variabilitatea dintre specii, ci include și variabilitatea genetică la nivel de populație/individ și poate influența o serie de procese ecologice cheie, cum ar fi: regenerarea naturală, stabilitatea pe termen lung a ecosistemului și capacitatea acestora de a face față unor perturbări (Ellstrand și Elam, 1993). Studiile asupra structurii genetice a populațiilor de arbori permit identificarea resurselor genetice valoroase necesare pentru programele de ameliorare a speciilor și pentru protejarea acestora în fața schimbărilor climatice sau a altor amenințări ecologice (Rajora și Mosseler, 2001). Mai mult, cunoașterea diversității genetice contribuie la optimizarea strategiilor de reîmpădurire, prin identificarea unor surse adecvate și sustenabile pentru materialul forestier de reproducere, astfel încât pădurile să devină mai rezistente și mai productive pe termen lung (Ray et al., 2022).

Studiile privind estimarea diversității genetice la speciile de arbori au început să devină din ce în ce mai importante în anii 1980 și 1990, odată cu dezvoltarea metodelor de

analiză moleculară. Utilizarea markerilor izoenzimatici a fost printre primele tehnici aplicate pentru a determina structura genetică a populațiilor și pentru a evalua fluxul de gene dintre acestea (Hamrick et al., 1992). Aceste studii au arătat că arborii prezintă o diversitate genetică mai mare decât alte specii de plante, datorită ciclurilor lor lungi de viață, a dimensiunii populațiilor și a capacității eficiente de dispersie a semințelor și polenului. Ulterior, markerii moleculari de tipul microsateliților (SSR) au devenit cea mai utilizată metoda pentru studiile de diversitate genetică, oferind informații precise despre variabilitatea genetică la nivelul populațiilor (Powell et al., 1996). Acești markeri au permis investigarea mai detaliată a structurilor genetice și a factorilor evolutivi care influențează populațiile de arbori, inclusiv selecția și deriva genetică. În ultimele decenii, progresele în secvențierea ADN-ului și utilizarea markerilor SNP (polimorfismul la nivelul unei singure nucleotide) au permis realizarea unor studii mai ample asupra diversității genetice, prin identificarea regiunilor din genom care sunt asociate cu unele trăsături adaptative ale speciilor (Neale și Kremer, 2011).

Rășinoasele, cunoscute și sub denumirea de conifere, reprezintă unul dintre cele mai vechi și mai reziliente grupuri de plante, cu o istorie evolutivă de peste 300 de milioane de ani. Acestea au dominat ecosistemele terestre în Era Mezozoică, înainte de expansiunea masivă a foioaselor în Cretacic (Burrows, 2021; Farjon, 2010). În Europa, coniferele sunt reprezentate de mai multe genuri (*Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Larix*, *Cedrus*, *Juniperus* și *Taxus*), care includ 41 de specii de importanță ecologică și economică (Farjon, 2018, 2010), distribuția acestora fiind influențată de diverși factori geografici, climatici și ecologici (Figura 1.1). În România, rășinoasele ocupă aproximativ 26% din suprafața fondului forestier (Rezultate IFN – Ciclul II, 2018) și sunt distribuite preponderent în zona montană. Conform modelelor dinamice, pădurile montane dominate de specii de foioase pot migra către altitudini mai mari ca răspuns la schimbările climatice (Lischke et al., 1998). Creșterea competiției pentru zona montană, expansiunea speciilor de foioase și temperaturile favorabile la altitudini mai mari ar putea determina ca pădurile de conifere să își extindă arealul în zonele alpine superioare (Mosca et al., 2012). Un aspect esențial al rezilienței și adaptabilității rășinoaselor este diversitatea lor genetică. Sistemul reproductiv alogam, dispersia semințelor și a polenului pe distanțe lungi - prin intermediul vântului, asigură un flux genetic ridicat între populații. Aceasta determină totodată o diferențiere genetică redusă între acestea (Hamrick et al., 1992). De-a lungul timpului, toate acestea au contribuit semnificativ la elaborarea unor strategii de conservare a speciilor și populațiilor de arbori.

În acest context, cercetările din cadrul acestei teze au avut ca scop estimarea structurii și diversității genetice a principalelor specii de rășinoase din România.

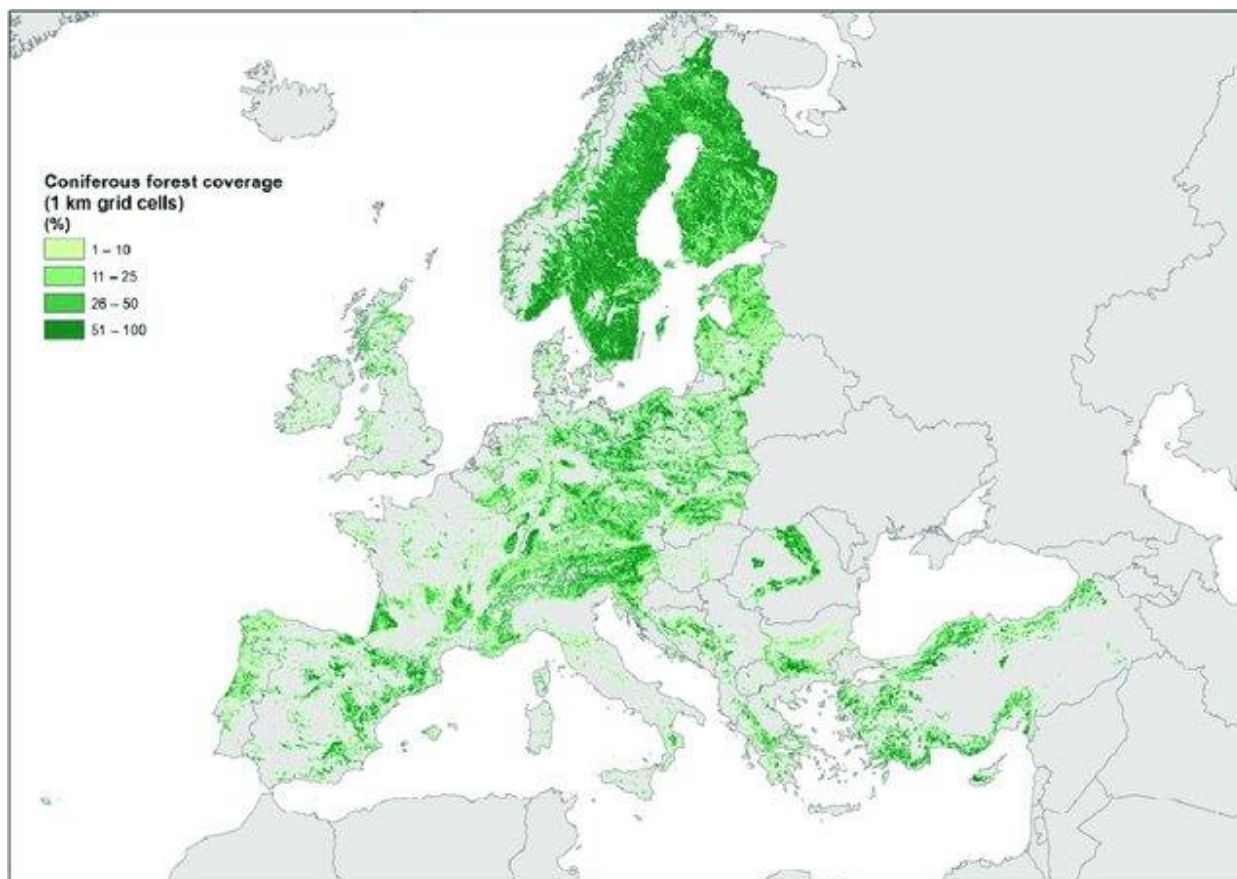


Figura 1.1. Distribuția speciilor de conifere la nivel european (Jeger et al., 2018)

1.2. Lucrări cuprinse în teza de abilitare

Teza de abilitare este rezultatul cercetărilor din ultimii 6 ani și cuprinde 4 articole științifice publicate în reviste indexate Web of Science, 2 articole științifice prezentate în cadrul unor conferințe internaționale - în curs de publicare și 3 rapoarte rezultate din implementarea unor contracte de cercetare științifică, după cum urmează:

Articole:

1. **Ciocîrlan, E.**, Șofletea, N., Mihai, G., Teodosiu, M., Curtu, A. L., 2021. Comparative analysis of genetic diversity in Norway spruce (*Picea abies*) clonal seed orchards and seed stands. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(4), 12575-12575.
2. Șofletea, N., Mihai, G., **Ciocîrlan, E.**, Curtu, AL., 2020. Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure in Isolated Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Populations Native to Eastern and Southern Carpathians. *Forests* 11, 10,1047.
3. Sheller, M.; **Ciocîrlan, E.**; Mikhaylov, P.; Kulakov, S.; Kulakova, N.; Ibe, A.; Sukhikh, T.; Curtu, A.L., 2021. Chloroplast DNA Diversity in Populations of *P. sylvestris* L. from Middle Siberia and the Romanian Carpathians. *Forests*, 12, 1757.

4. Teodosiu, M., Mihai, G., Fussi, B., **Ciocirlan, E.**, 2019. Genetic diversity and structure of Silver fir (*Abies alba* Mill.) at the south-eastern limit of its distribution range. *Annals of forest research*, 62(2): 139-156. .

Contracte de cercetare:

1. Evaluarea potențialului genetic adaptiv al principalelor specii de rășinoase pentru un management forestier durabil, în contextul schimbărilor climatice (GENCLIM), PN II UEFISCDI, Contract 151/2014 (2014 – 2017).
2. Îmbunătățirea tehnologiei de producere a semințelor în livezi semincere de molid PN-III-P2-2.1-BG-2016- 0465, Contract 32BG/2016 (2016-2018)
3. Reziliența la secetă și valoarea ecologică a plantațiilor de duglas, molid și brad având în vedere schimbările climatice-cod PN-III-P1-1.1-TE-2019-1099, Contract TE75/2020 (2020-2022)

Capitolul 2. Diversitatea genetică a molidului (*Picea abies*) în livezi de semințe și populații naturale

Introducere

Livezile de semințe sunt cea mai utilizată metodă pentru obținerea materialelor forestiere de reproducere cu însușiri genetice superioare (Funda et al., 2009; Funda și El-Kassaby, 2012). Livezile de semințe clonale reprezintă cel mai important și eficient tip de transmitere a trăsăturilor genetice superioare la descendenți, prin crearea de soiuri/varietăți sintetice (Chaloupková et al., 2019).

Pe termen lung, ameliorarea arborilor implică, printre altele, asigurarea unui echilibru între câștigul genetic preconizat și un nivel adecvat de diversitate genetică, iar cea mai comună metodă de asigurare a acestui lucru sunt livezile de semințe (Tang și Ide, 2001). Valorile ridicate ale diversității genetice în livezile de semințe sunt importante pentru că vor crește reziliența și capacitatea de adaptare la mediile în schimbare și, astfel, vor contribui la creșterea productivității și calității pădurilor. Diversitatea genetică în rândul culturilor din livezile de semințe este influențată în mod semnificativ de gradul de înrudire dintre clone, de variația fertilității parentale și de contaminarea cu polen străin (Ertekin, 2012; Geburek, 1997). În același timp, de mare importanță în această direcție sunt numărul de părinți implicați în clonarea materialului pentru instalarea livezilor de semințe (Hansen, 2008; Kang et al., 2001; Lindgren și Prescher, 2005; Sønstebo et al., 2018).

Molidul (*Picea abies* L.) reprezintă una dintre cele mai importante specii de rășinoase din pădurile boreale și subalpine (San-Miguel-Ayanz et al., 2016) și ocupă aproximativ 30 de milioane de hectare (Jansen et al., 2017; Schiop et al., 2017). În prezent, în România este cea mai răspândită specie de rășinoase, ocupând aproximativ 1.488.000 ha - 23,2% din suprafața fondului forestier (Budeanu et al., 2019). Studiul diversității genetice a molidului în România se rezumă doar la câteva studii bazate pe markeri alochimici (Curtu et al., 2009; Radu et al., 2014; Teodosiu, 2011) și microsateliți nucleari (Mihai et al., 2020) și nu au fost efectuate analize genetice în livezile de semințe. Livezile de semințe sunt una dintre cele mai importante metode de conservare *ex-situ* a resurselor genetice forestiere. Livezile de semințe reprezintă populații de arbori destinate producerii de semințe ameliorate genetic, cu un rol important în regenerarea artificială a pădurii. Acesta este și cazul molidului, una dintre principalele specii de arbori utilizați pentru împăduriri în zonele montane din România. Livezile de semințe au fost înființate prin selectarea pe baza unor criterii fenotipice a unui număr de arbori plus, înmulțiți vegetativ sau generativ, din diferite regiuni de proveniență. Pentru molid, în România, au fost instalate 9 livezi de semințe care ocupă aproximativ 72,9 ha (Mihai et al., 2019).

Studiile anterioare care au vizat o analiză comparativă a diversității genetice între populațiile naturale și livezile de semințe au arătat o diversitate genetică mai mare în livezile

de semințe comparativ cu populațiile naturale (Chaisurisri și El-Kassaby, 1994; El-Kassaby, 1992; Muona și Harju, 1989; Stoeher și El-Kassaby, 1997; Williams et al., 2001), diferențele fiind observate mai ales în ceea ce privește diversitatea alelică și heterozigoția. În general, în cazul speciilor de arbori cu un grad ridicat de polimorfism, selecția fenotipică în etapele timpurii ale reproducerii nu implică o reducere semnificativă a variabilității genetice, așa cum s-a observat și pentru *Picea abies* (Bergmann și Ruetz, 1991) sau *Picea glauca* (Namroud et al., 2012). Cu toate acestea, există și studii care indică o diversitate genetică mai scăzută în livezile de semințe în comparație cu populațiile naturale, ca efect al numărului de părinți selectați pentru clonare (Ilinov și Raevsky, 2017; Johnson și Lipow, 2002), sau altele care reliefează o diversitate genetică similară între cele două (Rungis et al., 2019). Având în vedere aceste diferențe de abordare, scopul acestei cercetări a fost evaluarea nivelului de diversitate genetică în livezile de semințe și populațiile naturale din care au fost selectați arborii plus de molid din Carpații Orientali.

Obiectivele acestei cercetări au fost: 1) stabilirea identității genetice a rameților pentru clonele selectate și 2) evaluarea diversității genetice cu ajutorul markerilor nucleari în livezile de semințe și în populațiile naturale.

Material și metode

Cercetările s-au efectuat în patru livezi de semințe (Paltinoasa - So-P, Bodești - So-B, Dalhauti - So-D și Alunis - So-A) și două populații naturale (Cucureasa - Nat-C, Manastirea Casin - Nat-M) de molid din România (Tabelul 2.1).

Tabelul 2.1. Localizarea populațiilor de molid evaluate

Nr. crt.	Abr.	Populația	Numărul de arbori selectați	Numărul de clone	Numărul de arbori analizați	Latitudine/ Longitudine
1	So-P	Paltinoasa	50	25	27	47.571791/ 25.941412
2	So-B	Bodești	90	81	54	47.042570/ 26.447690
3	So-D	Dalhauti	79	81	69	45.707435/ 27.007750
4	So-A	Alunis	190	197	154	46.325000/ 27.452275
5	Nat-C	Cucureasa	56	-	56	47.397383/ 25.045132
6	Nat-M	Manastirea Casin	77	-	77	46.168066/ 26.678455

Livezile de semințe au fost situate în partea de est a României și au fost înființate cu un număr diferit de genitori (So-P - 25, So-B, So-D - 81 și So-A - 197) proveniți din pădurile naturale de molid din Munții Carpați. Pentru analizele genetice din fiecare livadă de semințe, în majoritatea cazurilor, au fost selectați doi rameți pentru fiecare clonă.

Extragerea ADN-ului și reacția de polimerizare în lanț

ADN-ul a fost extras din muguri, cambium sau frunze folosind protocoalele CTAB (Doyle și Doyle, 1987) sau ATMAB (Dumolin et al., 1995).

Un număr de 12 microsateliți nucleari nSSR [WS00716.F13, WS0022.N15, WS0073.H08, WS00111.K13 și WS0023.B03 (Rungis et al., 2004) Pa_44 și Pa_47 (Fluch et al., 2011), EAC1F04 (Scotti et al., 2002), EATC1E03, EATC1B02, EATC2G05 (Scotti et al., 2002), SpAG2 (Pfeiffer et al., 1997) au fost utilizați pentru estimarea variabilității genetice.

Reacțiile de polimerizare în lanț au fost efectuate cu ajutorul unui termocycler (Corbett), în amestecuri de reacție (15 μ L) care au inclus 5 ng de ADN, 1x Qiagen Multiplex PCR MasterMix 2x, 2 μ M primer și apă ultrapură (*Rnase free water*). Programul PCR pentru amplificarea fragmentelor de ADN a fost următorul: 10 minute la 95 °C, urmate de 30 de cicluri de 1 min. la 94 °C, 1:30 min. la o temperatură de legare specifică pentru un anumit set de markeri (53 °C, 55 °C, 58 °C și 62 °C), 1 min. la 72 °C și o etapă finală de elongație de 30 min. la 60 °C. Produsele PCR amplificate au fost diluate și apoi rulate pe un analizor genetic GemoneLab GeXP (Beckman Coulter) folosind metoda Frag-3 și Size Standard 400.

Analiza datelor

Într-o primă etapă, markerii au fost testați pentru erori de genotipare datorate prezenței artefactelor sau erorilor de amplificare utilizând programul MICRO-CHECKER 2.2.0.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Programul a indicat prezența alelelor nule pentru trei markeri (EAC1F04, WS00716 și WS00023). Marker-ul EAC1F04 a fost exclus ulterior din analiză din cauza unor ambiguități de interpretare / prezența unui număr mare de alele nule. Markerii WS00716 și WS00023 au fost păstrați în analiză deoarece frecvența alelelor nule a fost foarte scăzută (mai puțin de 7%).

Software-ul GenAlEx ver. 6.5 (Peakall și Smouse, 2006, 2012) a fost utilizat pentru estimarea indicilor standard de diversitate genetică: numărul mediu de alele pe locus (N_a), numărul efectiv de alele (N_e), heterozigoția observată (H_o), heterozigoția așteptată (H_e), numărul de alele private (N_p) și indicele de fixare (F). Analiza componentelor principale (PCoA) a fost efectuată utilizând același software. Bogăția alelică (A_R), o măsură care este independentă de dimensiunea eșantionului analizat din fiecare populație, a fost estimată cu programul FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). A fost calculată o matrice a indicilor de diferențiere genetică pe perechi între toate perechile de populații. Pentru diferențierea genetică între

populațiile de molid, indicele F_{ST} a fost calculat cu ajutorul programului ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier și Lischer, 2010). Semnificația statistică a indicelui F_{ST} a fost testată pentru 10000 de permutări. Reprezentările grafice ale matricei F_{ST} au fost realizate utilizând o funcție R (pairFstMatrix.r) implementată în software-ul ARLEQUIN. Analiza varianței moleculare (AMOVA) a fost efectuată utilizând același software.

O grupare cluster de tip UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) a fost realizată cu programul Populations 1.2.31 (Langella, 1999) pe baza distanței genetice standard Nei's (1972) și vizualizată cu ajutorul programului TreeView 1.6.6 (Page, 2003).

Analiza bayesiană implementată în software-ul STRUCTURE ver. 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) a fost utilizată pentru atribuirea indivizilor la clustere genetice. Simulările au fost efectuate pentru 50000 de iterații urmate de o perioadă de burn-in de 100000 de pași, luând în considerare valori ale lui K (numărul de clustere) de la 1 la 7, cu 3 repetiții pentru fiecare valoare a acestuia. Analiza a fost efectuată folosind modelul *admixture*, frecvențele alelelor corelate și nicio informație prealabilă privind locul de eșantionare. Numărul de clustere existente a fost estimat cu ajutorul parametrului ΔK în conformitate cu metoda recomandată de Evanno et al., 2005 utilizând programul STRUCTURE HARVESTER (Earl și vonHoldt, 2012). Cea mai mare valoare a parametrului ΔK a fost obținută pentru $K = 2$.

Rezultate și discuții

Diversitatea genetică a populațiilor

Inițial, s-a presupus că cei doi rameți care proveneau din aceeași clonă ar avea genotipuri identice. Pentru a testa această ipoteză, au fost comparate genotipurile celor doi rameți pe clonă pentru trei loci genici. Pentru 9 din cele 297 de clone (So-P - clona 4, So-B - clonele 163, 169, 265, 267, 272 și 279; So-A - clonele 270 și 300), unu din cei 2 rameți nu era identic cu celălalt la 2 sau 3 loci markeri. Astfel în continuare în analiză au fost incluși numai arborii cu genotipuri unice (în total 437 de arbori, 304 arbori din livezile de semințe și 133 de arbori din populațiile naturale).

Pentru a caracteriza diversitatea genetică în cele șase populații de molid au fost utilizați unsprezece microsateliți. Toți cei unsprezece microsateliți au prezentat un grad ridicat de polimorfism între populații, numărul total de alele variind de la 33 la locusul WS0023 la 4 la locusul Pa_47. Numărul mediu de alele pe populație a fost de 11.921. Numărul efectiv de alele a fost de 6.503 ($SD \pm 0.566$), cu o valoare medie de 5.081 în livezile de semințe și 7.945 în populațiile naturale (Tabelul 2.2).

Tabelul 2.2. Indicii diversității genetice în populațiile de molid analizate (So – livezi de semințe, Nat – populații naturale)

Populații		<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	<i>A_R</i>	<i>N_p</i>
So-P	Media	8.455	4.505	0.693	0.674	-0.070	8.331	1
So-B	Media	11.182	5.466	0.683	0.682	-0.036	9.253	6
So-D	Media	10.909	5.071	0.734	0.732	-0.028	8.994	0
So-A	Media	12.091	5.280	0.672	0.710	0.022	9.196	3
Nat-C	Media	13.001	8.088	0.683	0.712	0.014	10.927	9
Nat-M	Media	13.364	7.763	0.717	0.725	-0.011	10.820	9
Livezi de semințe	Media	10.659	5.081	0.696	0.700	-0.027	8.941	10
Populații naturale	Media	13.182	7.925	0.700	0.718	0.001	10.874	18
Total	Media	11.921	6.503	0.698	0.709	-0.013	9.901	28
	<i>SE</i>	0.793	0.566	0.022	0.025	0.024	0.021	-

Abrevieri: *Na* - numărul de alele; *Ne* - numărul efectiv de alele; *Ho* - heterozigoția observată; *He* - heterozigoția așteptată; *F* - indicele de fixare; *A_R* - bogăția alelică; *N_p* - număr de alele private; *SE* - eroarea standard.

Unul dintre rolurile livezilor de semințe este de a menține diversitatea genetică la un nivel ridicat pentru generațiile viitoare, prin urmare, nivelul diversității genetice din livezile de semințe trebuie să reflecte diversitatea genetică din populațiile originale (Ertekin, 2012). Rezultatele arată că heterozigoția așteptată a livezilor de semințe (0.700) este ușor mai mică decât cea a populațiilor naturale (0.718), aceasta putând fi o consecință a faptului că livezile de semințe sunt în general formate dintr-un număr limitat de clone (25, 81 și 197). Media heterozigoției așteptate (*He*) în populațiile naturale (0.718) a fost ușor mai mare decât în livezile de semințe (0.700), dar a fost similară cu rezultatul raportat în livezile de semințe și populațiile naturale din Norvegia (Sønstebo et al., 2018) și Letonia (Ruņģis et al., 2019). În plus, heterozigoția așteptată (*He*) a fost mai mică decât a fost raportată anterior pentru arboretele de molid din Slovenia (0.935) (Westergren et al., 2018) sau Republica Cehă (0.780) (Máchová et al., 2018).

Bogăția alelică este unul dintre cei mai importanți parametri ai diversității genetice, în special atunci când sunt analizate populații cu un număr diferit de indivizi. În plus, estimarea diversității genetice pe baza bogăției alelice este considerată un indicator al unor factori genetici evolutivi și este relevantă pentru strategiile de conservare genetică (Foulley și Ollivier, 2006). Diferențe relativ mari între populații au fost observate în ceea ce privește bogăția alelică (*A_R*), care a variat între 8.331 și 11.071. Bogăția alelică (*A_R*) medie pentru toate populațiile a fost de 10.619. Bogăția alelică în livezile de semințe analizate (8.941) a fost mai mare decât cea raportată anterior pentru această specie în livezi de semințe din Norvegia (5.990) (Sønstebo et al., 2018). Studiile anterioare sugerează că există o corelație directă

între creșterea bogăției alelice și creșterea distribuției geografice a speciilor (Sønstebo et al., 2018). Cu toate acestea, se observă că bogăția alelică în livada de semințe So-A (9.196), populația cu cele mai mare număr de clone, nu este semnificativ diferită de celelalte livezi de semințe. Cu toate acestea, livada de semințe So-P, care are cel mai mic număr de clone, are cea mai mică valoare pentru A_R ; comparativ cu livada cu cel mai mare număr de clone (So-A), în So-P A_R scade cu 9,4%. Comparând cele patru livezi de semințe, se poate concluziona că A_R nu variază liniar de la livezile cu un număr mic de clone la cele cu un număr mare de clone, dar trebuie luat în considerare faptul că livezile cu un număr mic de clone sunt predispuse la erodarea diversității alelice. Pe de altă parte, trebuie remarcat nivelul ridicat al bogăției alelice în cele două populații naturale comparativ cu livezile de semințe.

Indicele de fixare (F) a înregistrat valori cuprinse între -0.070 (So-P) și 0.022 (So-A). Numărul total de alele private (N_p) a fost de 28, 10 alele private în livezile de semințe și 18 alele private în populațiile naturale. În general, mediile tuturor parametrilor genetici analizați au valori ușor mai mari la populațiile naturale de molid comparativ cu livezile de semințe.

Diferențierea genetică între populații

Diferențierea genetică între toate populațiile de molid a fost măsurată cu ajutorul indicelui F_{ST} . Matricea de diferențiere F_{ST} arată faptul că cea mai mică diferențiere genetică a fost detectată între populațiile naturale Nat-C și Nat-M ($F_{ST} = 0.0004$), iar cea mai mare diferențiere genetică a fost detectată între livada de semințe - So-D și populația naturală - Nat-C ($F_{ST} = 0.0496$). Diferențierea genetică între livezile de semințe a fost în general scăzută (Tabelul 2.3).

Tabelul 2.3. Matricea de diferențiere F_{ST} între perechile de populații

	So-P	So-B	So-D	So-A	Nat-C	Nat-M	
So-P	0.0000						
So-B	0.0109	0.0000					
So-D	0.0173	0.0277	0.0000				
So-A	0.0244	0.0147	0.0154	0.0000			
Nat-C	0.0486	0.0467	0.0496	0.0424	0.0000		
Nat-M	0.0439	0.0428	0.0450	0.0366	0.0004	0.0000	

Ordonarea populațiilor pe planul de două coordonate obținută pe baza analizei PCoA a matricei distanței genetice ilustrează nivelul stabilit de diferențiere inter-populațională pentru populațiile de molid analizate. Figura 2.1 arată că majoritatea populațiilor analizate sunt situate pe planul de două coordonate aproape unele de altele. Cu toate acestea, se observă că majoritatea arborilor din cele două populații naturale sunt distribuiți în partea stângă a graficului. Acest aspect confirmă existența unei diferențieri genetice între populațiile

naturale și livezile de semințe, dar care poate fi considerat un risc asumat în dezvoltarea unor programe de ameliorare, menționat și în literatura de specialitate (Ivetić et al., 2016). Totuși, aceasta înseamnă identificarea unui echilibru între câștigul genetic așteptat și pierderea presupusă, dar redusă, a diversității genetice. De asemenea, pentru generațiile avansate de livezi de semințe, strategia de ameliorare trebuie să prevadă includerea de genotipuri noi, pentru a evita creșterea riscului de reducere a diversității genetice (Funda și El-Kassaby, 2012). Acest lucru se impune și ca urmare a eroziunii diversității genetice determinată de eliminarea clonelor nevaloroase (selecție direcțional-pozitivă) pentru a trece la generația următoare de livezi de semințe.

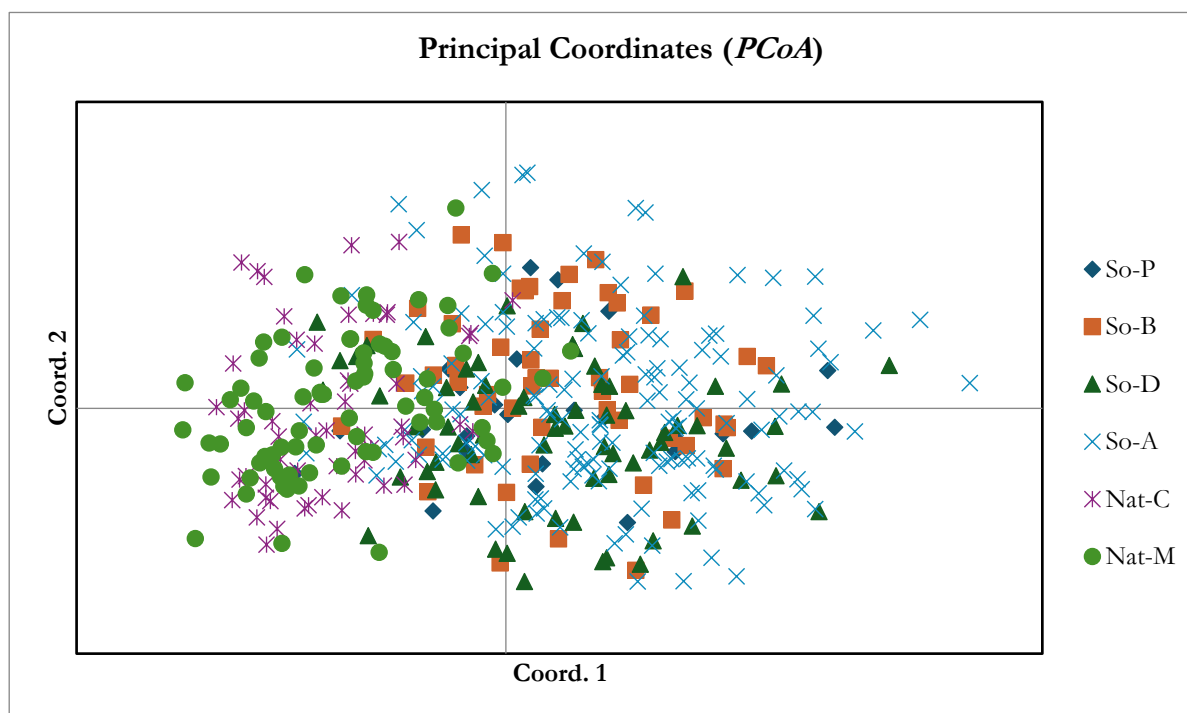


Figura 2.1. Analiza componentelor principale pentru 437 de arbori din 6 populații de molid. Axa 1 și 2 explică 57.28 % și 19.95 % din variația genetică detectată

Structura genetică a populației poate fi definită ca rezultatul interacțiunii dintre procesul genetic, istoria evolutivă și factorii ecologici. Structura genetică a populației este afectată de fluxul genetic, selecție și deriva genetică (Cheng et al., 2020; Tong et al., 2020). Gradul de diferențiere dintre cele șase populații de molid analizate a fost evidențiat printr-o dendrogramă realizată prin metoda UPGMA pe baza distanțelor genetice standard Nei (1972) (Figura 2.2 - B). Dendrograma a arătat o separare clară (valoarea bootstrapping a fost de 85) între populațiile naturale de molid și livezile de semințe. Dendrograma a indicat faptul că populațiile naturale (Nat-C și Nat-M) sunt foarte apropiate din punct de vedere genetic, având o distanță genetică Nei de 0.024.

Structura genetică a populațiilor a fost analizată prin metoda bayesiană (Figura 2.2 - A). Rezultatele pentru numărul cel mai probabil de clustere ($K=2$) au indicat că primul grup (reprezentat de culoarea roșie) este alcătuit din livezi de semințe, iar al doilea grup

(reprezentat de culoarea verde) cuprinde populații naturale de molid. Existența unei structuri genetice diferite a livezilor de semințe poate fi atribuită divergenței adaptative, având în vedere că arborii sunt instalați în afara mediului lor inițial de creștere. Divergența structurală observată poate fi explicată prin faptul că părinții clonelor utilizate în livezile de semințe sunt arbori plus selectați din populații diferite; ca urmare, distribuția variantelor genotipice nu urmează același model observat în cele două populații naturale. În cazul acestei diferențe structurale, trebuie să luăm în considerare și faptul că livezile de semințe conțin un număr limitat de clone și fiecare clonă nu contribuie în mod egal la distribuția fondului genetic.

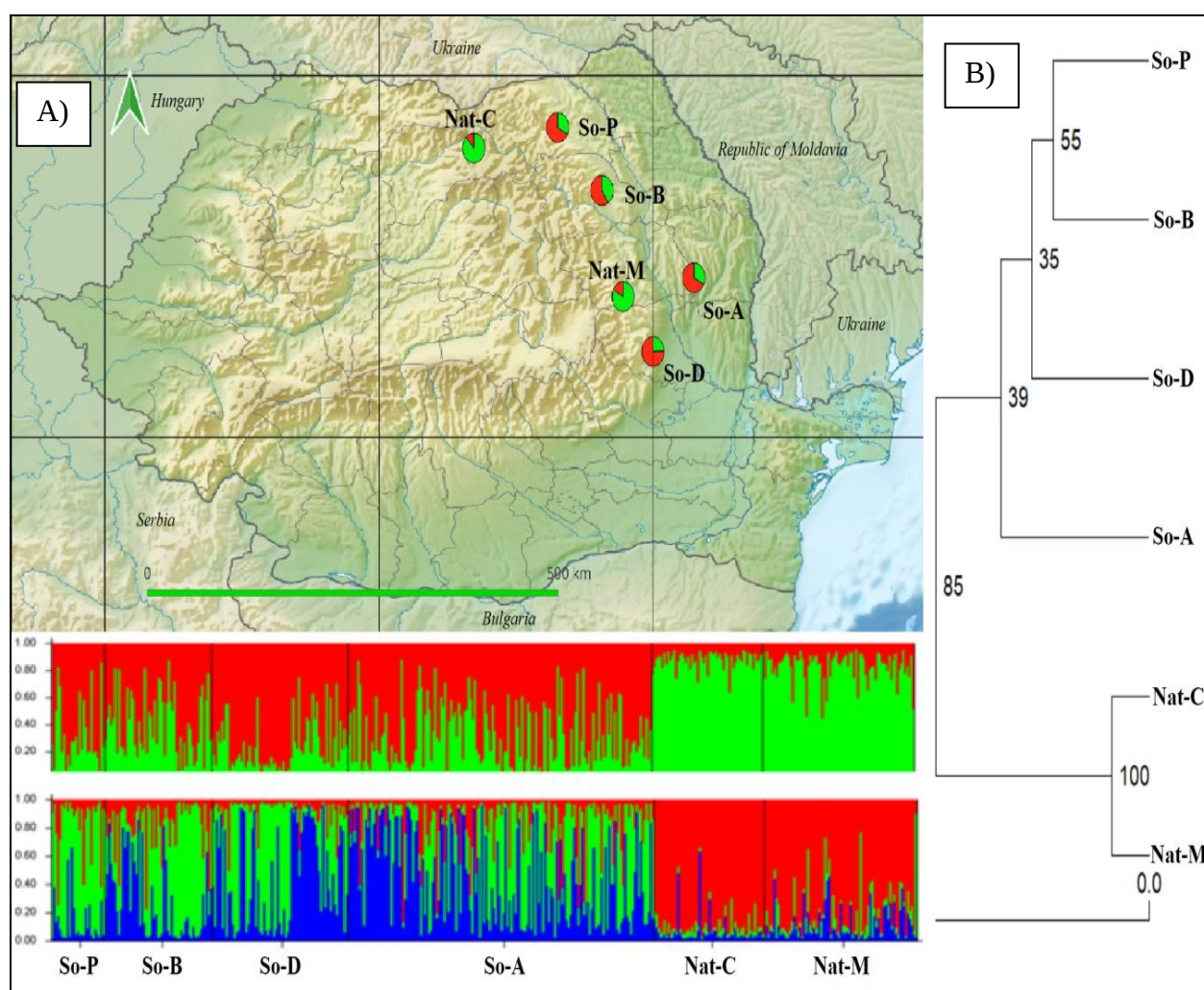


Figura 2.2. Harta cu localizarea populațiilor de molid eșantionate. Diagramele reprezintă proporția medie a apartenenței deduse pentru fiecare cluster identificat de analiza STRUCTURE pentru $K=2$. Rezultatele STRUCTURE pentru două sau trei clustere distincte între populații (A). Dendrogramă UPGMA construită folosind distanța genetică Nei (B).

Pentru surprinderea variabilității genetice au fost efectuate două analize AMOVA diferite. Pentru prima analiză au fost incluse în analiză toate populațiile, iar pentru cea de a doua analiză acestea au fost împărțite în două grupuri (primul grup pentru livezile de semințe și al doilea grup pentru populațiile naturale). Rezultatele au indicat că cea mai mare parte a

variației genetice în cele șase populații de molid poate fi explicată prin diferențierea la nivelul arborilor din cadrul populațiilor 95.16 % ($p < 0,001$) (Tabelul 2.4). Atunci când analiza a fost realizată pentru două grupuri distincte, rezultatele au fost similare, majoritatea diferențierii putând fi explicată prin variația la nivel de individ (93.82 %, $p = 0.0615$). O valoare relativ mică, dar semnificativă ($p < 0,001$) a variației genetice (3.06 % din total) este rezultatul diferențelor dintre cele două grupuri (Tabelul 2.4).

Tabelul 2.4. Analiza moleculară a varianței (AMOVA) pentru populațiile de molid analizate cu ajutorul a 11 markeri de tipul microsateliților

<i>Sursa variației</i>	<i>d.f.</i>	<i>Suma pătratelor</i>	<i>Componente ale variației</i>	<i>Procent de variație</i>	<i>p</i>
<i>Între populații</i>	5	89.477	0.10541 Va	3.02	0.0224
<i>Între indivizii din cadrul populațiilor</i>	431	1484.095	0.06322 Vb	1.81	<0.001
<i>La nivel de individ</i>	437	1449.50	3.31693 Vc	95.16	<0.001
<i>Total</i>	873	3023.072	3.48557	-	-
<i>Între grupuri (primul grup livezi de semințe, al doilea grup populații naturale)</i>	1	50.963	0.10819 Va	3.06	<0.001
<i>Între populațiile din cadrul grupului</i>	4	38.514	0.04700 Vb	1.33	0.0127
<i>Între indivizii din cadrul populațiilor</i>	431	1484.095	0.06322 Vc	1.79	<0.001
<i>La nivel de individ</i>	437	1449.500	3.31693 Vd	93.82	0.0615
<i>Total</i>	873	3023.072	3.53535	-	-

Abrevieri: *d.f.*- grade de libertate; *Va, Vb, Vc, Vd*- Componentele variației; *p* – nivelul semnificației.

Concluzii

Conservarea diversității genetice este esențială pentru supraviețuirea speciilor în contextul schimbărilor climatice. În cadrul populațiilor de molid studiate, parametrii diversității genetice au fost relativ ridicați, iar majoritatea variației genetice s-a datorat diferențierii la nivel de individ. În general, chiar dacă la înființarea livezilor de semințe obiectivul principal a fost selectarea arborilor cu caracteristici superioare (semințe îmbunătățite genetic, lemn de calitate superioară, rezistență la boli și dăunători), rezultatele sugerează faptul că numărul de clone (25-197) utilizate pentru înființarea livezilor de semințe a fost adecvat pentru a conserva și surprinde un nivel ridicat de diversitate genetică din arboretele naturale.

Capitolul 3. Diversitatea genetică a bradului (*Abies alba*) în populații naturale din România

Introducere

În contextul încălzirii globale, populațiile aflate la marginea arealului natural al speciei vor fi primele care vor resimți efectele schimbărilor climatice (Mátyás et al., 2009). Aici, principalele constrângeri sunt temperaturile extreme, seceta, condițiile edafice și disponibilitatea apei, care adesea necesită mecanisme specifice de adaptare, ceea ce duce la selecția naturală a diferitelor trăsături cantitative specifice (Howe et al., 2003). Adaptarea populațiilor la condițiile de stres depinde nu doar de selecție, ci și de alți factori evolutivi, cum ar fi migrația sau deriva genetică (Savolainen, 1996).

Aatfel, potențialul evolutiv al speciilor depinde de structura genetică spațială și de nivelul de diversitate genetică între și în interiorul populațiilor. În acest sens este deosebit de important să se cunoască nivelul diversității genetice și determinismul ecologic în populațiile naturale pentru a evalua răspunsul speciei la schimbările climatice anticipate (Marchi et al. 2016; Ortego et al. 2012). Studiul influenței distribuției geografice și a factorilor de mediu asupra structurii genetice actuale poate oferi informații privind separarea proceselor adaptive locale de cele ale izolării spațiale (Wang, 2013). Totodată analiza structurii genetice și identificarea populațiilor cu adaptabilitate ridicată sunt provocări importante pentru conservarea resurselor genetice ale speciilor (Eckert et al., 2008). Spre deosebire de populațiile din arealul continuu al speciei, populațiile marginale au fost puțin studiate în ciuda importanței critice a acestora ca depozite pe termen lung ale diversității genetice (Hampe și Petit, 2005).

Distribuția variabilității genetice pentru populațiile marginale a fost descrisă pentru unele specii, precum pinul silvestru (Savolainen, 1996) și fagul european (Ciocîrlan et al., 2017), în timp ce pentru brad, studiile recente indică pe de o parte o capacitate mai mare de adaptare la efectele schimbărilor climatice, comparativ cu alte specii de conifere (de exemplu, molidul, pinul silvestru) (Tinner et al., 2013, Rousch et al., 2016), iar pe de altă parte posibilitatea existenței unui declin al acestuia în regiunile calde și uscate ale Europei (Bosela et al. 2018).

La marginea estică a arealului natural al bradului, cele mai vulnerabile populații sunt situate la altitudini joase, în zone cu un deficit pronunțat de precipitații (așa cum sunt cele din marginea Carpaților Orientali și cele din Munții Banatului (Mihai et al. 2018)). Studiile genetice și palinologice au identificat trei refugii glaciare pentru brad în Europa: sudul Italiei, nord-vestul Greciei și Munții Pirinei (Konnert și Bergmann, 1995; Terhürne-Berson et al., 2004; Cheddadi et al., 2014). Se presupune că bradul din Europa de Est provine în mare parte din refugii glaciare situate în sudul Peninsulei Balcanice (Konnert și Bergmann, 1995). Rutele migrației postglaciare, evaluate prin palinologie, au concluzionat că bradul a ajuns în arealul

din România prin sudul Carpaților, ocupând inițial Carpații Occidentali (Munții Apuseni și Banat), din care ulterior a migrat spre Carpații Orientali (Diaconeasa și Fărcaș, 2001, Feurdean și Willis, 2008). Bradul a ajuns în Carpații Orientali cu aproximativ 2500 de ani mai târziu decât în sud-vestul României (Fărcaș et al., 2013, Tanțău et al., 2003).

Ipotezele privind existența de refugii glaciare în Carpații Meridionali (Munții Retezat) (Magyari et al., 2012) nu sunt susținute (Postolache et al., 2016), dar nu se poate respinge complet existența unor mici micro-refugii care au contribuit la o expansiune rapidă a speciei în Holocen (Vitasse et al. 2019), având în vedere faptul că, relativ recent, a fost identificat un nou refugiu glaciare în nordul Apeninilor și Colinele Euganea din Italia de Nord (Samartin et al., 2016, Gubler et al., 2018).

Deși studiile anterioare au analizat capacitatea populațiilor de brad de a se adapta la schimbările climatice, populațiile de brad de la marginea sud-estică a arealului său (de exemplu, Carpații României) rămân încă puțin studiate. Această zonă cu caracteristici ecologice și climatice foarte diverse, aflată la convergența a trei regiuni biogeografice (Europa de Sud, Centrală și de Est) reprezintă unul dintre centrele cu cea mai mare diversitate din Europa (Feurdean și Tanțău, 2017). În Carpații României, bradul crește în diverse condiții climatice (de exemplu, climat submediteranean în sud-vest și climat continental în nord) și pe substraturi litologice variate. Dacă în Carpații Orientali, distribuția naturală a bradului se suprapune cu formațiuni paleocene și cretacice (marne, nisipuri, argile), în Carpații Occidentali acesta se întâlnește pe roci metamorfice (șisturi cristaline, granit etc.) (Lucău-Dănilă, 1991).

Analiza polenului indică o influență antropogenică evidentă, sugerând că reducerea substanțială a suprafeței ocupate de brad, cel puțin în zona de nord-est, se datorează exclusiv tăierilor masive din trecut (Tanțău et al., 2011). Impactul uman asupra distribuției, structurii și funcționalității pădurii a devenit și mai evident în ultimii 300 de ani, proporția bradului scăzând cu aproximativ 15% în această perioadă (Barbu et al., 2015).

Scopul acestui articol a fost evaluarea nivelului de diversitate genetică și analiza structurii genetice a populațiilor de brad de la limita estică a arealului natural (Carpații României), incluzând contribuția relativă a istoriei, factorilor de mediu și geografiei asupra variației genetice actuale, ca un preambul pentru stabilirea unor măsuri sustenabile pentru conservarea biodiversității speciei. Mai precis, prin aceste analize s-au făcut cercetări pentru a putea răspunde la următoarele întrebări: (i) Este structura genetică a populațiilor de brad omogenă, conform istoricului migrației postglaciare? (ii) În ce măsură au influențat factorii antropogeni și de mediu diversitatea și structura genetică actuală a populațiilor de brad? (iii) Au populațiile de brad de la limita estică a distribuției capacitatea de a supraviețui în fața schimbărilor climatice anticipate?

Material și metode

Colectarea și analiza probelor

În Carpații României, bradul acoperă aproximativ 5% din suprafața pădurilor și este a doua specie de conifere ca importanță (Barbu și Barbu, 2005). Aproape două treimi din aria sa de distribuție se află în Carpații Orientali, la altitudini cuprinse între 400 m și 1200 m altitudine, unde formează masive pure sau de amestec cu fagul și molidul. În restul Carpaților României, bradul are o distribuție fragmentată și se întâlnește în amestecuri de fag și molid (Șofletea și Curtu, 2001).

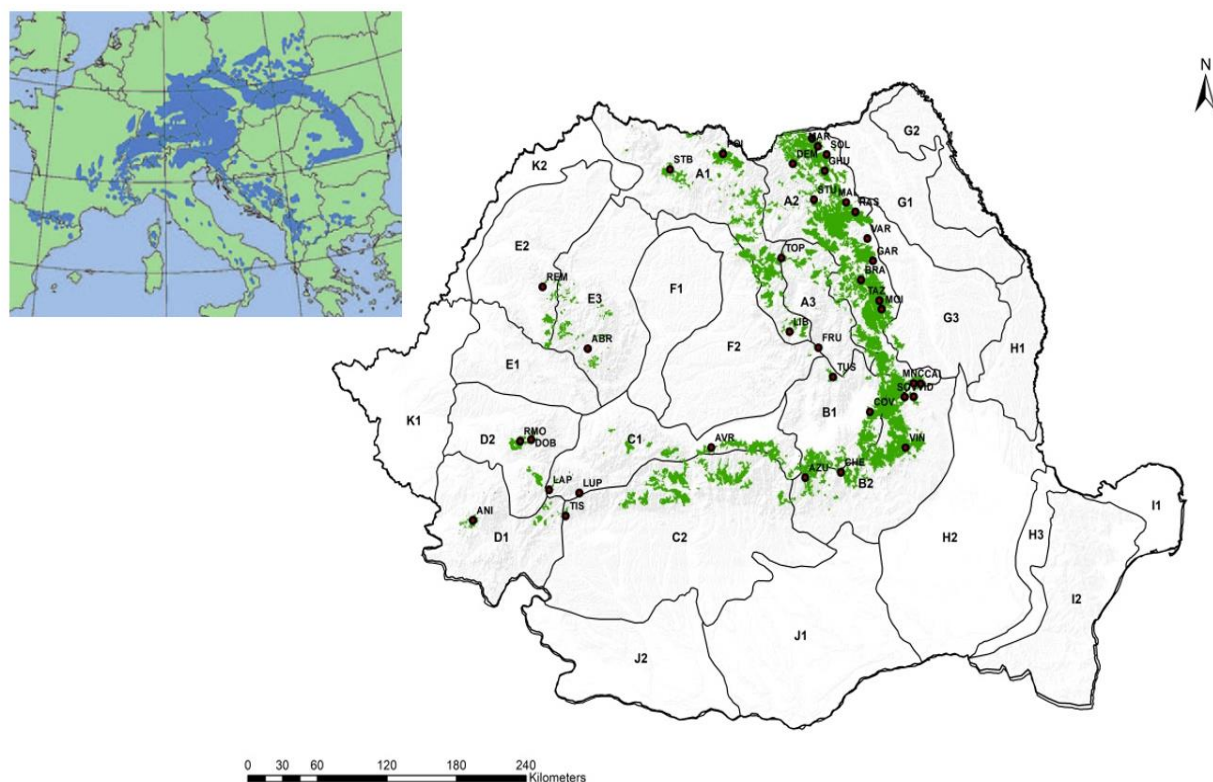


Figura 3.1. Arealul natural al bradului în România și locațiile geografice ale celor 36 de populații utilizate în acest studiu. Detaliul arată arealul speciei în Europa (EUFORGEN). Codurile populațiilor și regiunile de proveniență sunt prezentate în Tabelul 3.1. Harta distribuției a fost generată în funcție de tipul principal al ecosistemului de pădure de brad din România.

Pentru a surprinde întreaga variabilitate a ecotipurilor de brad din arealul românesc – adică populațiile termofile din Munții Banatului (Carpații Occidentali), populațiile din climat continental din Bucovina (Carpații Nordici) sau cele adaptate la un climat rece și deficit de precipitații din dealurile Moldovei (Carpații Orientali) (Șofletea și Curtu, 2001) – în perioada 2014-2016 au fost colectate probe din 36 de populații de brad din Carpații României. Toate populațiile analizate au fost regenerate natural, considerate autohtone, majoritatea fiind desemnate drept resurse genetice forestiere (RGF) (Pârnuță et al., 2012) sau surse de

semințe selectate (Tabelul 3.1). A fost realizată o analiză genetică extinsă a populațiilor din partea estică a arealului de distribuție (Figura 3.1), în principal pentru că această regiune reprezintă marginea estică a distribuției speciei în Europa și, conform predicțiilor, va fi cea mai vulnerabilă în contextul schimbărilor climatice.

Au fost colectate ace sau probe de cambiu de la 35-40 de indivizi/populație, aflați la o distanță de cel puțin 30 m, pentru extragerea ADN-ului. Arborii eșantionați aveau vârsta de aproximativ 100 de ani.

Tabelul 3.1 Descrierea celor 36 de populații de brad (*Abies alba* Mill.) analizate

Nr.	Cod	Populație	Coordonate geografice		Altitudine	Substrat geologic	Regiune de proveniență*
			Latitudine	Longitudine	(m)		
1	POI	Poieni	47°52'	24°36'	950	Șisturi cristaline	A1
2	STB	Strâmbu Băiuț	47°38'	24°00'	800	Roci magmatice	A1
3	LIB	Liban	46°28'	25°22'	720	Roci magmatice	A1
4	TOP	Toplița	47°00'	25°16'	1100	Roci magmatice	A3
5	FRU	Frumoasa	46°21'	25°41'	920	Marne	A3
6	TUS	Tușnad	46°09'	25°51'	700	Roci magmatice	A3
7	DEM	Demăcușa	47°41'	25°25'	1100	Flișuri	A2
8	STU	Stulpicani	47°25'	25°39'	900	Roci metamorfice	A2
9	BRA	Brateș	46°50'	26°10'	850	Flișuri	A2
10	MOI	Moinești	46°37'	26°24'	800	Argile	A2
11	PUT	Putna	47°51'	25°38'	650	Flișuri	A2
12	MAR	Marginea	47°48'	25°42'	670	Flișuri	A2
13	SOL	Solca	47°45'	25°48'	500	Marne	A2
14	GHU	Gura Humorului	47°38'	25°47'	730	Flișuri	A2
15	MAL	Mălini	47°24'	26°01'	550	Gresii	A2
16	RAS	Râșca	47°20'	26°07'	500	Marne	A2
17	VAR	Văratec	47°08'	26°15'	600	Flișuri	A2
18	GAR	Gârcina	46°58'	26°19'	550	Marne	A2
19	TAZ	Tazlău	46°41'	26°22'	550	Flișuri	A2
20	MNC	Cașin	46°05'	26°45'	520	Argile	A2

Nr.	Cod	Populație	Coordonate geografice		Altitudine (m)	Substrat geologic	Regiune de proveniență*
			Latitudine	Longitudine			
21	CAI	Căiuți	46°05'	26°50'	500	Argile	A2
22	SOV	Soveja	47°59'	26°38'	550	Gresii	B2
23	VID	Vidra	46°00'	26°44'	520	Gresii	B2
24	VIN	Vintileasca	45°37'	26°38'	1050	Flișuri	B2
25	CHE	Cheia	45°27'	25°55'	920	Flișuri	B2
26	AZU	Azuga	45°25'	25°32'	950	Flișuri	B2
27	COV	Covasna	45°53'	26°15'	900	Flișuri	B1
28	AVR	Avrig	45°39'	24°29'	750	Șisturi cristaline	C1
29	LAP	Lăpușnic	45°18'	22°43'	1200	Gresii	C1
30	LUP	Lupeni	45°18'	23°02'	800	Șisturi cristaline	C1
31	TIS	Tismana	45°08'	22°54'	720	Granite	C2
32	ANI	Anina	45°04'	21°53'	650	Roci calcaroase	D1
33	DOB	Dobra	45°40'	22°30'	1100	Șisturi cristaline	D2
34	RMO	Rusca Montană	45°39'	22°22'	1000	Șisturi cristaline	D2
35	REM	Remeți	46°46'	22°34'	850	Roci magmatice	E2
36	ABR	Abrud	46°20'	23°06'	950	Flișuri	E3

Abrevieri: A1 – Carpații Orientali Interiori; A2 – Carpații Orientali Exteriori; A3 – Carpații Orientali: Depresiunea Giurgeu-Ciuc; B1 – Carpații de Curbură: Depresiunea Brașov; B2 – Carpații de Curbură; C1 – Carpații Meridionali: partea nordică; C2 – Carpații Meridionali: partea sudică; D1 – Munții Banatului: Mehedinți-Cerna-Semenic; D2 – Munții Banatului: Țarcu-Poiana Ruscă; E2 – Munții Apuseni: partea vestică; E3 – Munții Apuseni: partea estică.

Materialul a fost colectat în pungi cu silicagel și stocat la -70°C înainte de analiză. ADN-ul genomic a fost extras urmând metodele lui Dumolin et al. (1995). Genotiparea s-a realizat cu ajutorul a șapte markeri de tipul microsateliților: patru dezvoltați pentru *Abies nordmanniana* (NFH3, NFH15, NFF7 și NFF3) (Hansen et al., 2005) și trei dezvoltați pentru *Abies alba* (Sf1, Sfb4 și Sf78) (Cremer et al., 2006). Acești șapte loci au fost separați în două combinații de tip multiplex. Pentru reacțiile PCR, s-a folosit kitul *Qiagen Type-it Microsatellite PCR Kit* (Qiagen, Germania), care este un amestec optimizat și gata de utilizat. Reacțiile multiplex au fost pregătite sub forma unui amestec de 15 μl produs PCR, conținând 7,5 μl soluție tampon PCR multiplex Qiagen (2x), 1,5 μl amestec de primeri, 1 μl ADN (de concentrație 30-50 ng ADN genomic) și 5 μl apă ultra pură. Concentrațiile primerilor au fost

0,05 μmol NFF7, 0,40 μmol NFH3 și 0,40 μmol NFF3 în multiplex A; 0,10 μmol Sfb4, 0,20 μmol Sf78, 0,20 μmol Sf1 și 0,20 μmol NFH15. Reacțiile PCR au fost realizate într-un Palm-Cycler (Corbett) folosind programul următor: 15 min. la 95°C, urmate de 27 de cicluri de 30 secunde la 94°C, 1,30 minute la 57°C și 30 secunde la 72°C, și o extensie finală de 30 minute la 60°C. Produsele PCR obținute au fost analizate cu ajutorul unui sistem GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc., SUA). Genotipurile au fost înregistrate utilizând software-ul Genomelab ver. 10.2.3 (Beckman Coulter). Microsateliții utilizați sunt în general dinucleotidici, cu excepția marker-ului Sf1 care este trinucleotidic.

Datele rezultate au fost mai întâi verificate pentru prezența alelelor nule și a erorilor de genotipare, folosind software-ul Micro-Checker 2.2.3. (van Oosterhout et al., 2004). Dezechilibrul linkage și abaterile semnificative de la echilibrul Hardy-Weinberg la locusurile nSSR au fost testate cu programele Genepop (Rousset, 2008) și FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet, 1995). Au fost estimați principalii parametri ai diversității genetice: numărul mediu de alele per locus (N_a), bogăția alelică (A_R), numărul de alele private (A_P), heterozigoția observată (H_o), heterozigoția așteptată (H_e) și coeficientul de consangvinizare (F_{IS}) folosind software-ul FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet, 1995) și Arlequin ver. 3.5 (Excoffier și Lischer, 2010). Nivelul de semnificație al abaterii F_{IS} de la zero a fost calculat pe baza a 5000 de randomizări utilizând programul FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet, 1995).

Structura genetică

Diferențierea genetică între cele 36 de populații de brad a fost estimată prin indicele de diferențiere F_{ST} (Weir și Cockerham, 1984) utilizând Arlequin 3.5.2 (Excoffier et al., 2005), reprezentată grafic cu ajutorul instrumentului online Heatmapper (Babicki et al., 2016); semnificația F_{ST} a fost testată prin 10000 de permutări. Pe baza valorii indicelui de diferențiere F_{ST} , a fost construită o dendrogramă de tipul *neighbour-joining* în software-ul SPLITTREE 4.13.1 (Huson, 1998). Ulterior, pentru a determina procentul de variație genetică din cadrul și între populații, s-a realizat o analiză a varianței moleculare (AMOVA). Apoi, populațiile au fost grupate astfel: (i) pe regiuni geografice diferite ale Carpaților: NEC – Carpații nord-estici, CC – Carpații de curbură, SC – Carpații Meridionali și SWC – Carpații sud-vestici și (ii) pe grupuri omogene rezultate din STRUCTURE versiunea 2.3.4 (Pritchard et al. 2009), unde $K = 2$ și afilierea la grupul individual era mai mare de 0.6. Pe baza acestora, au fost realizate trei niveluri de analiză moleculară a varianței (AMOVA) și variația moleculară a fost împărțită între grupuri (FCT), între populații din cadrul grupurilor (FSC) și între populații (FST). Structura genetică a populațiilor a fost evaluată prin metoda de grupare Bayesiană, implementată în STRUCTURE; simulările au fost rulate de 5 ori pentru fiecare valoare a lui K (1-10) pentru 100000 de iterații, după o perioadă de burn-in de 100000 de iterații cu modelul LOCPRIOR. Cel mai bun număr de grupuri diferite folosind parametrul ΔK (Evanno et al. 2005) a fost determinat cu STRUCTURE HARVESTER v. 0.6.94 (Earl și von Holdt 2012), în timp ce

reprezentarea grafică a rezultatelor STRUCTURE a fost realizată cu aplicația online POPHELPER (Francis 2016).

Analiza peisajului

Ipoteza izolării prin distanță (IBD) a fost testată prin efectuarea unui test Mantel între matricea F_{ST} și distanțele geografice, cu 9999 permutări aleatorii, utilizând programul GenAlEx 6.5 (Peakall și Smouse, 2012). Pentru a evita eventualele probleme cauzate de structura populațională, deoarece testul IBD ar putea fi puternic influențat de aceasta (Meirmans, 2012), am testat IBD separat pentru fiecare grup obținut prin analiza STRUCTURE.

Pentru a identifica discontinuitățile și barierele importante în distribuția diversității genetice, s-au utilizat două metode de detectare a acestora (Blair et al., 2012). În primul rând, a fost realizată o analiză a formelor peisajului genetic utilizând software-ul ALLELES IN SPACE (AIS) (Miller, 2005), prin construirea unei rețele de triangulație Delaunay între populațiile de brad pe baza coordonatelor geografice și calculul distanțelor genetice medii, urmat de o procedură de interpolare pentru a deduce distanțele genetice. În cadrul graficului tridimensional rezultat, X și Y reprezintă coordonatele probelor, iar coordonatele Z (înălțimile graficului de suprafață) corespund distanțelor genetice. Ulterior, a fost utilizat algoritmul Monmonier pentru distanța maximă, implementat în BARRIER versiunea 2.2 (Manni et al., 2004), pentru a identifica eventualele bariere genetice. Coordonatele geografice ale fiecărei populații de brad au fost conectate printr-o triangulație Delaunay și a fost estimată teselația Voronoï corespunzătoare. Mai departe, distanțele genetice Nei asociate (DA) au fost calculate în software-ul MSA (Dieringer și Schlötterer, 2003), iar 100 de replicări bootstrap ale matricei de distanță au fost utilizate pentru a calcula semnificația statistică a barierelor prevăzute. S-au testat $N = 6$ bariere, în conformitate cu numărul maxim posibil de grupuri obținute din analiza STRUCTURE (Figura 3.4). În final, doar barierele genetice cu suport bootstrap de peste 80% au fost reprezentate.

Rezultate

Diversitatea genetică a populațiilor

În toate populațiile, cei șapte markeri analizați au reliefat un nivel ridicat de polimorfism, având un număr total de 214 alele. Numărul de alele pe locus (N_a) a variat de la 9 (marker-ul Sf1) la 58 (marker-ul Sf78), în timp ce valoarea heterozigoției observate (H_o) a variat de la 0.452 (Sf1) la 0.905 (NFF7) (Tabelul 3.2). Analiza datelor din fiecare populație a relevat prezența alelelor nule pentru trei markeri (Sf1, Sfb4 și Sf78) în nouă populații, și pentru doi markeri (Sfb4 și NFH15) în două populații. Frecvența alelelor nule a fost mai mică de 10%, cu o medie de 7%, de aceea toți markerii au fost păstrați pentru analizele ulterioare. A fost detectat un dezechilibru *linkage* semnificativ ($p < 0.001$) pentru trei combinații de

markeri: NFH3 și Sf78 în populația BRA, NFH3 și NFH15 în populația SOV, și NFH3 și NFF7 în populația VID.

Tabelul 3.2. Caracterizarea markerilor nSSR utilizați în analiză

Nr.	Locus	Lungimea observată a fragmentelor (bp)	Na	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}
1	NFH3	91-191	19.69 ±0.26	0.894 ±0.008	0.883 ±0.005	-0.012 ±0.008	0.026
2	NFH15	98-140	11.69 ±0.23	0.810 ±0.012	0.801 ±0.008	-0.011 ±0.012	0.03
3	NFF3	111-157	9.47 ±0.21	0.814 ±0.010	0.800 ±0.005	-0.017 ±0.012	0.028
4	NFF7	116-176	17.19 ±0.28	0.905 ±0.008	0.898 ±0.003	-0.007 ±0.009	0.023
5	Sf78	161-291	20.72 ±0.36	0.890 ±0.011	0.907 ±0.003	0.020 ±0.011	0.028
6	Sfb4	143-199	15.36 ±0.33	0.845 ±0.011	0.853 ±0.004	0.010 ±0.013	0.027
7	Sf1	206-230	4.02 ±0.18	0.442 ±0.015	0.452 ±0.009	0.022 ±0.028	0.021

Abrevieri: Na - numărul de alele pe locus, Ho - heterozigoția observată, He - heterozigoția așteptată, FIS - coeficientul de consangvinizare, FST - coeficientul de diferențiere

Parametrii diversității genetice ai populațiilor de brad sunt prezentați în Tabelul 3.3. Numărul mediu de alele detectate pe locus (Na) a variat de la 11.85 (VID) la 15.57 (AVR), cu o valoare medie de 14.02. Cea mai mică valoare a bogăției alelice (A_R) a fost găsită în populația VID (11.61) și cea mai mare de 14.93 în populația AVR. Valoarea heterozigoției observate (Ho) a variat de la 0.779 (populația AZU) la 0.834 (populația REM). Au fost identificate 21 de alele private, numărul maxim de 2 alele private fiind găsit în populația nordică POI, populația estică VID și în trei populații din regiunea sud-vestică (TIS, ANI și ABR). Cele mai mici valori ale coeficientului de consangvinizare (FIS) (-0.072) a fost identificat în populațiile TUS și COV, ceea ce indică un exces semnificativ de heterozigoți ($p < 0.01$) (Tabelul 3.3), iar cele mai mari valori (0.081, $p < 0.001$) în populația ANI din Munții Banatului.

Tabelul 3.3. Indicii diversității genetice la nivel populațional pe baza a 7 markeri nucleari

Populație	N	Na	A _R	A _P	H _o	H _e	F _{IS}
POI	40	14.85	14.36	2	0.84	0.833	-0.008
STB	40	14	13.47	1	0.814	0.828	0.017
LIB	40	14	13.52	0	0.786	0.798	0.016
TOP	40	14.14	13.69	0	0.785	0.799	0.019
FRU	40	13.57	13.16	0	0.823	0.805	-0.021
TUS	40	14	13.39	0	0.846	0.789	-0.072**
TOM	40	14.42	13.86	1	0.786	0.822	0.045*
STU	40	14.28	13.73	0	0.775	0.807	0.04
PUT	40	13.85	13.41	0	0.846	0.819	-0.033
MAR	40	14.71	14.12	0	0.814	0.817	0.004
SOL	40	13.71	13.14	1	0.793	0.827	0.042
GHM	40	14.14	13.66	0	0.775	0.82	0.055*
MAL	40	13	12.65	0	0.836	0.813	-0.028
RAS	40	13.28	12.81	1	0.793	0.822	0.036
VAR	40	14.14	13.6	1	0.804	0.814	0.013
GAR	40	14.28	13.77	0	0.796	0.831	0.043*
BRA	40	15.28	14.69	1	0.811	0.816	0.007
TAZ	40	13.57	13.16	0	0.789	0.831	0.051*
MOI	40	13.42	12.93	0	0.8	0.815	0.02
CAS	35	13	13	0	0.788	0.789	0.003
CAI	40	13.85	13.28	0	0.814	0.8	-0.017
SOV	40	14.28	13.74	0	0.793	0.806	0.017
VID	40	11.85	11.61	2	0.781	0.797	0.021
VIN	40	14	13.4	0	0.772	0.813	0.051*
CHE	40	14.28	13.82	0	0.81	0.803	-0.008
AZU	40	14	13.44	0	0.766	0.779	0.018
COV	40	14.14	13.58	1	0.868	0.809	-0.072**
AVR	40	15.57	14.93	1	0.828	0.821	-0.009
LUP	40	14.57	13.91	1	0.821	0.809	-0.015
LAP	40	14.14	13.56	1	0.793	0.804	0.015
TIS	40	13.85	13.32	2	0.782	0.784	0.003
ANI	40	14.42	13.85	2	0.729	0.794	0.083***
DOB	40	13.28	12.88	0	0.8	0.801	0.002
RMO	40	14.28	13.61	0	0.775	0.789	0.018
ABR	40	14.57	13.87	2	0.761	0.793	0.041
REM	40	14	13.51	1	0.8	0.834	0.041
Total		14.02	13.51		0.8	0.81	0.012

Abrevieri: N – numărul de probe; Na - numărul de alele; A_R – bogăția alelică; A_P - numărul de alele private; H_o - heterozigoția observată; H_e—heterozigoția așteptată; F_{IS} - coeficientul de consangvinizare; SE - eroarea standard

* Valorile FIS semnificative ($p < 0,05$) sunt indicate printr-un asterisc

În general, un nivel mai ridicat de diversitate genetică, atât în ceea ce privește bogăția alelică, cât și heterozigoția așteptată (H_e), a fost găsit în populațiile din Carpații Orientali (Figura 3.2), cu cea mai mare valoare a heterozigoției așteptată (H_e) în populațiile din nordul și estul Carpaților Orientali (Figura 3.2a). Același model a fost observat și în ceea ce privește distribuția bogăției alelice (A_R), dar diferențele nu au fost la fel de evidente ca în cazul heterozigoției așteptate (H_e) (Figura 3.2b).

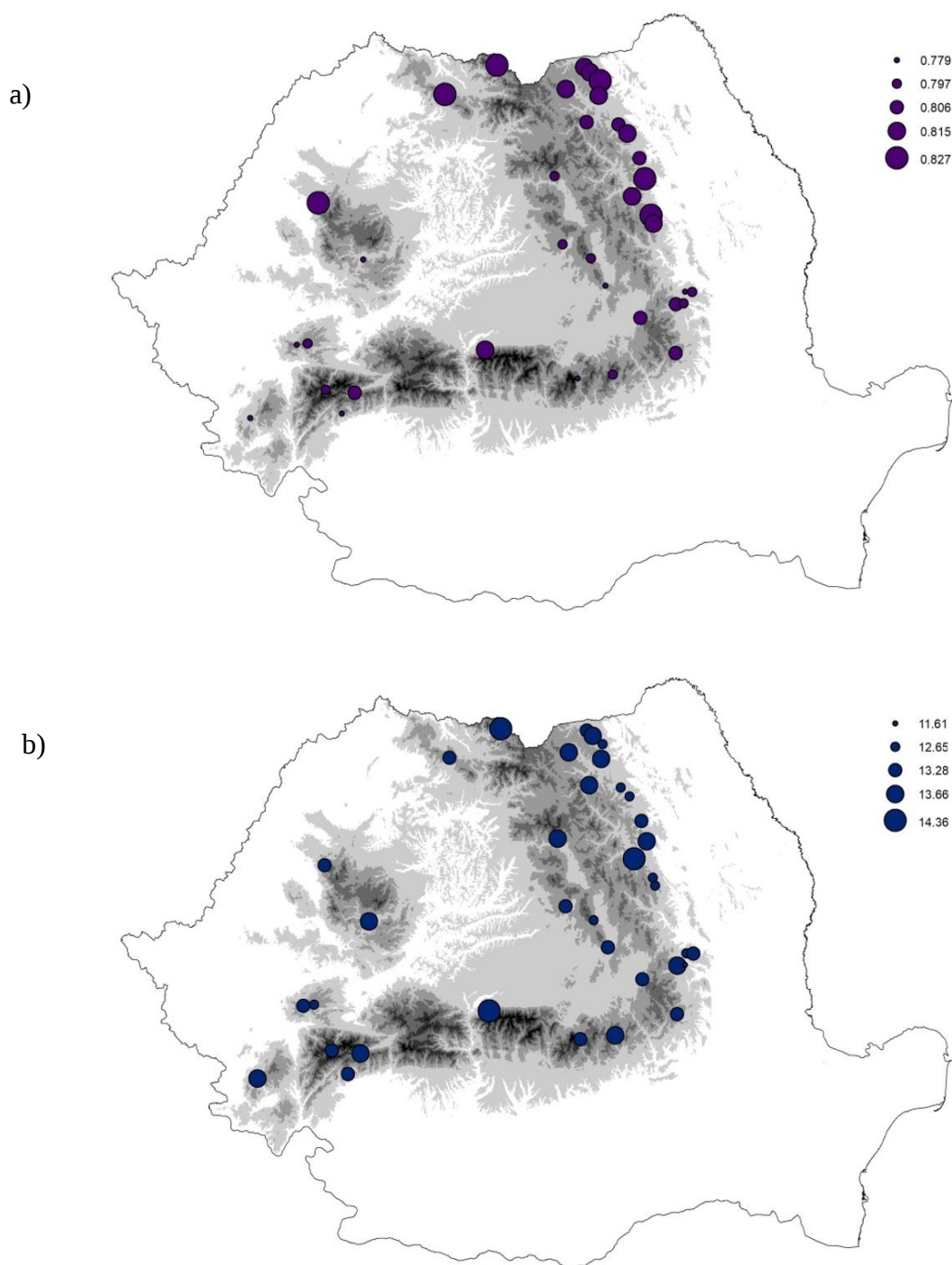


Figura 3.2. Distribuția spațială a diversității genetice în rândul populațiilor de brad din România - a) Heterozigoția așteptată (H_e) b) Bogăția alelică (A_R)

Diferențierea populațiilor

Nivelul de diferențiere genetică între populațiile analizate a fost relativ scăzut ($F_{ST} = 0.014$) (Tabelul 3.4, Figura 3.3), deși mai mult de jumătate (65%) din valorile F_{ST} per pereche au fost semnificative ($p < 0.001$), variind de la 0.001 la 0.036. Cea mai mare diferențiere a fost găsită între populația estică CAS și populația sudică TIS. Cele mai mici valori au fost obținute între populațiile apropiate din punct de vedere geografic, cum ar fi MAL și RAS, CAS și CAI, precum și între populația vestică RMO și patru populații din regiunea sud-vestică (AVR, LUP, ANI și DOB). Matricea de perechi F_{ST} (Figura 3.3) arată că diferențierea între populațiile din interiorul grupurilor nord-estice și sud-vestice este mai mică, comparativ cu populațiile centrale din Carpații Meridionali).

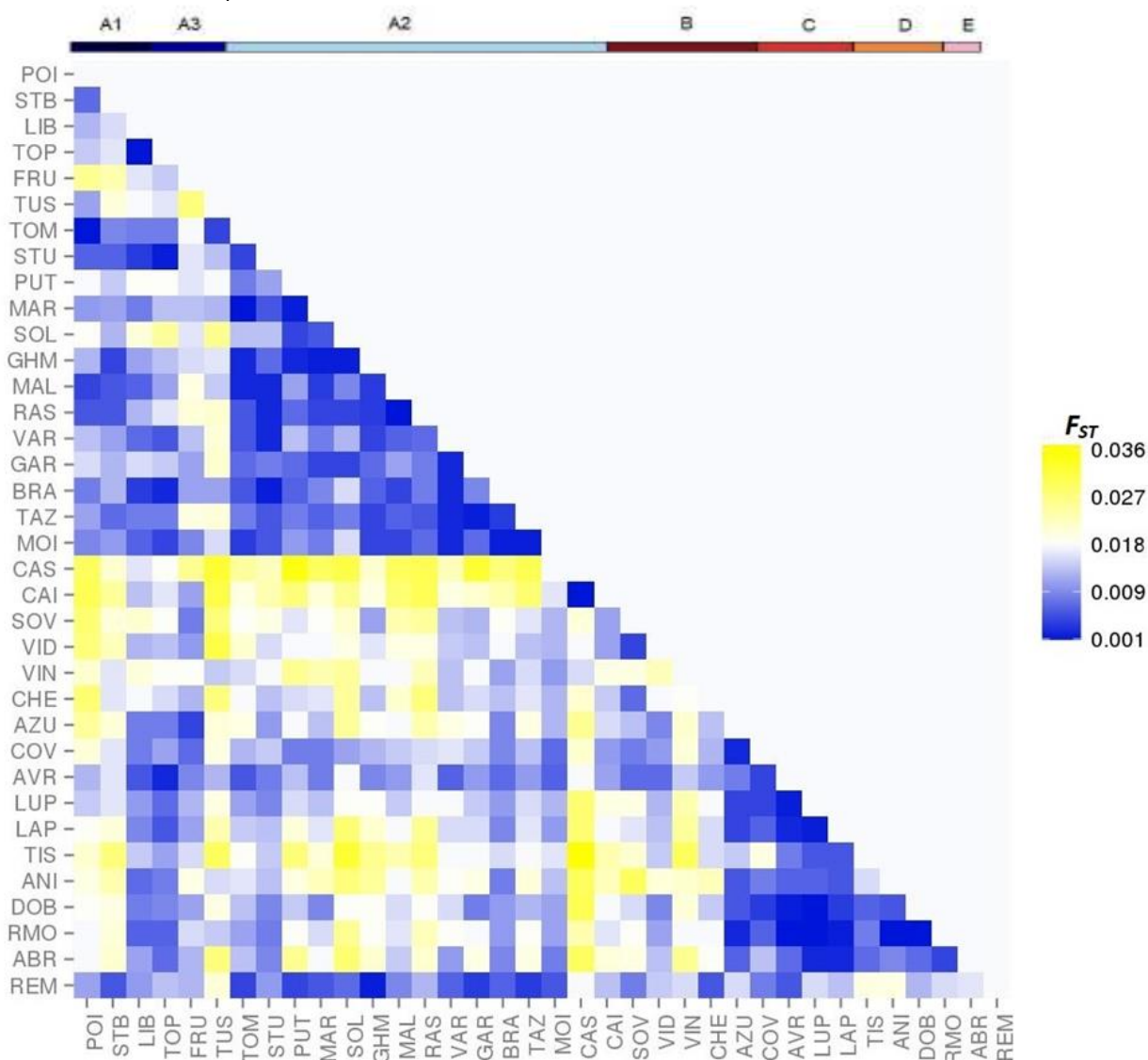


Figura 3.3. Indicele de diferențiere F_{ST} între populațiile de brad (A1 – partea vestică a Carpaților Orientali; A2 – partea estică a Carpaților Orientali; A3 – Carpații Orientali; Depresiunea Giurgeu-Ciuc; B – Carpații de Curbură; C – Carpații Meridionali; D – Munții Banatului; E – Munții Apuseni)

Analiza moleculară a varianței a relevat că doar o mică proporție din diversitatea genetică a fost găsită între populații, 98% din diversitatea genetică fiind prezentă în cadrul populațiilor. Analiza AMOVA, efectuată după gruparea populațiilor de brad în funcție de regiunile de proveniență și de clusterelor genetice, a arătat rezultate similare, cu doar 0.43%, respectiv 0.76% din variație distribuită între grupuri, și aceeași proporție semnificativă ($p < 0.0001$) a variației genetice găsită în interiorul populațiilor (~98%) (Tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Analiza moleculară a varianței (AMOVA) pentru 36 de populații de brad, bazată pe markeri nSSR: a) Toate populațiile; b) Între regiunile de proveniență; c) Între clusterelor genetice identificate cu programul STRUCTURE

Sursa variației	d.f.	Suma pătratelor	Componentele varianței	% Variația	F-statistic
a)					
Între populații	35	215.447	0.04176	1.452	0.014***
În interiorul populațiilor	2830	8012.751	2.833.62	98.547	
b)					
Intre proveniențe (FCT)	3	38.400	0.01264	0.438	0.004***
Între populațiile din cadrul regiunilor de proveniență (FSC)	32	177.084	0.03394	1.178	0.011***
În interiorul populațiilor (FST)	2830	8012.751	2.83362	98.383	0.016***
c)					
Între cluster (FCT)	1	33.445	0.02193	0.760	0.007***
Între populațiile din cadrul clusterelor (FSC)	31	164.145	0.03097	1.073	0.010***
În interiorul populațiilor (FST)	2593	7338.076	2.83242	98.16	0.018***

Abrevieri: d.f. – grade de libertate

Analiza STRUCTURE a identificat două cluster genetice distincte ($K=2$) (Figura 3.4a). Cel mai mare cluster (culoare roșie în Figura 3.4c) a inclus majoritatea populațiilor din Carpații de curbură (B), Carpații Meridionali (C) și Munții Banatului (D), cu două excepții: populațiile REM (Munții Apuseni) și VIN (Carpații de curbură), care au fost incluse în al doilea cluster principal. Acest prim cluster mare a fost împărțit ulterior într-un subgrup sud-estic (Carpații de curbură) și un grup sud-vestic (Carpații Meridionali și Munții Banatului) (Figura 3.4c). Al

doilea cluster major (culoare albastră în Figura 3.4c) conține majoritatea populațiilor din partea de est a Carpaților Orientali (A2) și partea de vest a acestora (A1 și A3). Totuși, în cadrul Carpaților Orientali, proporția de amestec genetic este mai pronunțată decât în regiunea sud-vestică.

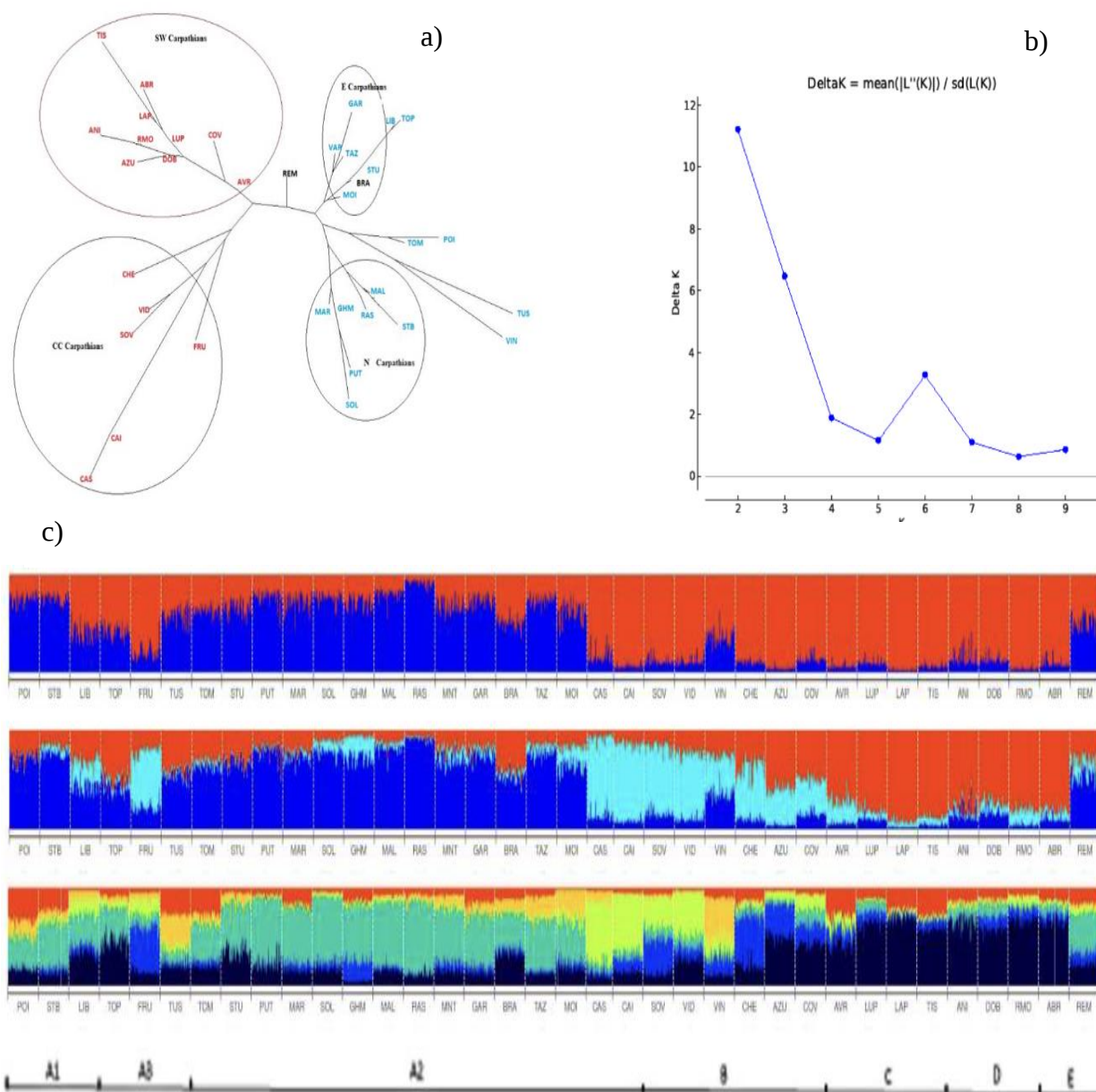


Figura 3.4. Structura populațională dedusă dintr-o analiză de tip Bayesian și un arbore filogenetic Neighbor-Joining: a) Arborele filogenetic Neighbor-Joining; b) Graficul delta K cu un vârf distinct la $K = 2$ și două vârfuri mai mici la $K = 3$ și $K = 6$; c) Structura genetică a celor 36 de populații de brad pentru diferite valori K. Grupurile identificate se disting prin culori diferite.

Arborele Neighbour-Joining indică un mod de grupare similar celui rezultat din analiza bayesiană, cu două cluster mari care conțin populațiile din Carpații de curbură și Munții

Banatului, și alte patru subgrupuri legate de regiunea Carpaților Orientali; altfel, se explică numărul de 6 clustere obținut prin analiza STRUCTURE (Figura 3.4b).

Genetica peisajului

Modelul IBD (Izolare prin distanță) reliefat de testul Mantel a indicat o corelație slabă, dar semnificativă între gradul de diferențiere genetică (F_{ST}) și distanțele geografice ($r = 0.359$, $P = 0.010$) atunci când s-au luat în considerare toate populațiile, ușor mai mare și semnificativă pentru populațiile din clusterul albastru (Carpații Orientali) ($r = 0.490$, $P = 0.0001$), și mai mic, dar tot semnificativ, pentru clusterul roșu (Carpații Occidentali) ($r = 0.297$, $P = 0.005$). Din analiza formei peisajului genetic (Figura 3.5) a rezultat un model care este în mare măsură în concordanță cu analiza Neighbour-joining, populațiile din partea de sud-vest (Munții Banatului) prezentând o diferențiere slabă (de exemplu, graficul de suprafață al distanțelor genetice scade în acest grup), față de alte două regiuni cu o diferențiere pronunțată, una în partea de sud-est a distribuției (Carpații de Curbură) și alta în partea de nord-est (Carpații Orientali).

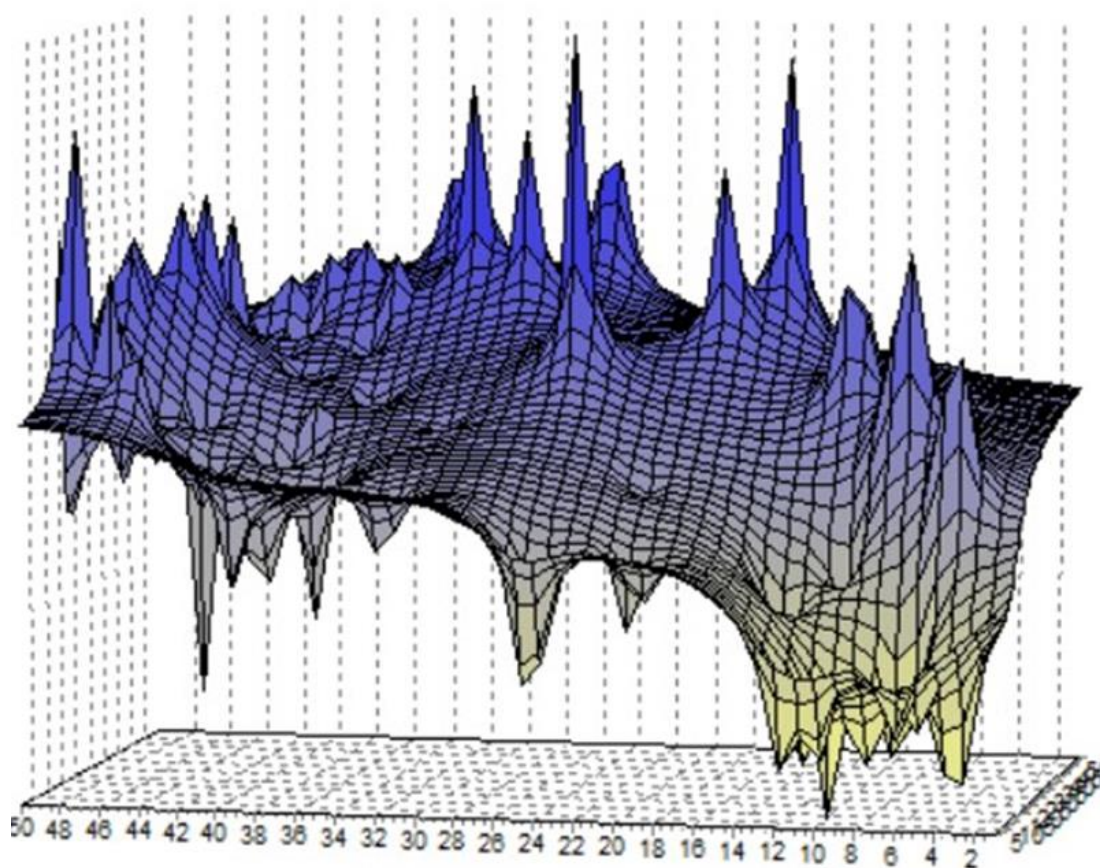


Figura 3.5. Diagrama formei genetice a peisajului pentru cele 36 de populații de brad analizate. Axele X și Y corespund coordonatelor geografice, iar axa Z corespunde distanțelor genetice dintre indivizi. Culmile albastre indică zonele cu distanțe genetice mari iar văile galbene indică zonele cu distanțe genetice mici între perechile de populații.

Rezultatele din analiza STRUCTURE și analiza Neighbor-Joining au arătat o diferențiere genetică clară între populațiile din nord-est și cele din sud (Figura 3.6). Pentru a detecta barierele genetice între aceste grupuri de populații, a fost utilizată analiza Barrier bazată pe distanțele genetice Nei (DA). Rezultatele au reliefat existența a două bariere majore. Prima și cea mai semnificativă barieră (probabilitate bootstrap de 100%) (Figura 3.6) a apărut între populațiile din sud-vest și cele din nord-est și coincide cu Podișul Transilvaniei. A doua barieră a separat populația FRU din interiorul Carpaților Orientali de toate celelalte, cu o susținere bootstrap de 100%, această barieră mergând mai departe (80% valoare bootstrap) și împărțind populațiile estice de cele din Carpații de Curbură.

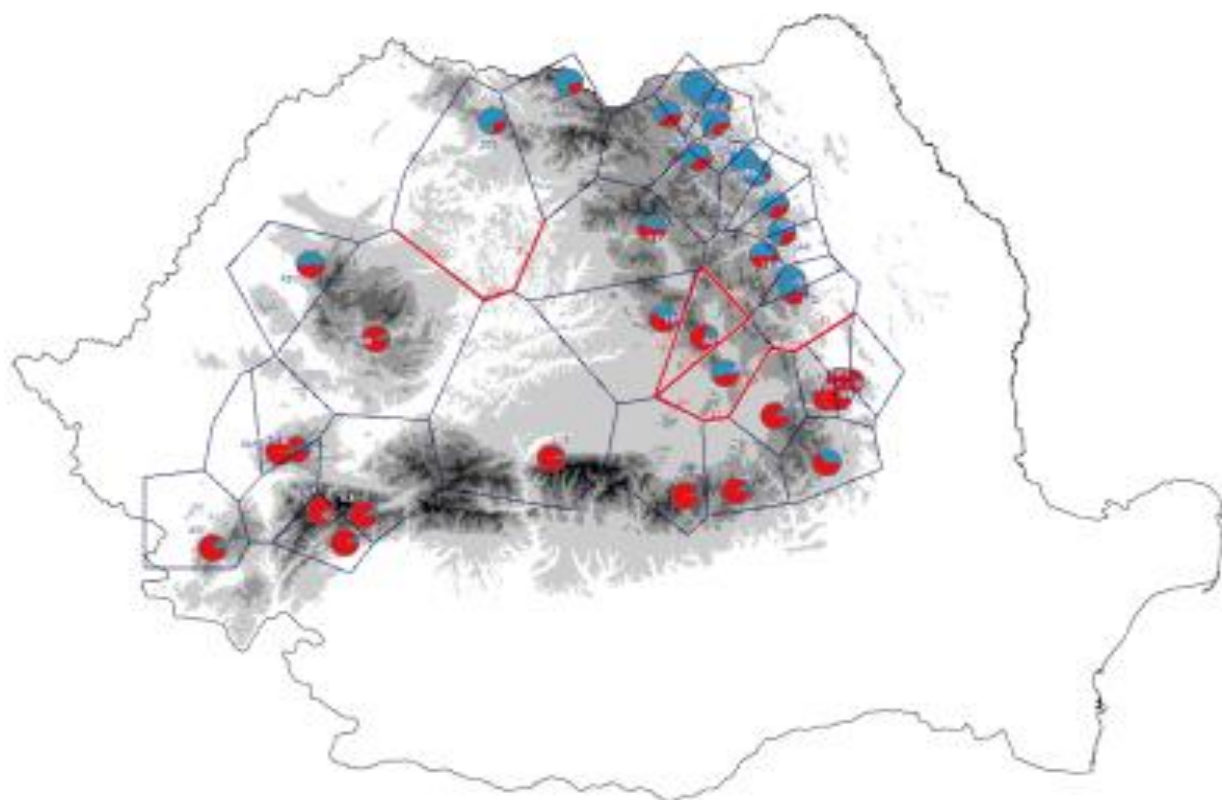


Figura 3.6. Distribuția structurii populațiilor estimate pentru $K = 2$ și barierele genetice detectate. Clusterele roșu și albastru indică gradul de apartenență la unul din grupurile genetice identificate prin analiza STRUCTURE. Liniile roșii indică principalele bariere detectate, cu un suport bootstrap de peste 80%.

Discuții

Diversitatea genetică a populațiilor

Acest studiu cu privire la variația genetică a bradului din Carpații României, zonă în care arealul se suprapune cu limita sud-estică a distribuției speciei, a reliefat o diversitate genetică ridicată și o diferențiere genetică scăzută, așa cum era de așteptat ca și în alte populații de conifere (Hampe și Petit, 2005). Deși au fost utilizate seturi diferite de

microsateliți, majoritatea populațiilor au arătat nivele mai ridicate de diversitate genetică comparativ cu cele raportate anterior pentru brad în populații din Europa (Cvrckova et al., 2015; Popovic et al., 2017; Piotti et al., 2017). Heterozigoția așteptată ($H_e = 0.810$) obținută în acest studiu a fost mai mare decât valorile raportate de Gömöry et al., (2012) pentru populațiile de brad din Carpați (0.680 pentru linia balcanică și respectiv 0.641 pentru linia central europeană). Un studiu recent al lui Belletti et al., (2017), care a inclus 45 de populații din Italia, a arătat faptul că populațiile au o heterozigoție așteptată medie de 0.724, în timp ce heterozigoția observată a fost 0.563. În ceea ce privește numărul de alele private, aceiași autori au identificat doar două populații din 45 care prezentau două alele private și 12 populații care prezentau o singură alelă privată.

Sancho-Knapik et al., (2014) au studiat structura genetică a zece populații de la marginea vestică a Pirineilor spanioli și le-au comparat cu două populații din Germania, constatând faptul că populațiile spaniole prezintă o diversitate genetică mai scăzută și o diferențiere genetică mai mare.

Pe baza indicelui de fixare (F_{ST}), diferențierea genetică observată în acest studiu este relativ scăzută, doar 1,4 % din variația genetică totală fiind datorată diferențelor dintre populații. Pentru Italia, Belletti et al., (2017) au constatat că aproximativ 8% din diversitatea genetică este între populații, dar acest lucru este explicat prin faptul că multe populații au rămas izolate pentru o perioadă lungă de timp, ceea ce nu este cazul pentru populațiile de brad din România. Pentru populațiile de brad din Cehia, valoarea F_{ST} a variat de la 0.015 la 0.036, similar cu valorile obținute în acest studiu (Cvrčková et al., 2015). Pentru 14 populații din România și una din Bulgaria, Postolache et al. (2016) au găsit o valoare medie pentru F_{ST} de 0.018. AMOVA a confirmat gradul scăzut de diferențiere între regiunile de proveniență și clusterelor genetice rezultate din analiza bayesiană, dar variația între populațiile din cadrul clusterelor (FSC) este aproape egală cu cea obținută de Gömöry et al., (2012), respectiv de 1,35% pentru cele două linii mitocondriale diferite.

Distribuția geografică a diversității genetice contrazice ipoteza central-periferică, conform căreia populațiile periferice ar trebui să aibă nivele mai scăzute de diversitate genetică în cadrul populațiilor (Lesica și Allendorf, 1995; Eckert et al., 2008; Duncan et al., 2015). Populațiile periferice studiate din partea de est păstrează cel mai înalt nivel de diversitate genetică, atât în ceea ce privește bogăția alelică, cât și heterozigoția așteptată. Totuși, există unele excepții în populațiile eșantionate din regiunea sud-estică (CAI, CAS, VID și SOV) și în alte câteva populații periferice (MAL, RAS și MOI), unde bogăția alelică este sub media generală. Identificarea acestor centre de diversitate la populațiile marginale din Carpații Orientali, sugerează că acestea posedă un potențial evolutiv ridicat. De fapt, unele dintre aceste populații (SOL, RAS, FRU), recunoscute ca edafotipuri (cu o adaptabilitate mare la soluri cu exces de umiditate), ar putea prezenta un grad ridicat de adaptabilitate într-un mediu specific, iar presiunea selecției ar putea genera o adaptare locală.

O scădere a diversității genetice de-a lungul Carpaților Meridionali (de la est la vest) coincide cu o fragmentare mai puternică a zonei de distribuție, ceea ce face ca aceste populații să fie mai susceptibile la pierderea diversității genetice. Cu două excepții (AVR și LUP), toate populațiile sudice prezintă un exces ușor de homozigoți, ceea ce sugerează o intensificare a încrucișărilor între indivizi înrudiți.

Genetica peisajului

Distribuția grupurilor genetice este legată de principalele regiuni bio-geografice descrise pentru Carpații României (Georgescu și Doniță, 1965) și corespunde în mare măsură modelului filogeografic identificat pentru plantele alpine (Ronikier, 2011; Hurdu et al., 2016).

Analiza formei peisajului genetic a evidențiat existența unei zone cu un grad ridicat de diferențiere genetică. A doua barieră identificată între grupurile genetice, mai complexă decât prima, se suprapune în mare măsură cu granița dintre Carpații de Curbură și Carpații Orientali. Această regiune, caracterizată prin altitudini mai joase, nu pare să creeze o barieră naturală pentru fluxul genetic; o posibilă explicație ar putea fi existența unor microrefugii în Carpații Orientali și Meridionali și un flux genetic limitat între aceste grupuri regionale.

Studiile realizate până în prezent (Konnert și Bergmann, 1995; Fady et al., 1999; Liepelt et al., 2009; Gömöry et al., 2004, 2012; Piotti et al., 2017) sugerează că structura genetică actuală a populațiilor de brad a fost influențată în principal de rutele de recolonizare postglaciară. Diferențierea genetică pare să fie influențată predominant de istoria migrației, în timp ce adaptările recente sau activitățile umane joacă un rol secundar (Konôpková et al., 2019). Se acceptă în general că refugiul balcanic, extins până în sudul Greciei, a reprezentat sursa principală pentru recolonizarea bradului în sud-estul Europei (Konnert și Bergmann, 1995; Terhürne-Berson et al., 2004). Bradul din această zonă aparține unei linii mitocondriale distincte (Ziegenhagen et al., 2005; Liepelt et al., 2009). La granița dintre România și Ucraina se formează o zonă de contact cu linia mitocondrială Nord-Apenină (Ziegenhagen et al., 2005; Liepelt et al., 2009), cu câteva populații care adăpostesc ambele linii mitocondriale (Gömöry et al., 2012). O diferențiere puternică a fost găsită între populațiile de brad din Bulgaria (sudul Balcanilor) și Carpații României (Konnert și Bergmann, 1995; Postolache et al., 2016), iar poziția geografică a refugiiilor occidentale conduce la ipoteza că probabil doar refugiu balcanic din nord-vest a determinat actualul bazin genetic al bradului din Carpați (Gömöry et al., 2012). Nu poate fi exclus faptul că un refugiu glaciatic diferit sau chiar existența unor micro refugii au contribuit la colonizarea bradului în estul Europei (Dobrowolska et al., 2017).

Dovezile palinologice indică faptul că bradul a apărut pentru prima dată în Munții Apuseni (Fărcaș et al. 2007; Feurdean și Willis, 2008), de unde a migrat spre nord și est în Carpați. Ceea ce este particular în cazul expansiunii bradului în România este rata scăzută de migrație postglaciară, distanța de doar 200 km între Munții Apuseni și Carpații Orientali fiind parcursă în aproximativ două milenii (Feurdean și Willis, 2008). Cel mai probabil au existat și

alți factori responsabili pentru expansiunea lentă spre est, cum ar fi competiția cu *Picea abies*, perturbațiile și, nu în ultimul rând, schimbările climatice.

Datele rezultate din analiza microsateliților nucleari au evidențiat amestecul a două fonduri genetice în Carpații Orientali, cu un fond genetic care crește și celălalt care scade de la nord-vest la sud-est (Gömöry et al., 2012).

Amprenta genetică a rutelor de migrație este foarte bine evidențiată de diferențele genetice observate între populațiile din Carpații Orientali și cele din Carpații Occidentali. Pe baza datelor microsateliților nucleari și a analizei bayesiene, au fost identificate două grupuri genetice în Carpații României: un grup omogen care corespunde părții sudice a ariei de distribuție și al doilea grup, mai eterogen, care include populațiile din nord-est. Astfel, populațiile din Carpații Orientali au un grad ridicat de amestec genetic, cel mai probabil datorat fluxului genetic prin polen intens din refugiul glaciatic vestic. Acesta a fost favorizat de orografia acestor munți (orientare NV-SE) și de direcția vântului (predominant dinspre nord). Modele similare ale structurii genetice de-a lungul Carpaților au fost observate și la alte specii de rășinoase. La *Picea abies*, Tollesfrud et al., (2008) au indicat existența unui refugiu glaciatic în Carpații Meridionali, ipoteză susținută și de dovezi paleontologice (Feurdean et al. 2007), iar la *Pinus sylvestris*, populațiile din Munții Apuseni sunt diferențiate față de populațiile din Carpații Orientali, barierele identificate sugerând existența unui refugiu glaciatic în această zonă (Toth et al., 2017). Recolonizarea Carpaților României s-a realizat cel mai probabil prin semințe din refugii balcanice (liniile mitocondriale balcanice), spre nord, până la granița cu Ucraina, formând o zonă de contact cu liniile mitocondriale Apenine. Fluxul prin polen dinspre nord ar fi condus la imaginea actuală a proporțiilor de amestec genetic în populațiile de brad din Carpații României, care scad de la nord la sud.

Implicații pentru managementul și conservarea speciei

Acest studiu sugerează existența a trei zone distincte de diversitate genetică în Carpații Orientali ai României: grupul din nord (STB, POI, DEM, PUT, MAR), grupul din est (BRA, GAR, MOI, TAZ) și populația sudică AVR. Deși diferențierea genetică este scăzută, structura genetică a populațiilor de brad nu este la fel de omogenă cum era de așteptat (mai ales în Carpații Orientali), prin urmare, orice strategie de management și conservare - inclusiv conservarea ex-situ, programele de ameliorare, translocarea și programele de ameliorare - trebuie să țină cont de această particularitate a grupurilor genetice identificate. Datorită diversității genetice relativ scăzute identificate în populațiile din Munții Banatului (ANI), acestea ar putea fi vulnerabile la schimbările climatice.

Cercetările arată că diversitatea condițiilor climatice, edafice și topografice pot influența diferențierea populațiilor la scară regională și, deși regiunile de proveniență sunt bine reprezentate în România, iar sursele existente de semințe de brad sunt mai mult decât suficiente (aproape 4000 ha de surse de semințe selectate) (Pârnuță et al., 2012), particularitățile ecologice ale zonei în care se va utiliza materialul forestier de reproducere nu

sunt întotdeauna luate în considerare. Așa cum s-a menționat anterior, ecotipurile edafice ar putea prezenta anumite caracteristici genetice valoroase, care pot fi analizate mai detaliat pe baza markerilor adaptativi.

Concluzii

Structura genetică a populațiilor periferice estice sugerează o zonă de introgresiune, cu un grad de amestec care scade treptat de la nord-vest către sud-est în Carpații României, iar topografia terenului și condițiile climatice regionale au un rol semnificativ în acest proces. În contextul schimbărilor climatice preconizate, populațiile de brad de la limita estică a arealului său de distribuție au un potențial ridicat de a atenua efectele negative ale acestora, reprezentând totodată resurse genetice valoroase.

Deși au fost identificate diferite valori ale diversității genetice, iar diferențierea genetică a fost redusă, modelul de distribuție a variației genetice la nivel local, regional și național ar putea și ar trebui să fie luat în considerare pentru gestionarea adecvată a resurselor genetice forestiere și dezvoltarea unei strategii pentru conservarea fondurilor genetice valoroase.

Capitolul 4. Diversitatea și structura genetică spațială în populații naturale de pin silvestru (*Pinus sylvestris* L.)

4.1. Diversitatea genetică a pinului silvestru la nivel nuclear

Introducere

Populațiile relictice de arbori din păduri, adică acele populații care sunt în prezent limitate la un teritoriu mic, dar al căror areal originar de distribuție era mult mai mare în trecut, pot contribui substanțial la diversitatea genetică a unei specii (Habel și Assmann, 2010). Populațiile izolate geografic, situate la marginea arealului de distribuție al unei specii, pot găzdui variante genetice rare și unice care ar putea fi importante pentru supraviețuirea speciei în condiții de mediu în schimbare (Fady et al., 2016; Hampe și Petit, 2005). Diversitatea genetică a populațiilor marginale din punct de vedere geografic, care sunt de obicei mici și izolate, poate fi redusă din cauza acțiunii derivei genetice, a creșterii consangvinizării, a fluxului genetic limitat sau inexistent din alte populații și a selecției naturale după perioade îndelungate de supraviețuire în noi condiții ecologice (Alberto et al., 2013; Eckert et al., 2008).

Structura genetică spațială (SGS) din cadrul populațiilor naturale de arbori derivă dintr-o serie de procese genetice și demografice care interacționează și care pot fi dificil de separat (De-Lucas et al., 2009; Epperson, 1992; Piotti et al., 2013). Dispersia limitată a genelor prin polen și semințe este cauza predominantă a apariției SGS la o scară spațială fină sau la nivel de arboret. De exemplu, o structură genetică spațială mai puternică este așteptată la speciile de arbori cu dispersie prin gravitație decât la cele cu dispersie prin vânt (Vekemans și Hardy, 2004). Speciile de arbori polenizate și dispersate de vânt (de exemplu, *Pinus halepensis*) prezintă de obicei o structură genetică spațială slabă (Budde et al., 2017). Teoria izolării prin distanță poate prezice modele de structuri genetice spațiale la echilibrul dintre derivă și dispersie (Morton, 2013). Alți factori, precum stadiul de dezvoltare sau vârsta, densitatea populației, configurația spațială a populației și perturbațiile naturale, pot influența structurile genetice spațiale (Budde et al., 2017; Vekemans și Hardy, 2004). Variația substanțială între populațiile din cadrul unei specii evidențiază importanța factorilor de mediu locali în modelarea structurii genetice spațiale la scară fină în cazul a patru specii de conifere alpine (Mosca et al., 2018). Existența unei structuri genetice spațiale semnificative în cadrul populațiilor de arbori forestieri poate susține ipoteza originii naturale a arboretelor (Curtu et al., 2015). În plus, practicile de gestionare a pădurilor par să fi modificat structurile genetice spațiale, atunci când se compară arboretele mature gestionate cu cele negestionate, în cazul pinului silvestru (González-Díaz et al., 2017).

Pinul silvestru (*Pinus sylvestris* L.) este cea mai răspândită specie de conifere din Eurasia, prezintă un areal de distribuție care se întinde din Europa de Vest până în părțile

estice ale Siberiei. Are o importanță ecologică și economică deosebită și este adaptat la o varietate de soluri și condiții climatice (Naydenov et al., 2007; Sebastiani et al., 2013). Pinul silvestru este o specie monoică, polenizată de vânt, pionieră și iubitoare de lumină (Curt și Prévosto, 2003; Egnell, 2016; Mátyás et al., 2004; Picon-Cochard et al., 2006). Distribuția actuală este rezultatul unor procese de recolonizare postglaciară și al restrângerii arealului natural în timpul glaciațiunilor (Hebda et al., 2017; Tóth et al., 2017). Deși pinul silvestru a ocupat suprafețe mai mari în timpul ultimei glaciațiuni (Prus-Głowacki et al., 2012; Tanțău et al., 2011), în prezent acesta are o distribuție fragmentată în Munții Carpați (San-Miguel-Ayanz et al., 2016). În Holocen, pinul silvestru a arătat reziliență față de variabilitatea climatică, dar o capacitate scăzută de competiție comparativ cu alte specii de arbori (Feurdean et al., 2011). Ca urmare a extinderii suprafeței altor specii de arbori, aria naturală de distribuție a pinului silvestru în România a fost semnificativ redusă, fiind estimată în prezent la aproximativ 9000 ha (Șofletea și Curtu, 2007). La nivelul Munților Carpați, se pot distinge trei ecotipuri de pin silvestru în funcție de caracteristicile habitatului: (1) ecotip de soluri scheletice, inclusiv pe stâncării, (2) ecotip pe soluri acide, sărace în baze de schimb și (3) ecotip de turbărie (Șofletea și Curtu, 2007).

Studiile de genetică moleculară indică niveluri relativ ridicate de diversitate genetică în populațiile de pin silvestru din Carpații Occidentali și Orientali (Bernhardsson et al., 2016; Tóth et al., 2017). Reducerea și fragmentarea postglaciară a arealului natural a pinului silvestru, confirmate prin înregistrări palinologice (Feurdean et al., 2007), nu par să fi afectat amploarea diversității genetice la această specie. Studiile anterioare care au eșantionat populații de pin silvestru din România au analizat populații naturale împreună cu plantații realizate cu material forestier de reproducere de origine necunoscută (Bernhardsson et al., 2016) sau doar populații naturale situate în interiorul arcului carpatic, cu un accent puternic pe Carpații Orientali și Munții Apuseni (Tóth et al., 2017). În plus, dimensiunea eșantionului per populație a fost relativ mică (8–30, în general 20 de indivizi/populație), iar distribuția spațială a arborilor individuali în cadrul populațiilor nu a fost corelată cu diversitatea genetică.

Obiectivele acestui studiu au fost: (1) analiza nivelului și distribuției diversității genetice la nivel nuclear în populațiile naturale de pin silvestru situate în Carpații Orientali și Meridionali și (2) evaluarea structurii genetice spațiale (SGS) în cadrul populațiilor relictice care cresc în habitate diferite, de la stâncării la turbării.

Materiale și metode

Populațiile studiate

Pentru analizele genetice au fost eșantionate opt populații naturale de pin silvestru din România (Tabelul 4.1 și Figura 4.1a). Spre deosebire de studiile anterioare (Bernhardsson et al., 2016; Tóth et al., 2017), au fost incluse mai multe populații situate în Carpații Orientali

și Meridionali. Materialul vegetal (ace de pin de un an) a fost colectat din 96 de arbori adulți pentru fiecare populație și păstrat la -60°C până la extracția ADN-ului.

Schema de eșantionare a depins în mare măsură de configurația terenului. Ori de câte ori a fost posibil, eșantionarea s-a realizat de-a lungul a două transecte dispuse în formă de cruce (două linii perpendiculare). În cazurile în care nu au fost găsiți suficienți indivizi pentru a fi eșantionați într-un singur loc, au fost eșantionate două sau mai multe subpopulații (Retezat (S-RE) și Valea Sebeșului (S-VS)).

Distanța dintre arborii eșantionați a fost de cel puțin 15–20 m pentru a minimiza posibilitatea de a preleva probe de la indivizi înrudiți. Populațiile eșantionate au fost situate în trei tipuri de condiții de habitat:

- pe soluri scheletice, inclusiv pe stâncării (populațiile S-RE, S-VS, S-LO și E-CB);
- pe soluri acide și oligobazice fără rocă în orizonturile superioare (populațiile E-TU și E-BI);
- în turbării (populațiile E-FB și E-PS).

Tabelul 4.1 Populațiile de pin silvestru eșantionate, localizate în Carpații Meridionali (S-RE, S-VS, S-LO) și Orientali (E-CB, E-TU, E-BI, E-FB, E-PS), asociate cu trei tipuri de habitat: stâncării (R), soluri acide și oligobazice fără rocă în orizonturile superioare (OA) și turbării (PB).

Nr.	Populație	Acronim	Ecotip	Nr. arbori eșantionați	Localizare geografică		
					Latitudine	Longitudine	Altitudine (m)
1.	Retezat	S-RE	R	96	$45^{\circ}26'$ $45^{\circ}24'$	$22^{\circ}46'$ $22^{\circ}46'$	680-750 890-925
2.	Valea Sebeșului	S-VS	R	96	$45^{\circ}42'$ $45^{\circ}42'$	$23^{\circ}36'$ $23^{\circ}35'$	750-1070 730-780
3.	Lotrișor	S-LO	R	96	$45^{\circ}18'$	$24^{\circ}16'$	340-510
4.	Cheile Bicazului	E-CB	R	96	$46^{\circ}49'$	$25^{\circ}49'$	1060-1110
5.	Tulnici	E-TU	OA	96	$45^{\circ}55'$	$26^{\circ}36'$	580-610
6	Bisoca	E-BI	OA	96	$45^{\circ}33'$	$26^{\circ}40'$	930-950
7.	Fântâna Brazilor	E-FB	PB	96	$46^{\circ}30'$	$25^{\circ}15'$	950-960
8.	Poiana Stampei	E-PS	PB	96	$47^{\circ}18'$	$25^{\circ}07'$	920

Extragerea ADN - ului, amplificarea și analiza fragmentelor de ADN

ADN-ul a fost extras din 20–25 mg de material vegetal utilizând metoda CTAB (cetil trimetilamoniu bromid) (Doyle și Doyle, 1987). Inițial, au fost utilizați 10 microsateliți nucleari (SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 11.6, SPAC 11.8, SPAC 12.5 (Soranzo et al., 1998), psyl16, psyl17, psyl42, psyl44 și psyl57 (Sebastiani et al., 2013)). Aceștia au fost grupați în două multiplexe de analiză pentru reacția PCR: multiplex A—psyl16, psyl17, psyl42, psyl44 și psyl57; multiplex B—SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 11.6, SPAC 11.8 și SPAC 12.5.

Reacția PCR a fost realizată într-un volum total de 15 μ L (primul multiplex) - 7,2 μ L de Qiagen Multiplex PCR Master Mix 2 $\times$, 5,36 μ L de amestec de primeri, 0,34 μ L de Qsolution, 0,6 μ L de apă ultrapură și 1,5 μ L de ADN sau 10 μ L (al doilea multiplex) - 2 μ L de soluție tampon 5 $\times$ (Promega), 1 μ L de MgCl₂, 1,5 μ L de dNTP (deoxiribonucleotid trifosfat, Promega), 3 μ L de amestec de primeri, 0,1 μ L de enzimă Taq polimerază, 0,9 μ L de apă ultrapură și 2 μ L de ADN.

Programul PCR a constat în 15 minute de denaturare inițială la 95 °C, urmate de 30 de cicluri de 1 minut de denaturare la 94 °C, o etapă de legare a primerilor de 30 de secunde la 47 °C (pentru multiplex A) sau 55 °C (pentru multiplex B), o etapă sintetizare a noilor catene de 1 minut la 72 °C și o etapă finală de sintetizare de 20 minute la 60 °C. Produsele PCR amplificate au fost diluate și apoi analizate pe un analizor genetic GenomeLab GeXP, utilizând metoda Frag-3 și o scară de analiză Size Standard 400 (Backmann Coulter).

Analiza datelor genetice

Pentru identificarea unor alele nule sau a unor posibile erori de citire rezultate din pierderea alelelor mari și prezența benzilor de tip *stutter* microsateliții au fost analizați cu ajutorul programului Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2006). Software-ul a indicat prezența alelelor nule cu frecvențe ridicate pentru doi microsateliți (SPAC 11.4 și SPAC 11.6), care au fost excluși din analizele ulterioare. Nu s-au găsit dovezi ale pierderii alelelor mari sau ale evaluării incorecte a benzilor de tip *stutter* în populații.

Parametrii diversității genetice intra - populaționali (numărul de alele (N_a), numărul efectiv de alele (N_e), heterozigoția așteptată (H_e), heterozigoția observată (H_o), coeficientul de consangvinizare (F_{IS}) și numărul de alele private (P_a)) au fost calculați pentru fiecare populație utilizând programul GenAlEx v.6.5 (Peakall și Smouse, 2006, 2012). Pentru a testa diferențele statistice între ecotipuri, a fost efectuată o analiză ANOVA unidirecțională utilizând software-ul STATISTICA v.10 (Weiß, 2007).

Pentru determinarea structurii genetice a populației, a fost utilizată metoda de grupare bayesiană implementată în software-ul Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Simulările au fost realizate pentru 100.000 de pași, după o perioadă de burn-in de 50.000 de pași, luând în considerare valori ale k (numărul de clustere) de la 1 la 8, cu 10 replicări pentru fiecare valoare a lui k . Analiza a fost realizată folosind un model de amestec (*admixture*), frecvențe alelelor corelate și fără informații privind locația arborilor eșantionați. Cel mai

probabil număr de clustere a fost evaluat pe baza valorii logaritmice ($\ln \Pr(X|k)$) și a metodei Δk (Evanno et al., 2005), folosind software-ul STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 (Earl și vonHoldt, 2012)."

Indicele F_{ST} pe perechi între toate populațiile și analiza moleculară a varianței (AMOVA) au fost calculate cu ajutorul software-ului ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier și Lischer, 2010) folosind 1000 de permutări. Software-ul BOTTLENECK v.1.2.02 (Piry et al., 1999) a fost utilizat pentru a testa efectele recente de tip *bottleneck*, pe baza modelului de mutație (SMM) și a modelului (TPM). Semnificația statistică a fost determinată cu ajutorul testelor de semnificație implementate în acest program pentru 1000 de iterații.

Pentru a explora existența și localizarea barierelor de flux genetic, a fost utilizat software-ul BARRIER v.2.2 (Manni et al., 2004). Software-ul are la bază algoritmul de diferență maximă Monmonier (Monmonier, 1973). Distanțele genetice Nei (DA) au fost calculate în software-ul MSA (Dieringer și Schlötterer, 2003) pentru 100 de replicări bootstrap ale matricei de distanță.

Structura genetică spațială (SGS)

Pentru a evalua structurile genetice spațiale în cadrul populațiilor, a fost realizată o analiză de autocorelare spațială utilizând metoda multivariată (Smouse și Peakall, 1999), implementată în software-ul GenAlEx v.6.5 (Peakall și Smouse, 2006, 2012). Distanțele geografice între indivizi din fiecare populație au fost calculate pe baza latitudinii și longitudinii înregistrate la colectarea probelor cu un GPS Garmin 62s pentru fiecare arbore (cu excepția populației E-CB). Intervalul de similitudine genetică așteptată sub asociere aleatorie a fost estimat folosind 999 permutări aleatorii; intervalele de încredere de 95% pentru fiecare valoare a lui r au fost estimate folosind 999 de iterații. Valorile r au fost reprezentate grafic folosind opțiunea de clase de distanță egale, iar cele cinci clase au fost stabilite pentru distanțe de 25 m. A fost calculat parametrul $S_p = -bF/(1-F_1)$, în care F_1 este coeficientul mediu de înrudire Nason (Loiselle et al., 1995) între toate perechile de indivizi din prima clasă de distanțe (0-25 m), iar bF (b -log) este panta regresiei coeficientului de înrudire față de logaritmul distanței (Vekemans și Hardy, 2004). Testarea semnificației a pantei de regresie a fost realizată pentru 10.000 de permutări. Semnificația statistică a acestora a fost realizată cu ajutorul testului t folosind software-ul STATISTICA v.10.

Rezultate

Diversitatea genetică

Cei opt loci nSSR au prezentat un nivel ridicat de polimorfism în toate populațiile de pin silvestru analizate (Tabelul 4.2), cu un număr mediu de alele per locus (N_a) care variază de la 8.750 (E-FB) la 11.750 (S-LO). Numărul efectiv de alele (N_e) a avut cele mai mici valori în cele două turbării (E-PS și E-FB). De asemenea, valoarea medie a heterozigoției așteptate

($H_e = 0.645$) în populațiile din turbării a fost semnificativ mai mică ($p = 0.045$) comparativ cu celelalte populații de pin silvestru. Cea mai mare valoare a heterozigoției așteptate ($H_e = 0.733$) a fost înregistrată într-o populație din Carpații Meridionali, care crește pe stâncării (populația S-VS). S-a constatat un exces de homozigoți în toate populațiile (valoarea medie a coeficientului de consangvinizare fiind 0.122), cu o excepție, populația de turbărie E-FB, unde s-a observat un ușor exces de heterozigoți ($F_{IS} = -0.046$). Totuși, valorile F_{IS} au fost semnificativ diferite de zero doar în două populații (Tabelul 4.2).

Majoritatea alelelor private (16 din 18 alele) au fost observate în patru populații din categoria ecotipului de stâncărie. Trei dintre aceste patru populații sunt din Carpații Meridionali (Figura 4.1).

Tabelul 4. 2. Parametrii diversității genetice în populațiile de pin silvestru analizate

Populație	Ecotip		Na	Ne	He	F _{IS}	Pa
S-RE	R	Medie	9,750	4,553	0,724	0,162	3
		SE	0,977	0,698	0,062	0,104	
S-VS	R	Medie	10,500	5,165	0,733	0,049	4
		SE	2,062	1,114	0,057	0,090	
S-LO	R	Medie	11,750	6,226	0,731	0,168*	4
		SE	2,289	1,590	0,078	0,061	
E-CB	R	Medie	10,750	5,222	0,672	0,154	5
		SE	2,250	1,468	0,087	0,088	
E-TU	OA	Medie	10,375	5,290	0,710	0,164	0
		SE	1,936	1,136	0,088	0,080	
E-BI	OA	Medie	10,250	5,246	0,711	0,138	0
		SE	1,980	1,096	0,088	0,083	
E-FB	PB	Medie	8,750	3,488	0,658	-0,046	2
		SE	1,934	0,463	0,065	0,073	
E-PS	PB	Medie	9,375	4,214	0,635	0,187*	0
		SE	2,299	1,093	0,094	0,066	
Total		Medie	10,188	4,925	0,697	0,122	18
		SE	0,677	0,391	0,027	0,029	

Abrevieri: Na—numărul de alele; Ne—numărul efectiv de alele; He—heterozigoția așteptată; F_{IS} —coeficientul de consangvinizare; Pa—numărul de alele private; SE—eroarea standard

* Valorile F_{IS} semnificative ($p < 0,05$) sunt indicate printr-un asterisc

Analiza moleculară a varianței (AMOVA) a arătat faptul că variația din cadrul populațiilor a reprezentat cea mai mare parte din varianța totală (Tabelul 4.3). Diferențierea

genetică între populații, măsurată prin valoarea indicelui F_{ST} , a fost de 0.047. Analizele privind efectul de "gât de sticlă" nu au arătat existența unor blocaje genetice recente în populațiile de pin silvestru studiate.

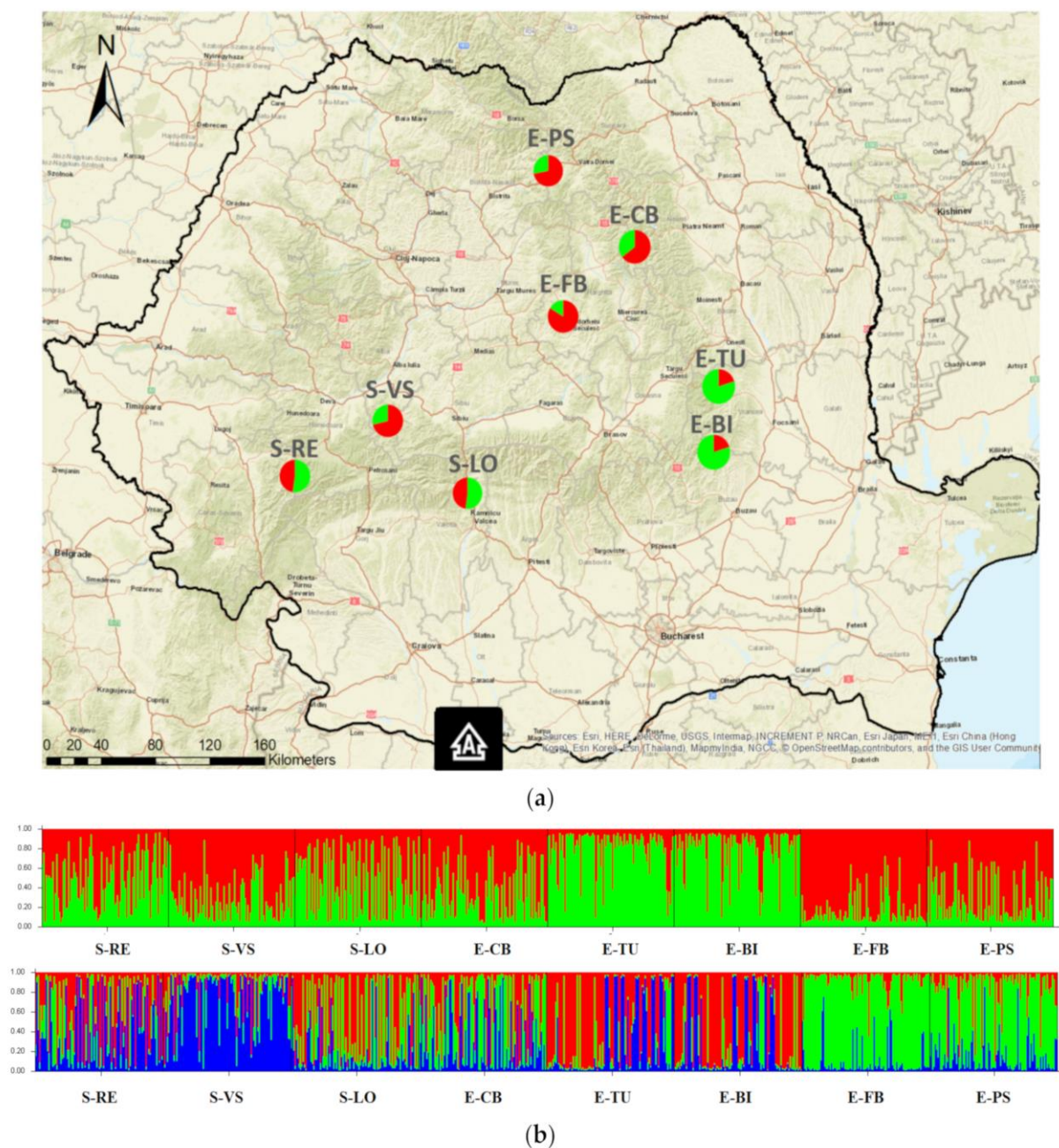


Figura 4.1. Structura genetică și distribuția geografică a celor opt populații naturale de pin silvestru: (a) Localizarea geografică a fiecărei populații eșantionate și gruparea acestora, codificată prin culori. Acronimele reprezintă codurile populațiilor din Tabelul 4.1.(b) Structura genetică estimată pentru două scenarii: $k = 2$ (partea superioară): gruparea populațiilor în două clustere genetice majore; $k = 3$: distribuția indivizilor între trei clustere genetice. Aceasta reprezintă o vizualizare a modului în care populațiile eșantionate sunt grupate pe baza similarităților genetice, subliniind influențele geografice și genetice.

Tabelul 4.3. Analiza moleculară a varianței (AMOVA)

Sursa variației	Grade de libertate	Suma pătratelor	Pătrate medii	Variația estimată	Procent variație
Între populații	7	385,255	55,036	0,495	6%
În interiorul populațiilor	760	5711,833	7,516	7,516	94%
Total	767	6097,089		8,011	100%

Structura genetică a populațiilor

O structură genetică pentru existența a două grupuri distincte a avut cel mai puternic suport statistic pentru populațiile analizate (Figura 4.1b și Figura 4.2). Cea mai mare valoare a parametrului Δk (19.90) a fost obținută pentru $k = 2$ (Figura 4.2). Două populații de pin silvestru din partea exterioară a arcului Carpaților Orientali (E-BI și E-TU) au arătat cele mai mari valori de apartenență la unul din cele două clusteruri genetice (în culoarea verde în Figura 4.1). Spre deosebire de acestea, cele două populații de turbărie (E-FB și E-PS) și o populație din Carpații Meridionali, situată pe versanți stâncoși (S-VS), au arătat o apartenență mai mare la al doilea cluster genetic (în culoarea roșie în Figura 4.1).

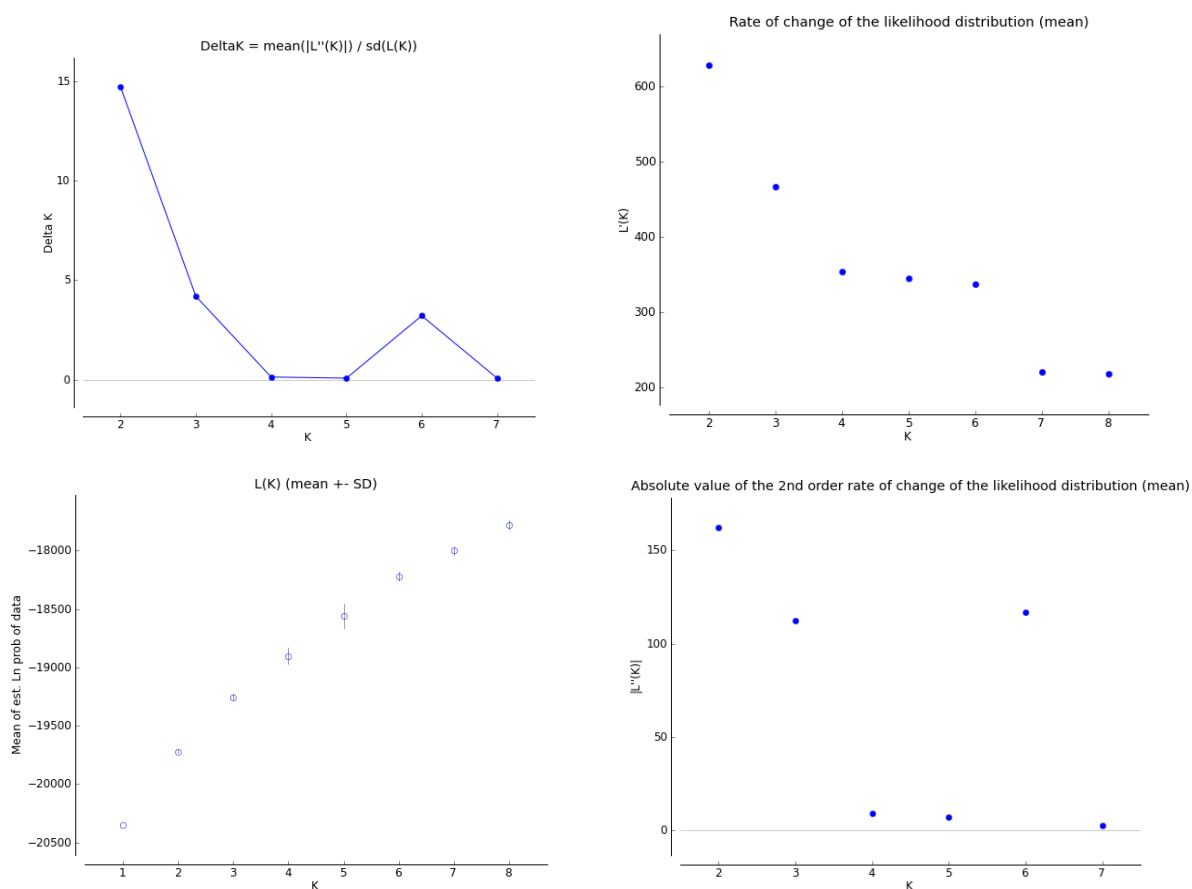


Figura 4.2. Estimarea structurii populației utilizând ΔK derivat din $\ln P(D)$ pentru a determina numărul optim de subpopulații. Valoarea maximă a ΔK a fost găsită la $K = 2$

Totuși, atunci când s-au luat în considerare posibila existență a trei clustere genetice ($k = 3$), cele două populații de turbărie din Carpații Orientali s-au separat de populațiile din Carpații Meridionali (Figura 4.1b).

Analiza de identificare a barierelor genetice existente la nivelul populațiilor analizate a identificat existența a 3 posibile bariere pentru fluxul de gene. O primă barieră, cu un suport bootstrap puternic (61–79%) (Figura 4.3), care delimitează un grup de patru populații din Carpații Orientali (E-PS, E-CB, E-TU și E-BI). O a doua barieră, dar mai slabă (suport bootstrap de 26%), a separat două populații dinspre exteriorul arcului Carpații Orientali (E-TU și E-BI). O a treia barieră, foarte slabă (suport bootstrap de 12%), a fost detectată între două populații din Carpații Meridionali (S-RE și S-LO).

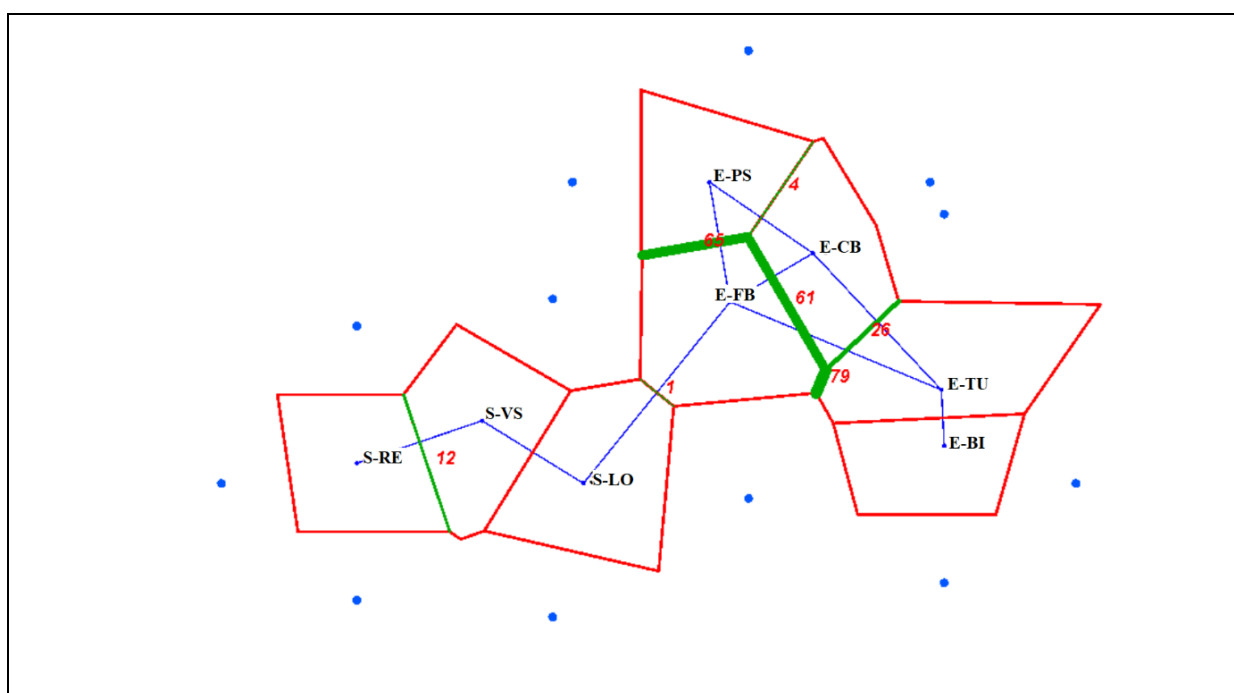


Figura 4.3. Identificarea barierelor genetice preconizate între cele opt populații de *Pinus sylvestris* pe baza matricei de distanțe genetice Nei, conform predicțiilor realizate de software-ul BARRIER 2.2 (barierele genetice sunt reprezentate prin linii verzi îngroșate, împreună cu valorile bootstrap),

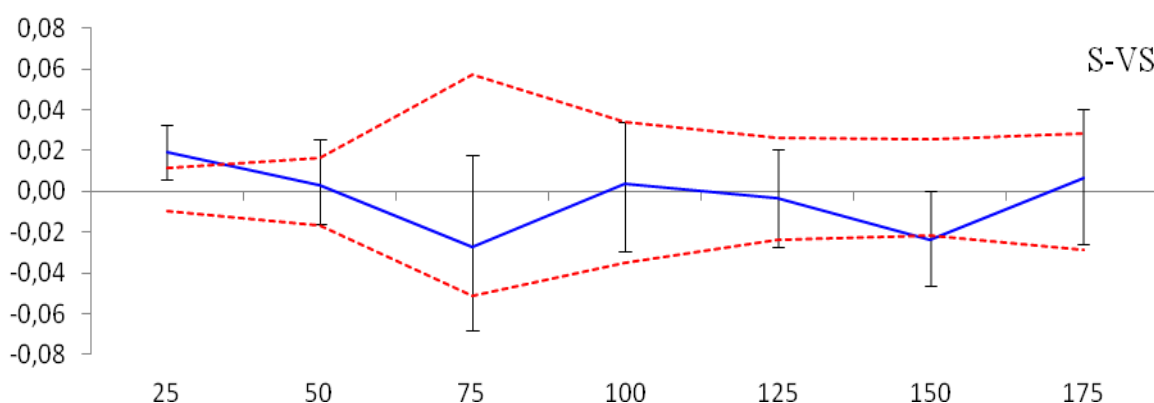
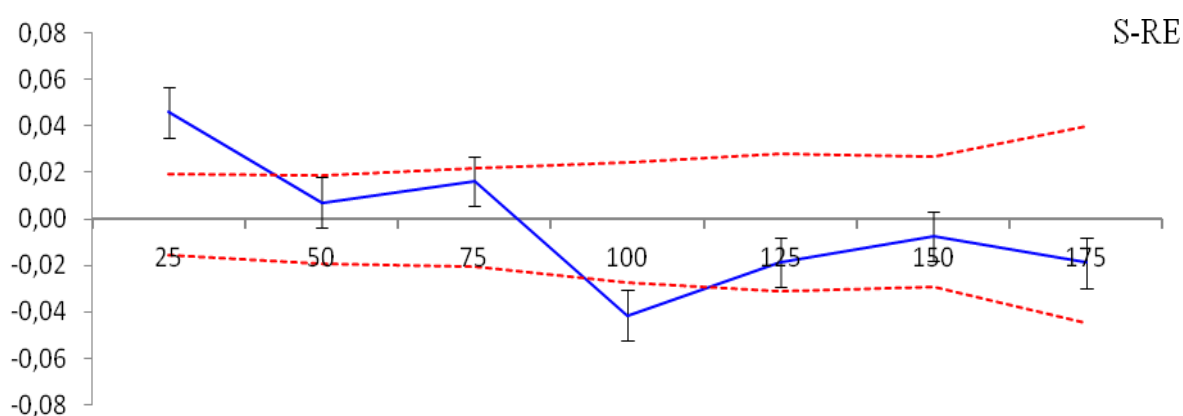
Structura genetică spațială

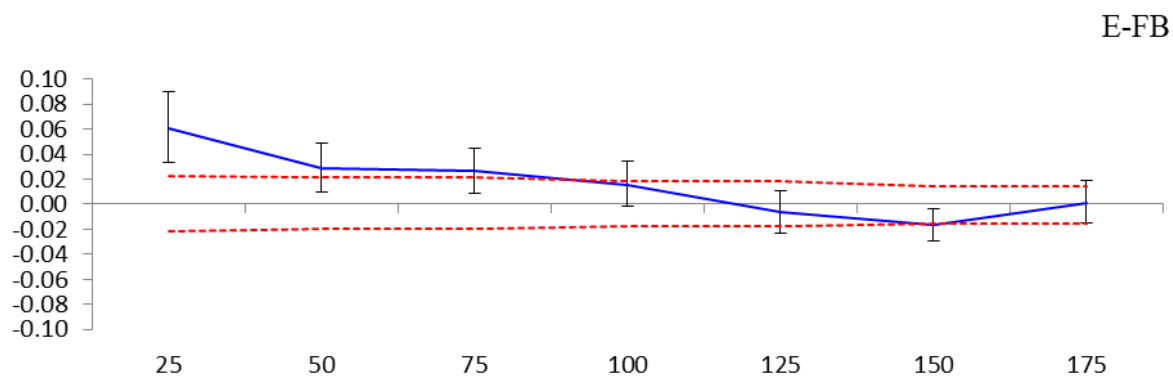
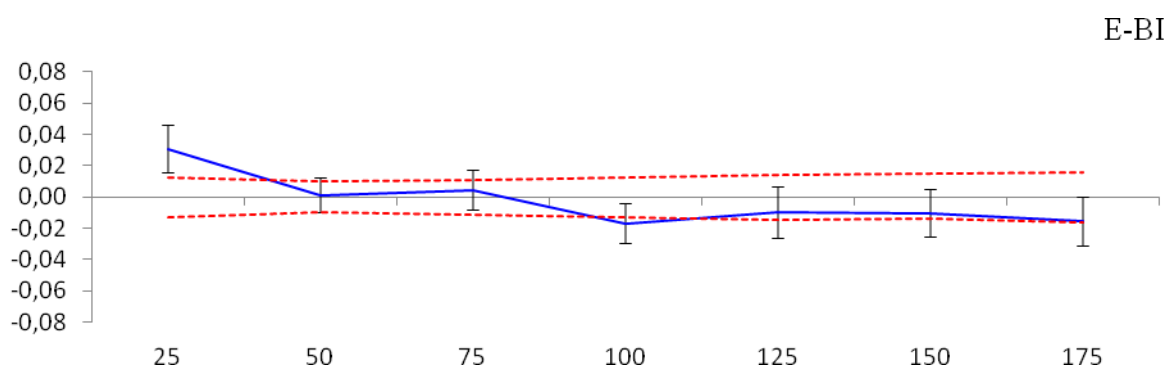
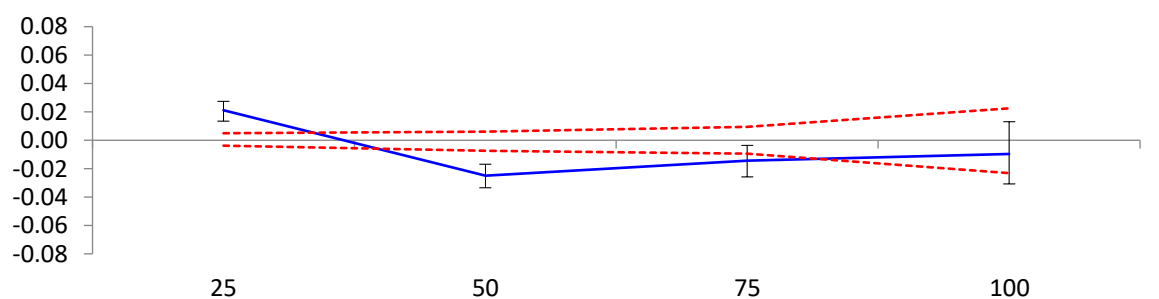
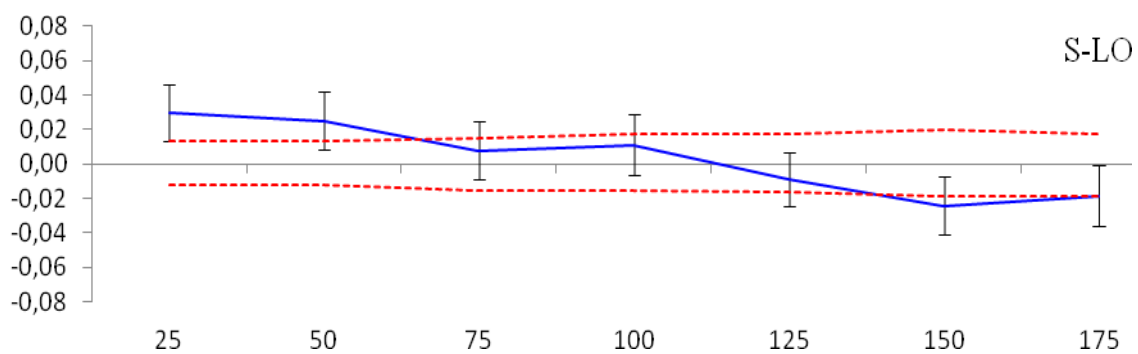
S-a constatat o distribuție spațială nerepartizată aleatoriu a genotipurilor în cadrul populațiilor de pin silvestru în șase din cele șapte populații analizate (Figura 4.4). Valorile coeficientului de corelație r au fost pozitive și semnificative în prima clasă de distanță (0–25 m) pentru șase populații. În două populații (S-VS și E-FB), coeficientul de corelație a înregistrat valori semnificative, pozitive pentru primele două clase de distanță (până la 50 m). Distribuția spațială a genotipurilor de pin silvestru a fost considerată aleatorie doar în cazul unei singure populații de turbărie (E-PS), populație în care valorile pentru testarea eterogenității au fost cele mai mici (Tabelul 4.4).

Tabelul 4.4. Teste de eterogenitate ale SGS între corelograme utilizând GenAlEx (Peakall și Smouse 2012). Valorile raportate reprezintă gradul de diferențiere al SGS între două populații pentru testul de clasă multidistanță (ω).

p value ω test	S-RE	S-VS	S-LO	E-TU	E-BI	E-FB	E-PS
S-RE	0,0000	0,0750	0,0410	0,0010*	0,0420	0,0380	0,0010*
S-VS	22,3627	0,0000	0,5950	0,5720	0,9590	0,1400	0,4000
S-LO	23,9191	12,2278	0,0000	0,0040*	0,3370	0,4200	0,0330
E-TU	38,7773	12,5358	31,7010	0,0000	0,0510	0,0010*	0,0070*
E-BI	23,9395	6,1560	15,4419	23,0990	0,0000	0,0650	0,0600
E-FB	24,7554	19,7277	14,4497	40,9595	22,6176	0,0000	0,0110
E-PS	33,9428	14,8738	25,2612	30,2043	22,6546	30,9057	0,0000

* $p < 0.01$ – diferența între corelograme este semnificativă





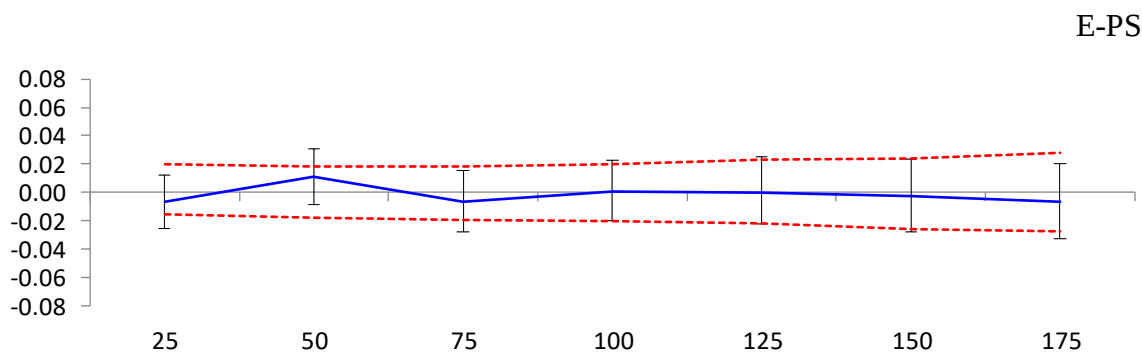


Figura 4.4. Corelograme spațial-genetice multilocus pe baza distanțelor genetice și geografice din 7 populații de pin silvestru. Pe axa y este reprezentat coeficientul de corelație genetică (r), iar pe axa x este indicată clasa de distanță (m); intervalele de încredere (95%) au fost calculate utilizând teste de permutare și reprezentate cu linii roșii, iar intervalele de încredere de 95% în jurul valorii r generate prin *bootstrapping* sunt reprezentate cu linii negre.

Valoarea indicelui Sp a variat considerabil, de la 0.0011 în populația E-PS până la 0.0201 în populația E-TU, cu o valoare medie de 0.0100. Valoarea lui bF a fost semnificativ diferită de zero în toate populațiile (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Parametri care descriu structura genetică spațială (F_1 —media coeficientului de înrudire între indivizii din prima clasă de distanță (0–25 m); bF ($b\text{-log}$)—panta regresiei coeficientului de înrudire F_{ij} ; Sp —intensitatea structurii genetice spațiale; ($\pm SE$)—eroarea standard; (95% CI)—intervale de încredere 95%; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Populația	F_1	b_F ($b\text{-log}$) ($\pm SE$)	$Sp = -b_F / (1 - F_1)$ (95% CI)
S-RE	0.0137*	-0.0036 $\pm$ 0,0041***	0.0036 (0,0004-0,0081)
S-VS	0.0875	-0.0046 $\pm$ 0,0041***	0.0049 (0,0021-0,0087)
S-LO	0.0187**	-0.0071 $\pm$ 0,0047***	0.0072 (0,0026-0,0168)
E-TU	0.0277*	-0.0201 $\pm$ 0,0493**	0.0207 (0,0021-0,0239)
E-BI	0.0227*	-0.0136 $\pm$ 0,0102**	0.0139 (0,0031-0,0356)
E-FB	0.0446**	-0.0175 $\pm$ 0,0102**	0.0183 (0,0036-0,0303)
E-PS	-0.0007	-0.0011 $\pm$ 0.0052***	0.0011 (-0,0033-0,0131)

Discuții

A fost observat un nivel relativ ridicat al diversității genetice ($H_e = 0,697$) în populațiile relictice de pin silvestru (*Pinus sylvestris*) din Carpații Orientali și Meridionali. O valoare similară a heterozigoției așteptate ($H_e = 0,681$) a fost obținută pentru o populație de pin silvestru din Scandinavia (Ganea et al., 2015), iar o diversitate genetică mai mare a fost observată în populații din Europa Centrală ($H_e = 0,859$), Italia ($H_e = 0,810-0,847$) și Peninsula Iberică (0,810), pe baza markerilor nSSR (Belletti et al., 2012; Nowakowska et al., 2014; Pavia et al., 2014; Scalfi et al., 2009). Valori ușor mai mici au fost raportate pentru pinul silvestru în studiile anterioare efectuate în populații din România, incluzând atât populații naturale, cât și plantații cu material forestier de reproducere de origine necunoscută (Bernhardsson et al., 2016), sau doar populații naturale din Carpații Orientali și Munții Apuseni, cu excepția unei populații situate în Carpații Meridionali (Tóth et al., 2017). Totuși, aceste diferențe trebuie tratate cu prudență, având în vedere că au fost utilizați markeri nSSR diferiți pentru fiecare studiu. De exemplu, markerii genetici utilizați pentru aceste cercetări cuprinde doar cinci din cei opt markeri folosiți într-un studiu anterior în populațiile naturale de pin silvestru (Tóth et al., 2017) și este aproape complet diferit față de alte studii (Bernhardsson et al., 2016).

Populațiile de pin silvestru din turbării (E-PB și E-PS) prezintă o diversitate genetică mai scăzută, $H_e = 0,658$ respectiv, $H_e = 0,635$, comparativ cu populațiile care cresc pe soluri sărace în nutrienți sau pe stâncării. Interesant este că același model poate fi observat și pentru populațiile investigate în aceeași regiune într-un studiu anterior (Tóth et al., 2017). O diversitate genetică mai scăzută în populațiile de pin silvestru din turbării ar putea fi explicată prin condițiile extreme de mediu, dimensiunea mică a acestora și intervențiile antropice. Populațiile de pin silvestru din turbării se găsesc pe terenuri plane și sunt mai accesibile comparativ cu populațiile naturale de pin silvestru situate pe versanți stâncoși din Carpații Orientali și Meridionali (Șofletea și Curtu, 2007). Numărul mediu de alele și numărul de alele private au valorile cele mai scăzute în populațiile din turbării. Aceste populații cresc în zone cu condiții naturale extreme, unde se presupune că presiunea acțiunii selecției este puternică și ar putea duce în timp la o reducere a diversității genetice. Nu au fost observate semne ale efectului de gât de sticlă (*bottleneck*), dar trebuie ținut cont de faptul că în analiză au fost incluși doar opt markeri nucleari nSSR. Majoritatea alelelor private identificate au fost observate în populațiile corespunzătoare ecotipului de stâncărie din Carpații Meridionali. Eșantionarea în astfel de populații mici și relictice a fost foarte dificilă din cauza terenului accidentat (stâncării). Acest fapt susține ipoteza conform căreia populațiile analizate din Carpații Meridionali sunt neafectate de factorii antropici și pot adăposti variante alelice rare/unice. Într-un studiu recent (Tóth et al., 2019), singura populație de pin silvestru investigată din Carpații Meridionali face parte dintr-un grup genetic specific populațiilor din Carpații de Vest din Ungaria și Munții Apuseni, și nu dintr-un alt grup genetic corespunzător

populațiilor din Carpații Orientali. Regiunea Carpaților Orientali este considerată un refugiu glaciatic distinct pentru pinul silvestru (Tóth et al., 2017).

Valorile indicelui de fixare (F_{IS}) observate în acest studiu sunt în concordanță cu cele raportate anterior pentru pinul silvestru (Nowakowska et al., 2014; Scalfi et al., 2009). Mai mult, doar în două dintre cele opt populații, valorile F_{IS} au fost pozitive și diferite semnificativ de zero, indicând astfel un exces de homozigoți. Excesul de homozigoți este un fenomen comun la speciile de conifere și poate fi rezultatul selecției împotriva heterozigoților, încrucișarea selectivă sau prezența unor alele nule (García Gil et al., 2015). Cu toate acestea, populațiile izolate și relictice de pin silvestru din Munții Apenini nu prezintă niciun exces semnificativ de homozigoți (Scalfi et al., 2009), ceea ce se întâmplă și în cazul majorității populațiilor analizate din Munții Carpați.

Un nivel relativ ridicat de diferențiere genetică între populațiile din Carpații Orientali și Meridionali a fost evidențiat de analiza AMOVA (6%), ceea ce este în concordanță cu rapoartele anterioare referitoare la populațiile periferice de pin silvestru din sud-estul Europei (Belletti et al., 2012; Scalfi et al., 2009; Tóth et al., 2017). Cel mai probabil această diferențiere genetică la nivel nuclear nu este datorată unui flux genetic recent limitat, dar poate fi o consecință a evenimentelor demografice din trecut (Tóth et al., 2017).

Analizele au scos în evidență o structură geografică slabă, cu multe populații mixte. Trebuie avut în vedere faptul că în analiza cu software-ul STRUCTURE nu au fost luate în considerare informațiile despre locația geografică spre deosebire de un studiu anterior care a folosit acest tip de date (cu *LocPrior*) (Tóth et al., 2017). Structura actuală a populațiilor este rezultatul istoriei evolutive interglaciare și postglaciare a pinului silvestru în regiunea Carpaților. Existența refugiiilor glaciare în Carpați (Prus-Głowacki et al., 2012; Tanțău et al., 2011), amestecul liniilor filogenetice, precum și reducerile sau expansiunile populaționale, ar fi putut influența fondul genetic actual al speciei (Bernhardsson et al., 2016; Tóth et al., 2017). În prezent, pinul silvestru reușește să supraviețuiască doar în condiții de habitat extrem (de exemplu, turbării, stâncării), adică nișe ecologice în care continuă să fie mai competitiv decât alte specii de foioase și rășinoase (Șofletea și Curtu, 2007).

Conform analizei STRUCTURE, cele două populații de pin silvestru situate pe latura exterioară a arcului Carpaților Orientali (E-TU și E-BI) sunt foarte asemănătoare din punct de vedere genetic. O discontinuitate genetică între acest grup de două populații și restul populațiilor din Carpații Orientali este susținută de analiza BARRIER. Mai mult, grupul celor două populații de turbărie pare foarte distinct în analiza STRUCTURE (fără *LocPrior*), dar există aparent o discontinuitate genetică relativ puternică între cele două turbării conform analizei BARRIER. Totuși, atunci când s-a luat în considerare locația geografică în analiza STRUCTURE, turbăria E-FB a apărut într-un cluster genetic diferit față de turbăria E-PS (datele nu sunt prezentate); ceea ce sugerează că rezultatele celor două analize sunt asemănătoare. Mai mult, aceeași turbărie E-FB este situată în interiorul Carpaților, fiind cea mai centrală populație de pin silvestru eșantionată și, astfel, mai izolată față de celelalte

populații din Carpații Orientali. Așa cum au sugerat rezultatele anterioare (Tóth et al., 2017), nu a fost detectată o barieră puternică între populațiile din Carpații Orientali și cei Meridionali.

Structura Genetică Spațială

Structuri genetice spațiale (SGS) semnificative statistic au fost identificate în aproape toate populațiile de pin silvestru analizate. Dispersia limitată a genelor prin polen și semințe, conform ipotezei izolării prin distanță, poate explica modelul actual al SGS (Vekemans și Hardy, 2004). Majoritatea semințelor au căzut sub coroana arborilor-mamă în populațiile relictice de pin silvestru din Munții din Sudul Spaniei (Castro et al., 1999). Existența unor structuri genetice spațiale semnificative este un rezultat așteptat în populațiile naturale. De exemplu, structuri genetice spațiale semnificative au fost detectate într-o pădure veche de *Pinus strobus* din estul Americii (Marquardt et al., 2007) sau într-o pădure mixtă de stejar (Valbuena-Carabana et al., 2007). Absența SGS în populația de pin silvestru dintr-o turbărie (E-PS) ar putea fi explicată prin istoricul arboretului, incluzând intervențiile umane, precum și prin modul de eșantionare (cu toate că s-a evitat eșantionarea indivizilor apropiați, presupus înrudiți; distanțele dintre arbori fiind mai mari de 15–20 m pentru a nu influența intensitatea SGS în populațiile de pin silvestru analizate).

Intensitatea SGS, indicată de parametrul S_p , a variat semnificativ între populațiile de pin silvestru analizate. Cu toate acestea, valoarea medie la nivelul tuturor populațiilor (0.0100) este în concordanță cu valorile S_p raportate pentru alte specii de arbori (0.0102) sau pentru specii de plante rezultate din încrucișare liberă (0.0126) (Vekemans și Hardy, 2004). Intensitatea SGS a fost ușor mai scăzută în două arborete mature de pin silvestru gestionate (interval: 0.0045–0.0098) (González-Díaz et al., 2017). O structură genetică spațială mai slabă ($S_p = 0.0018$) a fost raportată pentru populațiile alpine de *P. cembra*, o specie la care dispersia semințelor se face prin intermediul păsărilor (Mosca et al., 2018). Variația valorii S_p poate fi legată de schema de eșantionare și de densitatea populației. Astfel, eșantionarea grupurilor de indivizi din locații diferite, aflate la sute de metri distanță pentru două dintre populațiile de pin silvestru analizate (S-RE și S-VS) ar putea explica valorile mai scăzute ale parametrului S_p (0.0036 și 0.0049). Valoarea S_p este mai mică în populațiile cu densitate mare comparativ cu cele cu densitate scăzută (Vekemans și Hardy, 2004). Aceasta ar putea fi o explicație pentru valoarea cea mai scăzută a parametrului S_p (0.0012) obținută în populația cu densitate relativ mare E-PS. Cea mai mare valoare S_p a fost calculată pentru populația E-TU (0.0207), care prezintă o densitate mai scăzută comparativ cu celelalte populații studiate. Valori similare (0.020–0.026) au fost raportate pentru populații mici izolate de *Pinus pinaster* din Peninsula Iberică (De-Lucas et al., 2009). Abaterile de la încrucișările aleatorii, densitatea scăzută a populației și modul de grupare al arborilor sursă de material forestier de reproducere ar putea explica o SGS semnificativă și mai puternică în populațiile mici și izolate comparativ cu cele din arealul continuu (De-Lucas et al., 2009).

O limitare a acestui studiu este numărul redus de markeri genetici nucleari utilizați. Totuși, numărul de markeri SSR folosiți este asemănător cu cel din studiile recente privind structura genetică a populațiilor de pin silvestru (Bernhardsson et al., 2016; Tóth et al., 2017). Au fost adoptate diferite scheme de eșantionare (de exemplu, eșantionarea de-a lungul unuiu sau a două transecte, respectiv din mai multe subpopulații) dat fiind pe de o parte configurația spațială a terenului din Munții Carpați, iar pe de altă parte datorită distribuției dispersate a arborilor.

Concluzii

Studiile anterioare referitoare la diversitatea genetică a populațiilor din Carpați (Tóth et al., 2017) și cercetările realizate în cadrul acestui studiu, pot contribui la dezvoltarea unei strategii pentru gestionarea durabilă și conservarea ultimelor populații relictice de pin silvestru din Carpații României. Plantațiile de pin silvestru au fost înființate cu semințe importate din alte regiuni (de exemplu, posibil din Europa Centrală), fără o evidență strictă a acestui transfer (Șofletea și Curtu, 2007). Din păcate, utilizarea semințelor locale ca material forestier de reproducere a fost complet neglijată. Conservarea resurselor genetice ale pinului silvestru în Munții Carpați nu ar trebui să se bazeze exclusiv pe unitățile de conservare in-situ. Înființarea de plantații pentru conservarea ex-situ ar trebui să reprezinte o alternativă pentru o mai bună conservare și utilizare a acestui fond genetic unic.

Acest studiu, bazat pe eșantionarea populațiilor naturale de pe ambele părți ale Munților Carpați, confirmă rapoartele anterioare care indică o diversitate genetică relativ ridicată în cadrul populațiilor, în ciuda reducerii și fragmentării recente a arealului de distribuție al pinului silvestru. Au fost identificate posibile indicii pentru o diversitate genetică mai scăzută în populațiile de pin silvestru din turbării, comparativ cu populațiile care cresc pe soluri sărace în nutrienți și pe stâncăriile din Munții Carpați. Identificarea existenței unei structuri genetice relativ omogene de-a lungul Carpaților Meridionali și Orientali, poate fi explicată prin amestecul postglaciar al populațiilor provenite din diferite refugii glaciare existente în regiune. Modelele de structură genetică spațială detectate în populațiile naturale de pin silvestru pot fi datorate pe de o parte dispersiei limitate a semințelor, iar pe de altă parte unor factori cum ar fi: configurația spațială a populației, schema de eșantionare și densitatea populației.

4.2. Diversitatea genetică a pinului silvestru la nivel cloroplastic

Introducere

Diversitatea genetică la nivel cloroplastic reprezintă un instrument esențial pentru înțelegerea structurii genetice, a evoluției și a dinamicii populațiilor de gimnosperme. Microsateliții cloroplastici (cpSSRs), caracterizați prin polimorfism ridicat și moștenire uniparentală (de obicei pe linie paternă la gimnosperme), oferă informații valoroase despre istoria filogeografică și fluxul genetic între populații (Provan et al., 2001; Petit et al., 2005).

Speciile de conifere sunt deosebit de relevante pentru astfel de studii datorită importanței lor ecologice și economice în ecosistemele boreale și temperate. Numeroase studii bazate pe microsateliți cloroplastici au arătat că variația genetică a pinului silvestru este, în general, ridicată și concentrată în principal în cadrul populațiilor, în timp ce diferențele genetice între populații sunt relativ mici (Dering et al., 2017; Robledo-Arnuncio et al., 2005; Semerikov et al., 2014). Această omogenitate este în mare parte rezultatul unei origini comune în istoria evolutivă recentă, dar și al existenței unui flux genetic prin polen extins pe distanțe mari. Datorită potențialului mare de dispersie al polenului, omogenitatea genetică se poate menține cu ușurință pe distanțe mari (Chybicki et al., 2017). Markerii cpSSR sunt frecvent utilizați pentru a reconstitui rutele de migrație postglaciară ale gimnospermelor, pentru a identifica refugiile glaciare și pentru a evalua variația genetică între populațiile relictice și cele actuale (Tollefsrud et al., 2008).

Pentru estimarea nivelului diversității genetice la nivel cloroplastic, au fost luate în considerare populații din două regiuni geografice, cu condiții ecologice și istorii evolutive diferite. Astfel au fost luate în considerare două ipoteze: 1) există diferențe de structură genetică populațională între populațiile de pin silvestru din Siberia Centrală și cele din Carpații României? 2) Care este gradul de diferențiere genetică între cele două regiuni?

Material și metode de analiză

Pentru analizele la nivel cloroplastic au fost selectate 4 populații din România (populații naturale din Munții Carpați, aflate în condiții staționale diferite) și 15 populații din Rusia (Siberia Centrală). Au fost recoltate și analizate ace de la 190 de arbori - câte 10 arbori pentru fiecare populație. ADN-ul a fost extras din ace verzi sau uscate (păstrate în prealabil în pungi cu Silica gel) utilizând metoda CTAB (Doyle și Doyle, 1990).

În analiză au fost incluși 10 markeri cloroplastici: 6 dezvoltati Provan et al. în 1998 (PCP41131, PCP45071, PCP30277, PCP36567, PCP48256, PCP26106) și 4 dezvoltati de Vendramin et al. în 1996 (Pt1254, Pt71936, Pt15169 și Pt87268)

Tabelul 4.6. Populațiile de pin silvestru analizate din România (Carpații Orientali și Meridionali)

Populația	Abreviere	Latitudine/Longitudine	Altitudine
Poiana Stampei	Pop -Q	47.30/25.12	920
Cheile Bicazului	Pop -P	46.83/25.80	1060–1110
Retezat	Pop-R	45.44/22.78	680–750
Lotrișor	Pop-S	45.30/24.28	340-510

Markerii au fost grupați în două multiplexe pentru analiză și amplificați prin reacții PCR separate, fiecare având un volum total cuprins între 10 și 12 μ l. Amplificarea ADN-ului s-a realizat utilizând kitul Qiagen Multiplex PCR (Qiagen, Germania), respectând protocolul sugerat de producător.

Reacția PCR a fost efectuată într-un thermal cycler și a inclus următoarele etape: o primă etapă de denaturare inițială de 15 minute la 95 °C, urmată de 30 de cicluri în care probele au fost supuse 15 secunde la 94 °C, 1 minut și 30 de secunde la 60 °C (pentru setul de 6 markeri PCP) sau 58 °C (pentru setul de 4 markeri Pt) și 1 minut și 30 de secunde la 72 °C, finalizând cu o etapă de extensie de 10 minute la 72 °C.

Pentru estimarea variabilității genetice au fost utilizate două programe:

- HAPLOTYPE ANALYSIS versiunea 1.05 (Eliades și Eliades, 2009), care a permis estimarea celor mai importanți parametri ai diversității genetice la nivel cloroplastic: HCP - diversitatea haplotipurilor, P - haplotipuri private, A - haplotipuri distincte la nivelul fiecărei populații, NE - numărul efectiv de haplotipuri identificate și D^2sh - distanța genetică medie între haplotipuri.
- GenAEx V.6. 5 (Peakall și Smouse 2006) pentru analiza moleculară a varianței.
- STRUCTURE ver.2.3.4 (Pritchard et al., 2000) pentru analiza structurii populaționale.

Rezultate

În total, au fost observate 49 de alele la cei 10 loci cloroplastici analizați, pentru 190 de arbori din 19 populații de pin silvestru. Numărul mediu de alele și numărul efectiv de alele au fost ușor mai mici în populațiile din Siberia ($N_a = 2.64$; $N_e = 1.95$) (Sheller et al., 2021) comparativ cu cele din Carpați ($N_a = 2.73$; $N_e = 2.08$) (Tabelul 4.7). Valoarea indicelui Shannon a variat între 0.60 (Pop-R) și 0.81 (Pop-Q) în populațiile din România. Diversitatea genetică medie (h) pentru cei 10 loci cpSSR analizați în populațiile de pin silvestru din Carpații României a fost de 0,42.

Analiza la nivelul celor 10 microsateliți cloroplastici (cpSSR) a permis identificarea a 39 de haplotipuri pentru populațiile din România și 119 haplotipuri pentru populațiile din Rusia. 85% dintre haplotipuri au fost detectate doar o singură dată (acestea sunt cunoscute sub denumirea de haplotipuri unice). În cadrul analizei genetice, cele mai multe haplotipuri

private, în număr de nouă, au fost identificate în patru populații din România și trei din Siberia (Pop-C, Pop-G și Pop-H). Totodată, rezultatele au evidențiat prezența a trei haplotipuri comune (H86, H107, H118) între aceste populații, sugerând posibile conexiuni genetice între grupurile din cele două regiuni (Figura 4.5).

Tabelul 4.7. Diversitatea genetică pentru 4 populații de pin silvestru din Carpații României pe baza microsateleliților cloroplastici

<i>Populația</i>	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>h</i>
Total 15 populații din Siberia Centrală	150	2.64 (±0.29)	1.95 (±0.22)	0.71 (±0.11)	0.42 (±0.06)
Pop-P	10	2.80 (±0.36)	2.17 (±0.27)	0.78 (±0.15)	0.45 (±0.08)
Pop-Q	10	3.30 (±0.50)	2.16 (±0.35)	0.81 (±0.17)	0.43 (±0.08)
Pop-R	10	2.30 (±0.42)	1.97 (±0.37)	0.60 (±0.17)	0.35 (±0.09)
Pop-S	10	2.50 (±0.31)	2.00 (±0.19)	0.73 (±0.10)	0.46 (±0.05)
Total 4 populații naturale din România	40	2.73 (±0.40)	2.08 (±0.30)	0.73 (±0.15)	0.42 (±0.08)

Abrevieri: Mărimea eșantionului (*N*); Numărul mediu de alele pe locus (*Na*); Numărul efectiv de alele (*Ne*); Indicele Shannon (*I*); Diversitatea genetică (*h*); ± erori standard.

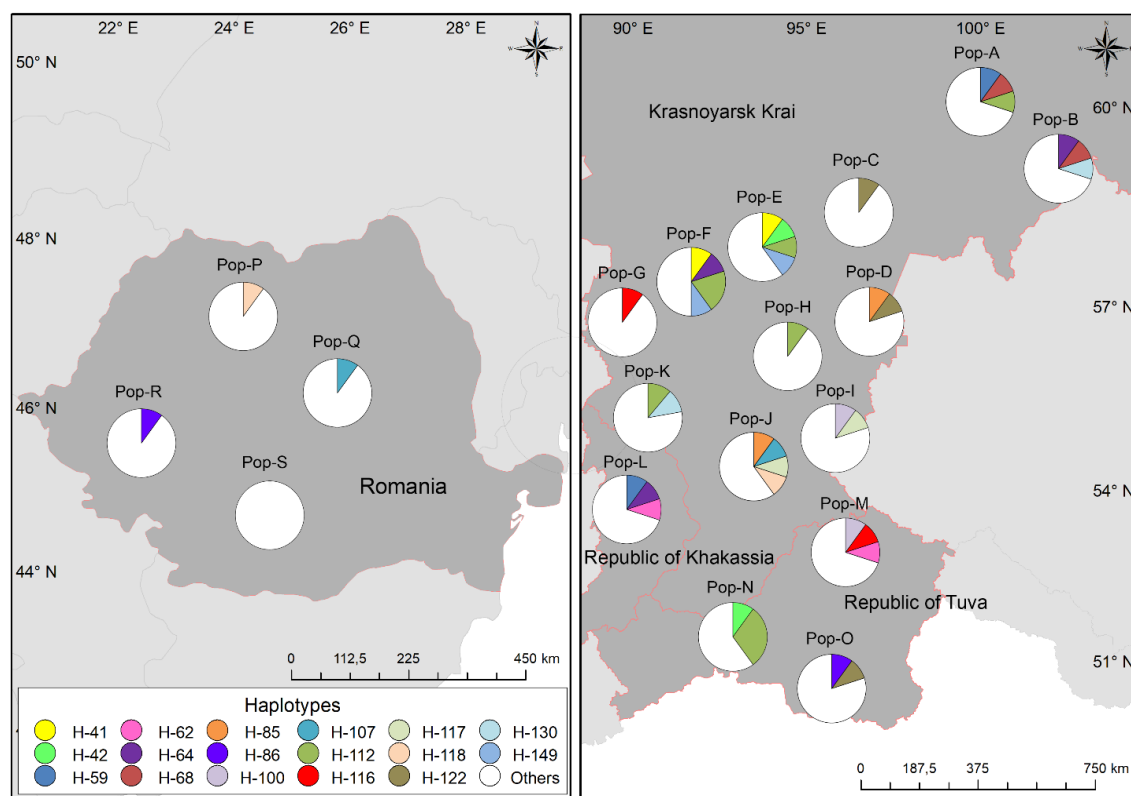


Figure 4.5. Distribuția haplotipurilor comune identificate în cele 19 populații analizate

Pentru populațiile din România numărul efectiv de haplotipuri a variat între 8.33 și 10, iar distanța genetică medie între indivizi a variat între 3.97 (Pop-R/Retetz) și 7,55 (Pop-P/Poiana Stampei) (Tabelul 4.8).

Tabelul 4.8. Caracteristicile statistice ale haplotipurilor cpSSR

Populație	A	P	N_E	H_{CP}	D^2sh
Valori medii pentru 15 populații din Siberia Centrală	9.47	7.00	9.18	0.99	4.48
Pop-P	10	9	10.00	1.00	7.55
Pop-Q	10	9	10.00	1.00	6.59
Pop-R	10	9	10.00	1.00	3.97
Pop-S	9	9	8.33	0.97	5.11
Valori medii pentru 4 populații naturale din România	9.75	9.00	9.58	0.99	5.81

Abrevieri: A - Numărul de haplotipuri; P - Numărul de haplotipuri private; N_E - Numărul efectiv de haplotipuri; H_{CP} - Diversitatea haplotipică; D^2sh - Distanța genetică medie între indivizi

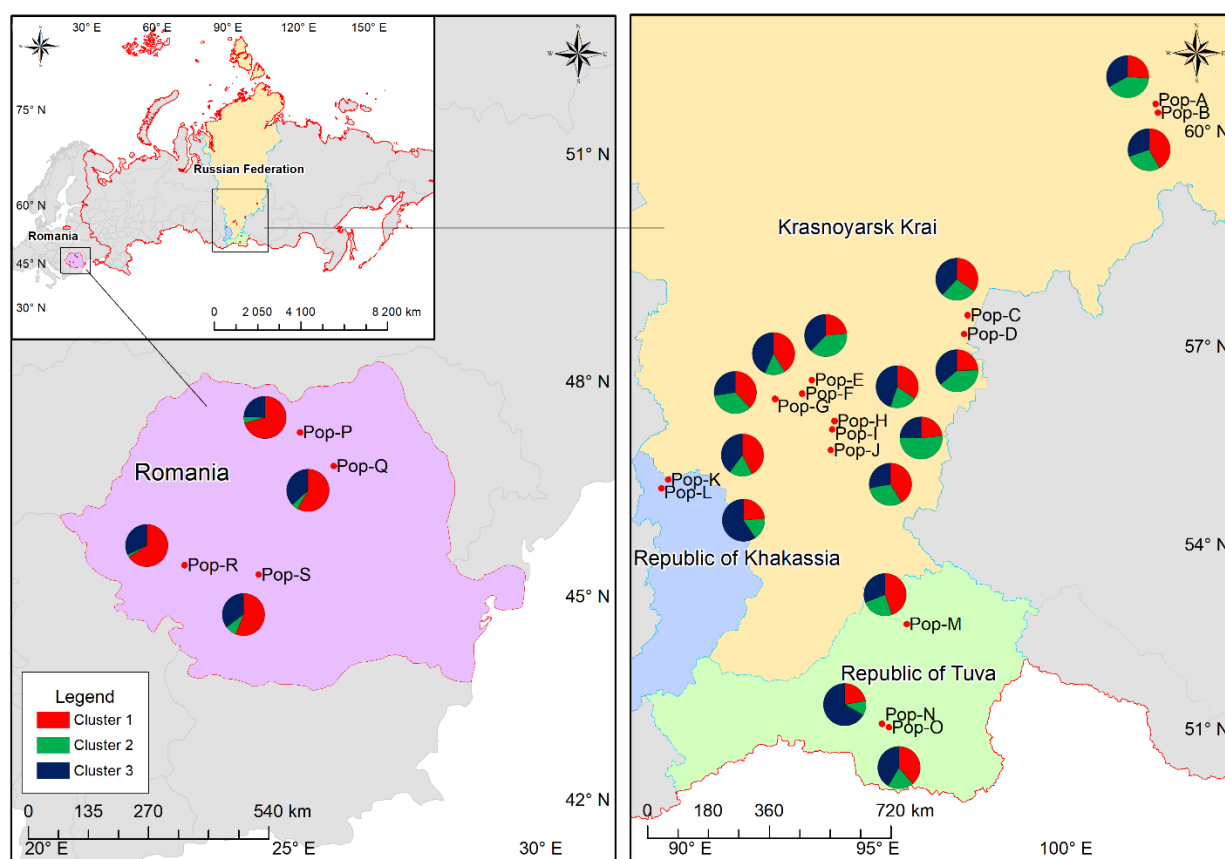


Figura 4.6. Distribuția clusterelor genetice identificate din analiza Structure

Analiza moleculară a varianței (AMOVA) a reliefat faptul că variația existentă la nivelul celor două regiuni geografice (Rusia – Siberia Centrală și România - Munții Carpați) este datorată diferenței din interiorul populațiilor (92%). Pentru populațiile din România,

diferențierea genetică între populații a fost mai pronunțată decât pentru populațiile din Rusia, explicând 6% din variația totală, restul variației (94%) fiind observată la nivelul de individ.

Analiza structurii genetice a populațiilor de pin silvestru din cele două regiuni geografice a permis separarea acestora în trei grupuri/subpopulații ($K = 3$). Comparativ cu arborii din populațiile din Rusia care au fost alocați majoritar grupului 3 (clusterul albastru), populațiile din România au avut cel mai mare număr de arbori alocați în grupul 1 (cluster de culoare roșie) (Figura 4.6).

Discuții și concluzii

Comparând rezultatele pentru cele două regiuni analizate, cele 4 populații relictice de pin silvestru din Munții Carpați au fost caracterizate printr-un nivel relativ mai ridicat de diversitate genetică. Numărul de alele și haplotipuri, numărul efectiv de haplotipuri, numărul de haplotipuri private și distanța genetică medie între indivizi au avut valori mai mari în populațiile din România comparativ cu populațiile din Siberia Centrală. Nivelul mai ridicat de diversitate genetică în populațiile carpatice ar putea fi o consecință a istoricului interglaciar și postglaciar al pinului silvestru în sud-estul Europei. Astfel, existența unor refugii glaciare în Munții Carpați și amestecul liniilor filogenetice ar putea explica un nivel mai mare de diversitate genetică în această regiune (Șofletea et al., 2020).

AMOVA a arătat un nivel scăzut de structură genetică ($\Phi_{IPT} = 3\%$) între cele cincisprezece populații din Rusia, chiar dacă acestea sunt dispersate pe distanțe mari de peste 1000 km. În schimb, variația genetică între cele patru populații relictice din Carpați a reprezentat 6% din variația totală, deși distanțele geografice dintre ele sunt mult mai mici. Barierele geografice mai semnificative între populațiile carpatice decât între cele siberiene ar fi putut contribui la un nivel mai mare de diferențiere genetică. Cu toate acestea, o diferențiere genetică scăzută între populațiile de pin silvestru, prin studii la nivel cloroplastic a fost raportată și în studii anterioare (Robledo-Arnuncio et al., 2005; Provan et al., 1998). Valori scăzute ale Φ_{IPT} (0,41–1,7%) au fost semnalate într-un studiu anterior pentru 38 de populații de pin silvestru din Asia și Rusia (Semerikov et al., 2014).

Prezența haplotipurilor comune în două regiuni geografice atât de îndepărtate sugerează o posibilă origine comună a acestora sau existența unui flux de gene prin polen extins pe distanțe mari.

Capitolul 5. Evaluarea diversității genetice cu ajutorul markerilor nucleari în populații de pin negru (*Pinus nigra* Arn.)

Introducere

Pinus nigra este una dintre cele mai utilizate specii de arbori pentru reîmpădurire la nivel mondial și este considerat un potențial înlocuitor pentru speciile indigene de conifere localizate în Europa Centrală în condițiile schimbărilor climatice preconizate (Enescu et al., 2016). Pinul negru european este distribuit pe scară largă, dar inconsistentă, ca urmare a mișcărilor pleistocene către și din refugii glaciare, a recolonizării holocene și a structurii geomorfologice complexe a Europei (Giovannelli et al., 2017). Deși, este cunoscută adaptabilitatea sa în zonele cu extreme climatice (Çengel et al., 2012), în prezent pinul negru european are o distribuție foarte fragmentată și acoperă aproximativ 3,5 milioane de hectare (Isajev et al., 2004; Naydenov et al., 2006; Enescu et al., 2016). Pinul negru se regăsește la scară largă în sudul Europei, întinzându-se din Spania până în Austria, în cea mai mare parte a Peninsulei Balcanice, în estul Rusiei, în sudul Turciei, în insulele Cipru, Sicilia și Corsica, cu unele zone izolate în Algeria și Maroc (Critchfield et al., 1996). Totuși, distribuția pinului negru este strâns legată de variabilitatea intraspecifică, diferitele subspecii și varietăți fiind adaptate unor condiții ecologice particulare. Astfel, pinul negru poate crește pe o varietate de soluri și substraturi litologice, de la nisipuri podzolice la calcare sau în habitate uscate și umede, cu o toleranță considerabilă la fluctuațiile de temperatură (Farjon, 2013; Nikolić și Tucić, 1983). În ceea ce privește variabilitatea acestei specii, este notabilă și recunoscută diversitatea sa taxonomică intraspecifică, context în care de-a lungul timpului au fost propuse mai multe scheme de clasificare a subspeciilor și varietăților, bazate pe caracteristicile morfo-anatomice, moleculare și fitogeografice. Conform acestora, după unii autori s-au diferențiat trei subspecii (*ssp. nigra*, *ssp. dalmatica* și *ssp. pallasiana* - Gaussen et al., 1964, 1993; Jalas și Suominen, 1973; Raab-Straube, 2014), după alte surse sunt nominalizate cinci subspecii (*ssp. salzmannii*, *ssp. nigra*, *ssp. pallasiana*, *ssp. dalmatica*, *ssp. laricio* - Isajev et al. 2004) sau șase subspecii (*ssp. nigra*, *ssp. dalmatica*, *ssp. illyrica*, *ssp. gocensis*, *ssp. pallasiana* și *ssp. banatica* (Vidaković, 1991; Ciocârlan, 2000). De remarcat în ultima clasificare nominalizarea *ssp. banatica*.

În România se regăsesc atât populații naturale de pin negru de Banat (*ssp. banatica* - pe suprafețe mici și dispersate, cât și plantații de pin negru austriac (*ssp. nigra*) (Șofletea și Curtu, 2007). Pinul negru de Banat are o distribuție naturală limitată în partea de sud-vest a României, în Munții Banatului, de unde se extinde moderat spre sud, înspre Dunăre, în Serbia (Șofletea și Curtu, 2007; Marangoci, 2019). În sud-vestul României principalele zone de distribuție sunt Parcul Național Domogled-Valea Cernei, Parcul Natural Porțile de Fier și Platoul Mehedinți, unde ocupă peste 3000 de ha (Pădurile cu pin negru de Banat - Plan Management, 2006). Cu toate că este considerat un endemit pentru această zonă (Șofletea

și Curtu, 2007), de-a lungul timpului încadrarea taxonomică a fost discutabilă, fiind uneori tratat ca specie, alteori ca varietate sau subspecie a pinului negru. Astfel, în 1828 (Rochel) și 1831 (Schwarzott) precizau faptul că aceste populații din sud-vestul României sunt formate din exemplare ce aparțin speciei *Pinus pinaster*. Ulterior, Heuffel (1858) a descris aceleași populații ca aparținând ssp. *laricio*, sau potrivit lui Georgescu (1936) ca o specie independentă denumită *Pinus banatica* (Georgescu și Ionescu). Borza (1947) a clasificat populațiile de pin negru din Banat și Oltenia ca aparținând ssp. *pallasiana* (Boșcaiu și Boșcaiu, 1999). Datele mai recente afirmă faptul că acestea aparțin ssp. *nigra* (Giovannelli et al., 2017; Scotti-Saintagne et al., 2019).

Având în vedere istoria taxonomică complexă și statutul variabil al pinului negru de Banat, precum și distribuția fragmentată a acestor populații în România, devine evidentă importanța investigării diversității genetice a acestuia. Cunoașterea nivelurilor de diversitate și a structurilor genetice ale populațiilor de arbori, este foarte importantă pe de o parte pentru obținerea de material forestier de reproducere iar pe de altă parte pentru stabilirea unor strategii de conservare a speciilor pe termen lung. Se recomandă ca introducerea pinului negru în regiunile din afara ariei sale naturale de distribuție să nu urmărească selectarea unui număr limitat de proveniențe cu adaptabilitate ridicată, ci stabilirea unor populații cu o diversitate genetică ridicată (Kreyling et al., 2012).

Studiile recente asupra diversității genetice a pinului negru au utilizat markeri moleculari pentru a evalua structura genetică și diversitatea populațiilor, ceea ce a permis o înțelegere mai detaliată a relațiilor evolutive între subspeciile și populațiile acestei specii (Vendramin et al., 1996; Naydenov et al., 2006; Soto et al., 2010). Markerii genetici precum RAPD, AFLP sau SSR au fost folosiți pentru a diferenția diferite subspecii ale pinului negru sau pentru a determina diversitatea și structura genetică a populațiilor din diferite regiuni (Rubio-Moraga et al., 2012; Liu et al., 2012; Šarac et al., 2015). Aceste studii au reliefat în general o diversitate genetică ridicată, indicând o mare variabilitate adaptativă, dar și un flux genetic relativ constant între populațiile din diferite zone geografice (Giovannelli et al., 2017; Bonavita et al., 2016). În ciuda variabilității morfologice, fiziologice și ecologice ridicate a speciei, care probabil a rezultat din distribuția sa geografică extinsă, dar puternic fragmentată (Bogunic et al., 2007), rezultatele au arătat o omogenitate a fluxului de gene între populații (Giovannelli et al., 2019).

Scopul acestui studiu a fost compararea structurii genetice a unor populații naturale de pin negru ssp. *banatica* cu alte populații care includ o serie de subspecii alohtone (*nigra*, *pallasiana*, *laricio*) pentru a identifica asemănările sau diferențele dintre acestea. Ipotezele formulate au fost: (i) Există diferențe în ceea ce privește diversitatea genetică pentru populații de origini diferite? (ii) A modificat fragmentarea arealului structura genetică spațială a populațiilor naturale din România? Pentru a verifica aceste ipoteze s-a recurs la analiza de probe recoltate din populații din arealul natural al pinului negru de Banat, precum și a unor

eșantioane din populații din afara României, din zone în care literatura de specialitate menționează existența altor subspecii ale pinului negru.

Materiale și metode de cercetare

Eșantionarea populațiilor și extragerea ADN-ului

Studiul a fost realizat în zece populații europene de *Pinus nigra* (Tabelul 5.1) pentru 4 subspecii: ssp. *banatica* (6 populații), ssp. *nigra* (2 populații), ssp. *pallasiana* (1 populație) și ssp. *laricio* (1 populație). Populațiile de *Pinus nigra* ssp. *banatica* analizate sunt localizate în sud-vestul României: TRE (Munții Almăjului), BOR (Podișul Mehedinți), SVI (Valea Dunării), SOH (Munții Vâlcăului), DOM și CHT (Munții Mehedinți). Cele două populații de *P.n.* ssp. *nigra* provin din Austria (MEK, Munții Hauerberg) și Bulgaria (STY, Munții Pirin). Subspecia *pallasiana* este reprezentată de o populație din Grecia (PEL, Munții Killini), iar subspecia *laricio* de o populație din Italia (SIL, Munții Botte Donato) (Figura 5.1).

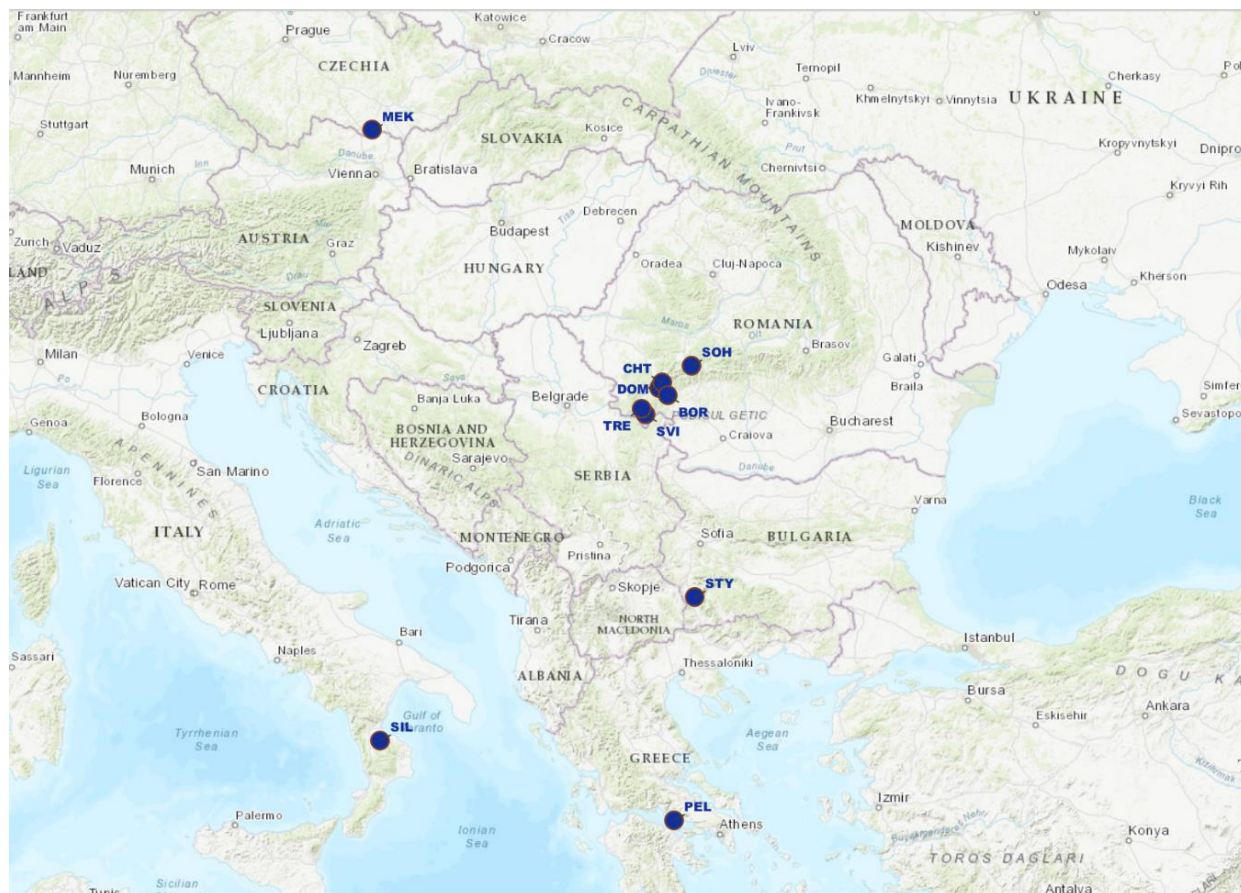


Figura 5.1. Localizarea celor 10 populații de pin negru analizate (detaliile se regăsesc în Tabelul 5.1)

Pentru realizarea analizelor genetice au fost colectate ace de la un număr cuprins între 29 și 70 de arbori per populație, selectați astfel încât distanța minimă între aceștia să fie de cel puțin 25-30 m. Probele au fost depozitate la -60°C pentru a asigura integritatea

materialului genetic înainte de analiză. Extragerea ADN-ului s-a efectuat utilizând protocolul standard CTAB (Doyle și Doyle, 1987). Pentru genotipare, s-au utilizat zece markeri de tipul microsateliților: doi markeri specifici pentru *Pinus taeda* (PtTX4001 și PtTX3107) (Zhou et al., 2002; Elsik și Williams, 2011) și opt markeri dezvoltati special pentru *Pinus nigra* (pn6360, pn7754, pn2153, pn42379, pn42374, pn6175, pn8747 și pn6266) (Giovannelli et al., 2017).

Tabelul 5.1. Detalii privind localizarea populațiilor analizate

Populație	ID	Țara	Subspecia	Latitudine	Longitudine	Număr de arbori	Altitudine m
				N	E		
Domogled	DOM	România	<i>banatica</i>	44°52'56.93"	22°25'38.42"	70	563
Cheile Țăsnei	CHT	România	<i>banatica</i>	44°58'13.49"	22°29'57.88"	69	540
Svinița	SVI	România	<i>banatica</i>	44°29'00.73"	22°08'37.03"	66	206
Valea Sohodolului	SOH	România	<i>banatica</i>	45°12'52.92"	23° 7'13.56"	69	920
Pădurea Borovăț	BOR	România	<i>banatica</i>	44°46'24.59"	22°37'11.98"	68	407
St. Trescovăț	TRE	România	<i>banatica</i>	44°33'48.73"	22°03'19.61"	40	540
Peloponnes	PEL	Grecia	<i>pallasiana</i>	38°00'65.66"	22°43'90.55"	50	1370
Merkenstein	MEK	Austria	<i>nigra</i>	47°97'71.69"	16°15'50.94"	34	416
Strumyani	STY	Bulgaria	<i>nigra</i>	41°39'0.08"	23°11'34.79"	50	164
Sila	SIL	Italia	<i>laricio</i>	39°19'56.7"	16°26'25.7"	29	1326

Reacțiile PCR au fost realizate într-un volum total de 10 μ l, utilizând markeri genetici grupați în două multiplexe: M1 (pn2153, pn4379, pn6360, pn7754, pn2246, pn6175) și M2 (PtTX4001, pn6266, pn8747 and PtTX3107). Reacția PCR a fost realizată într-un thermal cycler Corbett (Corbett Research) cu următoarele condiții: o denaturare inițială de 5 minute la 95°C, urmată de 32 de cicluri de 30 secunde la 95°C, 90 secunde la 58°C (M1)/ 57°C (M2) , 90 secunde la 72°C și o extensie finală de 30 minute la 60°C. Fragmentele amplificate au fost analizate pe un analizor genetic GenomeLab GeXP (Beckman Coulter). Genotiparea indivizilor a fost realizată utilizând software-ul GenomeLab GeXP (Versiunea 10.2, Beckman Coulter). Microsateliții utilizați în acest studiu au fost, în majoritatea cazurilor, cu repetări dinucleotidice, cu excepția markerului pn3107, care prezintă repetări trinucleotidice.

Analiza datelor

Programul MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al., 2004) a fost folosit pentru a estima prezența alelelor nule, prin metoda Oosterhout, utilizând 1000 de permutări. Ulterior, a fost utilizat programul Genepop versiunea 4.2. pentru a calcula frecvențele alelelor nule

detectate. Pentru a calcula parametrii diversității genetice a fost folosit software-ul GenAlEx v6.5 (Peakall și Smouse, 2012). Bogăția alelică (A_R), a fost estimată cu programul FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet, 1995). Matricea de diferențiere genetică pe perechi a indicilor F_{ST} între populații a fost calculată folosind software-ul Arlequin ver. 3.5. (Excoffier et al., 2005).

Analiza coordonatelor principale (PCoA) a fost realizată cu ajutorul programului GenAlEx ver. 6.501. Software-ul STRUCTURE v.2.3.4 a fost utilizat pentru a analiza structura genetică populațională (Pritchard et al. 2000). Au fost testate 3 rulări independente, cu K de la 1 la 10, fiecare rulare având 100.000 de iterații "burn-in" și 500.000 de iterații Monte Carlo Markov, fără LocPrior și frecvențe alelelor corelate. Cel mai probabil număr de clustere a fost estimat prin utilizarea programului CLUMPP v.1.1.2. (Jakobsson și Rosenberg 2007) pe baza valorilor ΔK și $L(K)$ (Evanno et al. 2005).

Structura genetică spațială a fost determinată cu programul GenAlEx 6.5 (Peakall et Smouse., 2012) pentru toți indivizii din populație. Distanțele geografice au fost determinate pe baza coordonatelor spațiale (latitudine și longitudine). Coeficientul $S_p = -bF / (1-F_{ij}$ version) a fost determinat cu ajutorul programului SPAGeDi 1.5 (Hardy și Vekemans, 2002) unde F_{ij} este coeficientul mediu de înrudire al lui Nason (Loiselle et al. 1995) pentru prima clasa de distanță, iar bF (b -log) este panta regresiei față de logaritmul distanței (Vekemans și Hardy, 2004). Testul de eterogenitate, implementat în GenAlEx v.6.5 (Peakall și Smouse, 2006; 2012) a fost utilizat pentru a compara corelogramele rezultate.

Pentru a detecta posibile efecte bottleneck au fost utilizate mai multe teste cu software-ul Bottleneck 1.2.02 (Cornuet și Luikart, 1996; Piry et al., 1999). Același program a fost utilizat și pentru a testa o abatere de la distribuția în formă de "L" a frecvențelor alelice, specifică populațiilor aflate în echilibru (Luikart et al., 1998). Aceste teste au fost realizate pentru modelele SMM și TPM.

Rezultate

Pentru evaluarea variabilității genetice la nivelul celor 10 populații de pin negru, inițial în analiză au fost incluși 10 markeri genetici. Ulterior datorită frecvenței ridicate a alelelor nule (38%) la marker-ul pn4379, acesta a fost exclus din analiză. Toți locii rămași în analiză au prezentat un polimorfism ridicat și valori moderate până la ridicate ale parametrilor diversității genetice pentru toate populațiile. La nivel de populație, numărul de alele per locus a variat de la 63 în populația MEK la 132 în populația CHT. Au fost identificate 25 de alele private, 10 dintre acestea regăsindu-se în populațiile de pin negru de Banat (Figura 5.2). În ceea ce privește numărul de alele private, cel mai mic număr (5) a fost în populația CHT, iar cel mai mare (15) în populația PEL raportată la ssp. *pallasiana*. Cu toate acestea, bogăția alelică, un parametru independent de dimensiunea eșantionului, a avut valoare maximă în populația CHT (12.410), iar valoare minimă în populația MEK (6.780). Dintre populațiile din România, populația SOH a avut cea mai mică valoare a bogăției alelice (9.940)

Tabelul 5.2. Variabilitatea genetică la nivel nuclear: Na - numărul de alele, Ne - numărul efectiv de alele, Ho - heterozigoția observată, He - heterozigoția așteptată, F - indicele de consangvinizare și AR - bogăția alelică.

Populație		Na	Ne	Ho	He	F	A _R
DOM	Medie	13.444	9.073	0.933	0.815	-0.182	11.520
	SE	2.444	2.124	0.016	0.047	0.085	
CHT	Medie	14.667	9.556	0.930	0.833	-0.149	12.410
	SE	2.380	2.038	0.018	0.042	0.080	
SVI	Medie	13.111	8.291	0.922	0.835	-0.118	11.270
	SE	2.182	1.583	0.019	0.032	0.048	
SOH	Medie	11.556	6.642	0.915	0.799	-0.170	9.640
	SE	1.780	1.340	0.030	0.036	0.075	
BOR	Medie	11.444	7.089	0.875	0.813	-0.103	10.090
	SE	1.717	1.277	0.036	0.035	0.085	
TRE	Medie	11.444	6.982	0.957	0.785	-0.254	10.050
	SE	2.495	1.648	0.018	0.042	0.085	
Total populații din România (ssp. <i>banatica</i>)	Medie	12.611	7.939	0.922	0.813	-0.163	10.830
	SE	0.867	0.677	0.010	0.016	0.031	
PEL (ssp. <i>pallasiana</i>)	Medie	13.111	9.352	0.894	0.877	-0.020	12.010
	SE	1.359	1.211	0.034	0.016	0.040	
MEK (ssp. <i>nigra</i>)	Medie	7.000	4.649	0.973	0.741	-0.351	6.780
	SOE	0.833	0.674	0.009	0.040	0.089	
STY (ssp. <i>nigra</i>)	Medie	9.222	5.849	0.985	0.784	-0.285	8.540
	SE	1.392	0.931	0.006	0.039	0.074	
SIL (ssp. <i>laricio</i>)	Medie	8.444	5.625	0.958	0.778	-0.248	8.290
	SE	1.215	1.027	0.015	0.033	0.052	
Total populații din afara României	Medie	9.444	6.369	0.952	0.795	-0.226	8.90
	SE	0.697	0.557	0.011	0.018	0.038	
Total	Medie	11.344	7.311	0.934	0.806	-0.188	10,060
	SE	0.610	0.468	0.008	0.012	0.024	

Valoarea maximă a numărului efectiv de alele (9.556) a fost observată în populația CHT și cea minimă (4.649) în populația MEK. Heterozigoția observată (Ho) a prezentat valori de la 0.875 la 0.985, cu o medie 0.922 la nivelul populațiilor de pin negru de Banat. Valorile heterozigoției așteptate (He) au fost cuprinse între 0.778 și 0.877, valoarea medie la nivelul eșantionului fiind de 0.806. Indicele de consangvinizare (F) sugerează un deficit de

heterozigoți în populațiile evaluate, cu valori extreme de -0.351 (MEK) și 0.020 (PEL) (Tabelul 5.2).

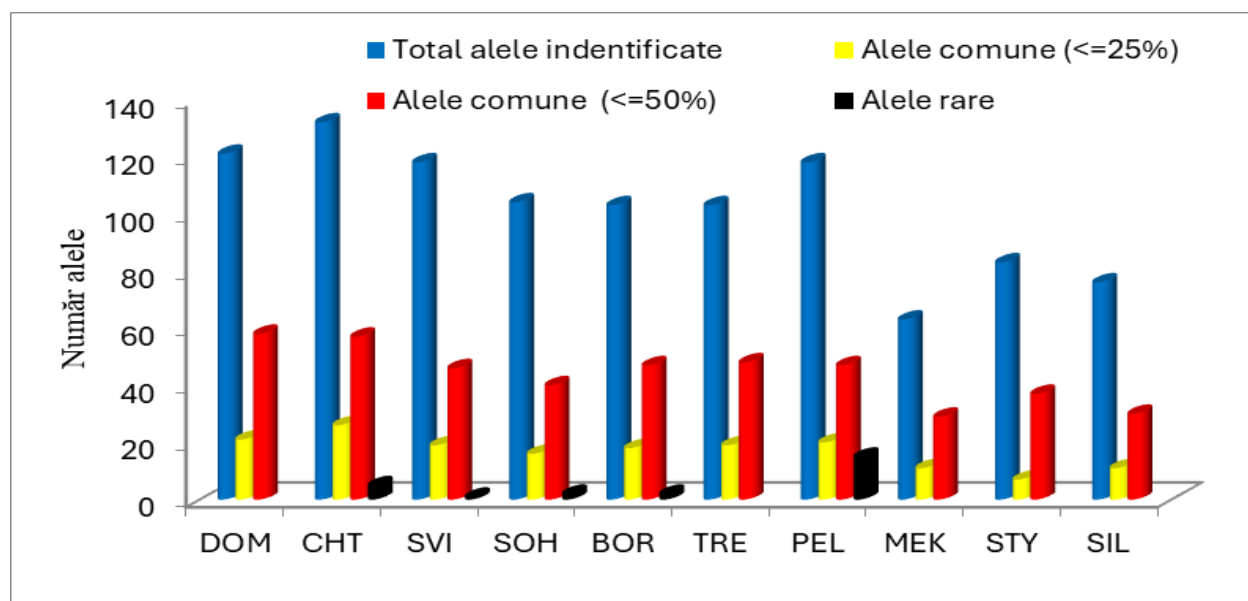


Figura 5.2. Distribuția frecvențelor relative a alelor comune / private în populațiile de pin negru analizate

Diferențierea genetică între populații

Analiza AMOVA, pe baza indicilor de fixare ai lui Wright ($F_{ST} = 0,045$, $F_{IS} = -0.094$ și $F_{IT} = -0.046$) (Tabelul 5.3), a arătat că doar 4% din variația observată este datorată diferențelor între populații, în timp ce 96% din variație a fost atribuită variației în interiorul indivizilor din cadrul populațiilor. Divergența genetică între populații a fost investigată suplimentar prin calcularea unei matrice a indicelui F_{ST} pentru fiecare pereche de populații (Figura 5.3).

Tabelul 5.3. Analiza moleculară a varianței

Sursa variației	df	SS	MS	Est. Var.	%
Între populații	9	197.603	21.956	0.172	4%
Între indivizi	535	1789.629	3.345	0.000	0%
La nivel de individ	545	2203.000	4.042	4.042	96%
Total	1089	4190.232		4.214	100%
F-Statistics	Valoare				
F_{ST}	0.045				
F_{IS}	-0.094				
F_{IT}	-0.046				

Abrevieri: (df) grade de libertate; (SS) suma pătratelor; (MS) media pătratelor; (Est. Var.) varianța estimată a componentelor; (%) procentul varianței totale; *** = $p < 0.001$

Valorile multilocus ale indicelui F_{ST} au fost de 0.011 (DOM și STY) și 0.066 (PEL și MEK). Un nivel scăzut de diferențiere ($F_{ST}=0.016$) genetică a fost observat între 3 populațiile din ssp. *banatica* (DOM, CHT și BOR).

DOM	0.000										
CHT	0.016	0.000									
SVI	0.016	0.020	0.000								
SOH	0.021	0.019	0.023	0.000							
BOR	0.022	0.021	0.024	0.026	0.000						
TRE	0.016	0.017	0.022	0.021	0.031	0.000					
PEL	0.037	0.031	0.036	0.041	0.046	0.038	0.000				
MEK	0.032	0.041	0.034	0.042	0.035	0.048	0.066	0.000			
STY	0.011	0.020	0.021	0.027	0.025	0.022	0.042	0.025	0.000		
SIL	0.027	0.030	0.034	0.036	0.038	0.027	0.044	0.054	0.032	0.000	
	DOM	CHT	SVI	SOH	BOR	TRE	PEL	MEK	STY	SIL	

Figura 5.3. Matricea indicelui de diferențiere genetică F_{ST} pentru fiecare pereche de populații

Analiza coordonatelor principale (PCoA), redă reprezentarea spațială a distanțelor genetice relative între populații. Astfel, în Figura 5.4 se poate observa faptul că primele două componente principale au explicat 30.08% și, respectiv, 15.14% din variația totală. Prima coordonată principală a separat populațiile SVI, BOR, SOH, CHT, TRE și SIL de celelalte patru populații. Aceasta arată o grupare mai specifică pentru ssp. *banatica*. A doua coordonată principală a separat populațiile MEK, STY, PEL și DOM de restul populațiilor analizate.

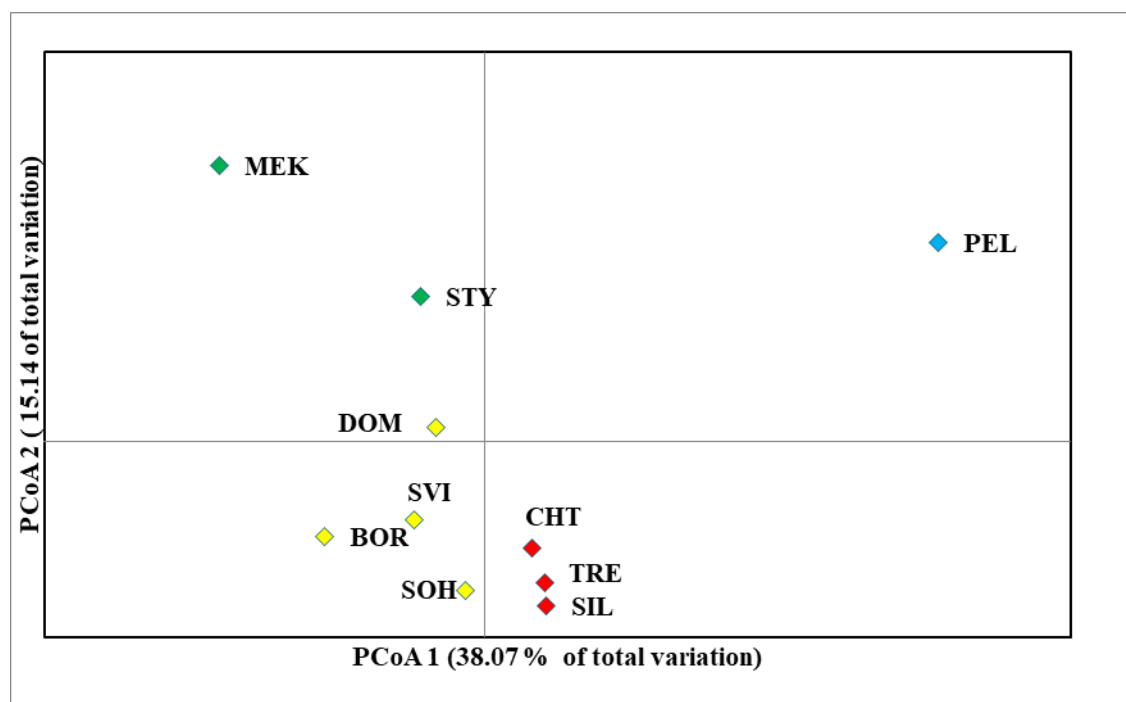


Figura 5.4. Analiza coordonatelor principale pentru cele 10 populații de pin negru analizate

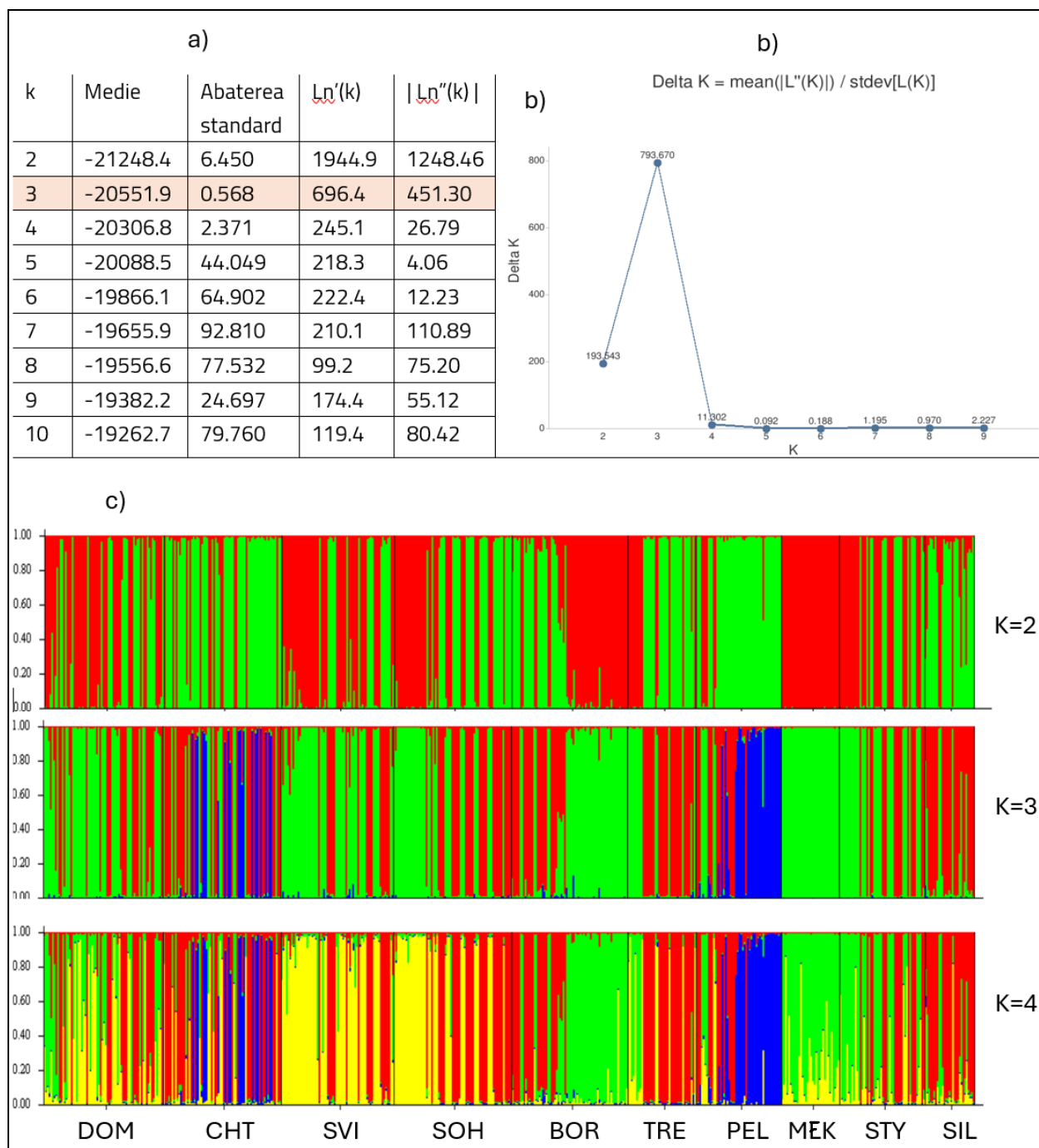
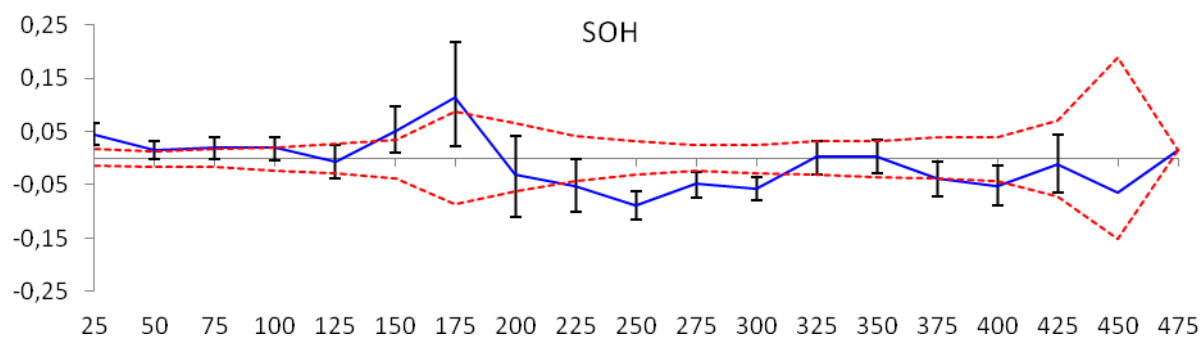
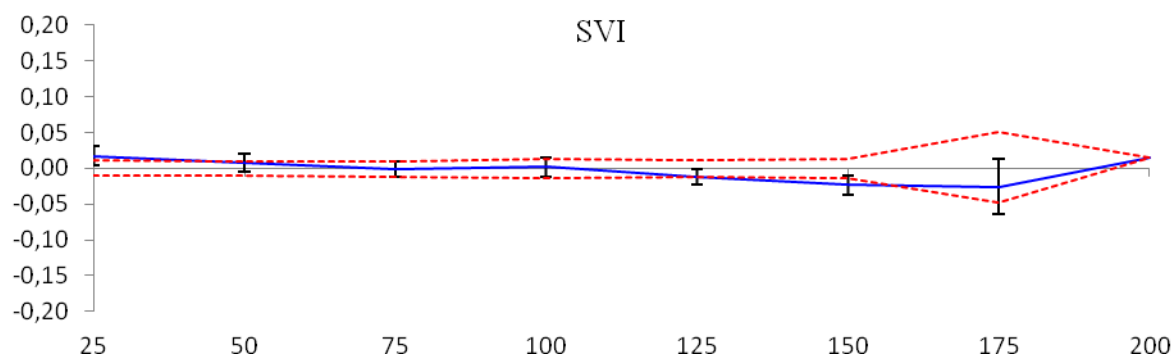
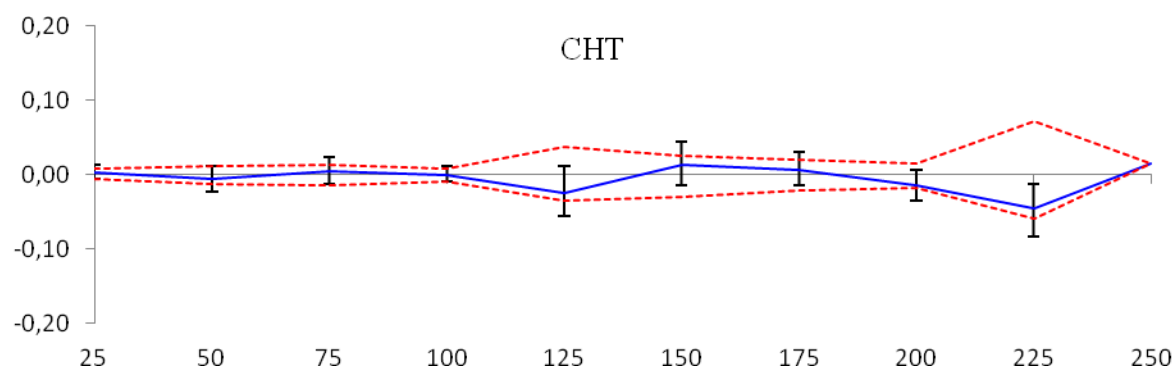
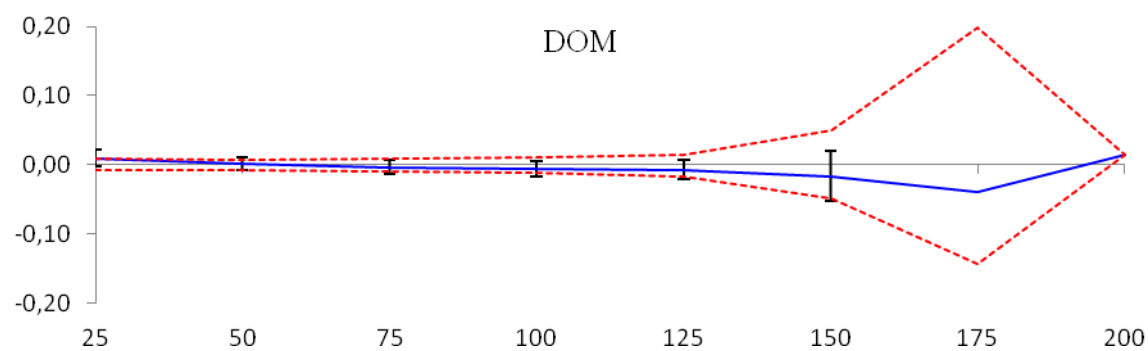


Figure 5.5. Rezultatele analizei STRUCTURE. (a) Probabilitățile logaritmice și valorile ΔK pentru K de la 2 la 9. (b) ΔK - bazat pe rata de schimbare a probabilității logaritmice a datelor între valori succesive ale lui K (c) Rezultatele alocării individuale pentru K = 2, 3 și 4. Fiecare bară verticală reprezintă un individ, iar proporția culorilor corespunde probabilității de alocare la unul dintre clusterelor genetice.

Cei nouă markeri SSR au fost folosiți pentru a determina structura genetică a celor 10 populații de pin negru. Graficul distribuției valorilor medii ΔK (Evanno et al., 2005), pentru K variind de la 1 la 10, sunt redată în figura 5.5 (b). O structură cu trei clustere a avut cel mai puternic suport statistic în eșantionul analizat. Următoarele valori de referință au fost pentru 2 respectiv 4 clustere. Pentru $k=3$ a fost individualizat un prim grup pentru majoritatea populațiilor din subspecia *banatica* (DOM, SVI, BOR și SOH) și cele două populații din subspecia *nigra* (STY și MEK), un al doilea grup format din populațiile TRE (ssp. *banatica*) și SIL (ssp. *laricio*) și cel de-al treilea grup care individualizează populația PEL (ssp. *pallasiana*). În populația CHT, proporția de apartenență a indivizilor la cele trei clustere este variabilă, aproximativ 48% dintre aceștia fiind incluși în cel de-al doilea grup, 29% în primul grup și 23% în cel de-al treilea grup. Pentru $k=2$ distingem două clustere, în primul grup de culoare verde au fost grupate 4 dintre populații (TRE, CHT, PEL și SIL) iar în al doilea grup celelalte populații. Pentru $k=4$ cele mai bine conturate ca și entități sunt populațiile MEK (ssp. *nigra*) și PEL (ssp. *pallasiana*). De asemenea se observă o structură genetică apropiată pentru populațiile SVI și SOH (ssp. *banatica*).

Structura genetică spațială

Analiza autocorelației spațiale a fost realizată pentru 5 dintre populațiile de pin negru analizate, mai exact pentru populațiile DOM, CHT, SVI, SOH și BOR din ssp. *banatica*. Această analiză a fost efectuată pentru mai multe clase de distanțe egale, în funcție de densitatea și distribuția spațială a arborilor analizați în cadrul celor 5 populații (8 clase de distanță - DOM și SVI, 9 clase de distanță - BOR, 11 clase de distanță - CHT și 19 clase de distanță - SOH). Corelogramele au fost semnificative pentru prima clasă de distanță în populațiile SVI, SOH și BOR (Figura 5.6). Coeficientul de înrudire pentru prima clasă de distanță (0–25 m) a înregistrat valoarea maximă pentru populația BOR. La distanțe mai mari de 100 m, coeficienții de înrudire au devenit negativi în majoritatea populațiilor cu excepția populației SOH. Intensitatea SGS (Sp) a fost semnificativ mai mare în populația BOR comparativ cu restul populațiilor (Tabelul 5.4). Valori negative și semnificative ale pantei regresiei (bF) au fost înregistrate pentru toate cele 5 populații analizate, având valori cuprinse între -0.0023 (CHT) și -0.0273 (BOR).



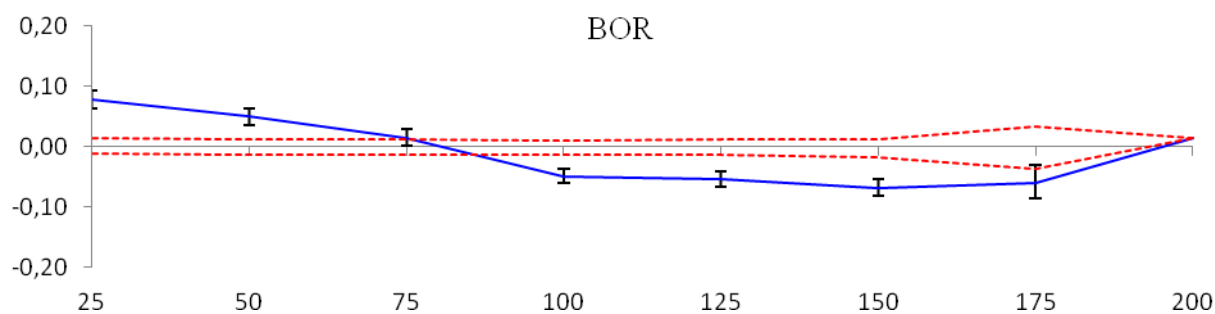


Figura 5.6. Corelograme genetice spațiale pentru populațiile de P.n. ssp. *banatica*. Pe axa y este reprezentat coeficientul de corelație genetică (r), iar pe axa x sunt clasele de distanță (m). Liniile roșii reprezintă Intervalele de încredere (95%) pentru valoarea medie a coeficientului de corelație r .

Tabelul 5.4. Parametrii care descriu structura genetică spațială (F1—media coeficientului de înrudire între indivizii din prima clasă de distanță (0–25 m); bF (b-log)— panta regresiei înruderii față de logaritmul distanței Fij; Sp—intensitatea structurii genetice spațiale)

Population	F1	bF (b-log) ($\pm$ SE)	Sp (95% CI)
DOM	0.0059*	-0.0036**	0.003663
CHT	0.0823**	-0.0023**	0.002610
SVI	0.0104*	-0.0077**	0.007793
SOH	0.0202*	-0.0051**	0.005245
BOR	0.0397*	-0.0273*	0.02851

Abrevieri: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Rezultatele testului pentru determinarea unui posibil efect *bottleneck* au fost redată în Tabelul 5.5. Pentru modelul TPM, programul a detectat, un blocaj semnificativ pentru populațiile DOM, SVI, PEL și STY ($p < 0,05$) iar pentru modelul SMM în populația SOH ($p=0.031$). Cu toate acestea pentru toate populațiile a rezultat o distribuție normală în formă de L a distribuției frecvențelor alelelor (Tabelul 5.5).

Tabelul 5.5. Rezultatele testului *bottleneck* pentru 2 modele de mutații: TPM (Two Phase Mutation Model) și SMM (Stepwise Mutation Model)

Populație	Test de semnificație		Distribuția frecvenței alelelor
	Model TPM	Model SMM	
DOM	0.008	0.289	Distribuție normală (<i>normal L-shaped distribution</i>)
CHT	0.236	0.529	
SVI	0.009	0.552	
SOH	0.211	0.031	
BOR	0.065	0.288	
TRE	0.463	0.539	
PEL	0.009	0.188	
MEK	0.010	0.454	
STY	0.008	0.532	
SIL	0.222	0.552	

Discuții

Diversitatea genetică și structura populațională a populațiilor de pin negru din diferite regiuni geografice au fost evaluate pe baza polimorfismului a 9 microsateliți nucleari. Populațiile analizate prezintă o diversitate genetică medie ridicată ($H_e = 0.806$). Cea mai mare diversitate genetică a fost observată în populația PEL ($H_e = 0.877$), situată în Grecia (ssp. *pallasiana*), în timp ce cea mai scăzută diversitate genetică (0.771) a fost detectată în populația MEK din Austria (ssp. *nigra*). În alte studii pentru populații de pin negru din Portugalia (Dias et al., 2020), Franța (Scotti, 2019) sau Italia (Bonavita et al., 2016) diversitatea genetică a avut valori medii mai mici de 0.74, 0.72 respectiv 0.67. Valori reduse ale H_e (0.183) au fost observate și în populațiile din Balcani, probabil din cauza utilizării unor markeri mai puțin variabili și/sau monomorfi dezvoltati anterior pentru alte specii de pini (Šarac et al., 2015). Giovannelli et al., 2017, într-o cultură de proveniențe de pin negru, au obținut o valoare a H_e (0.67) similară cu cea raportată în acest studiu. Populațiile din România (ssp. *banatica*) au înregistrat valori mai mari la majoritatea parametrilor genetici analizați (exceptând heterozigoția observată) comparativ cu populațiile din celelalte regiuni geografice. Cu toate că, pinul negru de Banat are în România o distribuție fragmentată și o arie de răspândire restrânsă, diversitatea genetică a populațiilor naturale de pin negru de Banat (0.813) este mai mare față de cea estimată în populațiile naturale de pin silvestru (0.697) din această regiune (Șofletea et al., 2020). Pe lângă heterozigoția așteptată, care este importantă pentru adaptarea pe termen lung a populațiilor, bogăția alelică reprezintă, de asemenea, un estimator semnificativ al diversității genetice la nivelul populațiilor, mai ales atunci când populațiile analizate au un număr diferit de indivizi (Porth și El-Kassaby, 2014). Rezultatele au arătat că cea mai mare valoare a bogăției alelice a fost observată într-una

dintre populațiile de pin negru de Banat (CHT) ($A_R = 12.410$), în timp ce cea mai mică valoare a fost detectată într-o populație de pin negru austriac (MEK) ($A_R = 6.780$). Aceste rezultate confirmă potențialul adaptativ al acestei specii. În toate populațiile analizate valorile indicelui de consangvinizare F au fost negative, ceea ce indică un exces de heterozigoți. Acest exces este adesea asociat la speciile de conifere cu un proces de selecție care favorizează indivizii heterozigoți datorită avantajelor adaptative pe care le oferă (Garcia Gil et al., 2015).

AMOVA a arătat că doar 4% din variația genetică totală a fost atribuită diferențierii între populații, chiar și în condițiile în care acestea sunt foarte îndepărtate geografic și sunt încadrate taxonomic diferit. O diferențiere genetică scăzută (5%) a fost observată și pentru alte populații de pin negru (Giovannelli et al., 2017). Probabil, fluxul genetic liber pe arii extinse, fără bariere geografice semnificative, poate avea un efect de uniformizare a fondului de gene. Datorită polenizării prin vânt, speciile de rășinoase prezintă adesea un flux genetic ridicat între populații și, ca urmare, un nivel scăzut de diferențiere genetică (Petit et al., 2005). Cele mai mici valori pentru F_{ST} au rezultat pentru cele 3 populații de pin negru de Banat (DOM, CHT și BOR). Acesta indică existența unui flux genetic intens între cele trei populații, lucru favorizat și de apropierea geografică dintre acestea. Totodată, este cunoscut faptul că distribuția fragmentată a speciei poate contribui la o variație genetică ridicată intra-populațională (Afzal-Rafii și Dodd, 2007).

Diferențierea genetică între populații a reliefat valori mai mari între populația din Peloponez, raportată la ssp. *pallasiana*, și populațiile de pin negru de Banat. Între populația STY din Bulgaria, raportată la ssp. *nigra*, și populațiile de pin negru de Banat valorile F_{ST} au fost relativ mici, indicând un grad mare de asemănare genetică a acestora, poate chiar apartenență la același infrataxon. În schimb, diferențierea genetică a fost mai mare între o altă populație raportată la ssp. *nigra* (MEK – din Austria) și cele de pin negru de Banat.

Divergența genetică între populația de ssp. *pallasiana* și celelalte populații/subspecii a fost reliefată prin analiza coordonatelor principale. Pe de altă parte, această analiză indică, de asemenea, diferențierea între populațiile de ssp. *banatica* și cea de ssp. *nigra* din Austria. În analiza coordonatelor principale, contrar așteptărilor, a rezultat alăturarea populației de ssp. *laricio* (din sudul Italiei) de cele de ssp. *banatica*. Considerăm că acest lucru ar fi fost influențat de numărul mic de probe (29) analizate din populația SIL; totuși, valorile F_{ST} dintre această populație și cele de pin negru de Banat au fost relativ mari, comparabile cu cele dintre ssp. *banatica* și ssp. *nigra*.

Pe de altă parte, atât rezultatele pentru indicii F_{ST} , cât și cele din analiza cluster nu susțin ipoteza apartenenței populațiilor naturale autohtone de pin negru la ssp. *pallasiana*, emisă de Boșcaiu și Boșcaiu (1999). În același context, aceleași analize sugerează un anumit nivel de divergență între ssp. *nigra* și ssp. *banatica*, deși date din literatură (Giovannelli et al., 2017 și Scotti-Saintagne et al., 2019) încadrează populațiile naturale din România la ssp. *nigra*. Concluzia din aceste lucrări se bazează pe probe din câte o singură populație și număr

relativ mic de probe/populație, așa încât, considerăm că elucidarea acestui aspect impune un studiu mai amplu.

Analiza bayesiană, a reliefat cel mai mare suport statistic pentru existența a 3 grupuri genetice distincte. Deși structura genetică identificată pentru cele 3 grupuri nu permite diferențierea clară la nivel de subspecie sau regiune geografică, marea majoritate a populațiilor de pin negru de Banat au fost grupate în același cluster. Aceasta poate fi datorată pe de o parte eterogenității habitatului (altitudine, aspect de versant, umiditate etc.), iar pe de altă parte existenței unui refugiu glaciatic. Totodată, trebuie luat în considerare faptul că datorită polenizării prin vânt și fluxului de gene prin polen pe distanțe mari există o predispoziție de a forma unele structuri genetice relativ omogene (Bogunic et al., 2007). De asemenea, cercetările anterioare au raportat că distribuția fragmentată a pinului negru a contribuit la o variație intra-populațională ridicată, generând probleme taxonomice, în special la nivel infraspecific (Afzal-Rafii și Dodd, 2007).

Analiza autocorelației spațiale a reliefat o structură genetică semnificativă pentru 3 dintre populațiile de pin negru de Banat. Structura genetică spațială este influențată de numeroși factori ecologici și evolutivi, cum ar fi sistemul de încrucișare, fluxul de gene, densitatea populațiilor și procesele demografice. Corelogramele genetice spațiale indică o variație genetică puternic distribuită la nivel local, cu o scădere rapidă a coeficienților de înrudire la distanțe de peste 100 m. Acest fenomen reflectă un echilibru între panmixie și izolarea prin distanță, un lucru frecvent întâlnit la speciile forestiere adaptate la habitate izolate (Loiselle et al., 1995). SGS ne semnificative pentru populațiile DOM și CHT se datorează cel mai probabil unor incendii semnalate la nivelul acestor populații în trecut (conform planului de Management). Scăderea dimensiunii populației în timp, cauzată de selecția naturală, poate duce la o reducere treptată a intensității SGS (Vekemans și Hardy, 2004).

Analizele pentru identificare unor posibile efecte bottleneck au arătat semnale de constrângeri genetice în anumite populații (DOM, SVI, PEL, STY și SOH), subliniind vulnerabilitatea acestor populații la diverse perturbări ecologice. Totodată, dată fiind distribuția normală a frecvențelor alelice, putem presupune că populațiile analizate sunt panmictice; fenomen cunoscut pentru speciile cu polenizare anemofilă, fluxul de gene pe distanțe mari contribuind la o panmixie pronunțată și la o variabilitate genetică semnificativă în populații (Savolainen et al., 2007).

Concluzii

Au fost utilizați 9 markeri nSSR pentru a estima diversitatea genetică și structura populațională în cadrul a 10 populații naturale de pin negru din diferite regiuni geografice. S-a constatat că nivelul diversității genetice în populațiile de pin negru este ridicat, iar diferențierea genetică este redusă, dar nu suficientă pentru a exclude stratificarea unor unități taxonomice intraspecifice, în ciuda faptului că studiul a acoperit o mare parte din

subspeciile pinului negru. De asemenea, a fost identificată o structură genetică specifică pentru ssp. *banatica*, ceea ce indică o origine diferită a acestor populații și susține ipoteza existenței unui refugiu pleistocen în această regiune. Rezultatele pot fi utilizate pentru monitorizarea pe termen lung a resurselor genetice forestiere ale pinului negru în România și pot oferi direcții pentru studii viitoare privind genetica populațiilor și programele de ameliorare.

Capitolul 6. Evaluarea diversității genetice și a structurii unor plantații de duglas (*Pseudotsuga menziesii*) din România

Introducere

Compoziția și distribuția actuală a ecosistemelor forestiere la nivel global este rezultatul proceselor naturale și al acțiunilor umane. De-a lungul timpului, din motive economice sau ecologice, oamenii au contribuit la transferul materialelor forestiere de reproducere și la introducerea unor specii alohtone în zone aflate în afara distribuției lor naturale. Plantarea de specii alohtone de arbori, având în vedere provocările actuale și viitoare ale schimbărilor climatice, a fost propusă ca una dintre strategiile care ar putea sprijini adaptarea ecosistemelor forestiere europene (Aitken et al., 2008; Bolte et al., 2009; Chakraborty et al., 2016; Hamann și Wang, 2006). De obicei, introducerea de specii alohtone (non-native) poate duce la o adaptabilitate scăzută, în principal din cauza unei diversități genetice reduse sau a factorilor genetici evolutivi (Dlugosch și Parker, 2008). Astfel, cunoașterea nivelului de diversitate genetică și a potențialului adaptiv al acestor specii de arbori non-nativi este importantă atunci când se iau în considerare ca surse posibile de materiale forestiere de reproducere (Finkeldey și Hattemer, 2007).

Duglasul (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) este, în prezent, cea mai cultivată specie alohtonă de arbori din Europa (Alizoti et al., 2022; van Loo et al., 2019). Este considerată a fi una dintre cele mai importante specii alohtone din punct de vedere economic în Europa Centrală (Schmid et al., 2014), datorită productivității sale ridicate și calității remarcabile a lemnului. Această specie a fost introdusă în Europa acum aproximativ 150 de ani, pentru beneficii economice, ecologice sau sociale, și în prezent acoperă mai mult de 0,8 milioane ha (Brus et al., 2019; Nicolescu et al., 2023; Spiecker et al., 2019). Duglasul este originar de pe coasta de vest a Americii de Nord. În aria sa naturală, este reprezentat de două subspecii: *glauca*, care crește în interiorul continentului, în Munții Stâncoși, și *menziesii*, care crește pe coasta Pacificului, această ultimă subspecie fiind cea care a fost plantată în principal în Europa (Lavender și Hermann, 2014). Motivul alegerii acestei subspecii a fost că această subspecie de coastă s-a dovedit a fi mai productivă decât cea din interiorul continentului. Totuși, subspecia de coastă s-a dovedit a fi mai puțin tolerantă la secetă decât cea de interiorul continentului, un aspect important care trebuie luat în considerare având în vedere provocările actuale și viitoare ale schimbărilor climatice (Eilmann et al., 2013).

În România, duglasul a fost introdus pentru prima dată în 1887 în partea estică a țării (i.e., Ocolul silvic Fântânele). Un an mai târziu, această specie a început să fie plantată și în partea de vest a țării (i.e., Ocolul silvic Lugoj). Până în 1948, suprafața plantațiilor de duglas a ajuns la 59 ha, plantațiile fiind realizate la altitudini cuprinse între 120 și 1400 m, în diferite condiții staționale (Popa-Costea, 1973). Înainte de 1948, originea semințelor sau a puieților

de duglas, utilizați pentru înființarea plantațiilor, era în mare parte necunoscută. Se știe doar că primii puieti au fost aduși din Wissenberg (Austria). Totuși, se consideră că aceste materiale reproductive proveneau din locații situate la altitudini joase din statul Washington (SUA). După 1956, suprafața plantațiilor de duglas, folosind cantități mari de semințe importate din SUA, a crescut de la 421 ha în 1960 la 2960 ha în 1964, iar între 1960 și 1970 au fost plantate 23.582 ha (Popa-Costea, 1973). Conform lui Popa-Costea (1973), au fost utilizate 14 proveniențe de duglas în această a doua etapă de împădurire din România. Importanța acordată duglasului în anii 1960 poate fi subliniată prin înființarea a nouă culturi comparative de proveniență, în care au fost testate 11 din cele 14 proveniențe importate (i.e., cinci din statul Washington, patru din statul Oregon și două din Columbia Britanică). În plus, au fost de asemenea testate trei dintre proveniențele utilizate în primele plantații de duglas din România (Aleșd, Nădrag și Dofteana). Toate aceste informații au servit ca bază pentru stabilirea unor recomandări referitoare la utilizarea materialelor forestiere de reproducere pentru duglas. Deși această specie a fost neglijată în ultimele 3-4 decenii, în contextul actual al schimbărilor climatice și având în vedere importanța sa economică, devine esențial să se cerceteze diversitatea genetică a speciei în România, un domeniu încă insuficient explorat.

În ultimele decenii, au fost realizate o serie de studii privind: variație genetică între și în interiorul varietăților de duglas (Fussi et al., 2013; Milenkova et al., 2018; van Loo et al., 2015); compararea diversității genetice a plantațiilor europene cu populațiile native din America (Eckhart et al., 2017; Konnert și Ruetz, 2006); diversitatea genetică și structura genetică a acestora în diferite țări europene (Guziejko et al., 2024; Neophytou et al., 2020); cunoașterea originii plantațiilor din Europa sau a proveniențelor utilizate pentru înființarea acestora (De Rogatis et al., 2024; Hintsteiner et al., 2018; Neophytou et al., 2022).

Obiectivele principale ale acestui studiu au fost evaluarea diversității genetice și a structurii populaționale a șapte plantații tinere de duglas din România, pentru a estima valoarea genetică a acestora în contextul schimbărilor climatice. Întrebarea principală a fost dacă structura genetică a populațiilor actuale de duglas reflectă diversitatea presupusă a originii principale a acestor populații sau dacă aceasta se aliniază cu structura genetică a populațiilor locale de primă generație.

Material și metode de cercetare

Populațiile studiate și eșantionarea

Pentru acest studiu, au fost colectate ace sau probe de cambiu de la 137 de arbori de duglas, din 7 populații din România (Tabelul 6.1). Trei populații sunt situate în partea vestică a țării (W-AL, Ana Lugojana; W-RM, Rusca Montană; W-OR, Oțelu Roșu), două în partea de sud (S-PV, Polovragi; S-VL*, Vâlcea), una în partea centrală (C-BV, Brașov) și una în partea de est (E-BC*, Bacău). Vârsta arborilor din care au fost recoltate probele a fost cuprinsă între 39 și 55 de ani pentru 130 dintre aceștia, iar pentru 7 arbori (adică populația E-BC*) vârsta a fost

de 105 / 110 ani (Tabelul 6.1) (conform amenajamentului silvic). Populațiile de duglas studiate sunt fie mixte (cu *Picea abies* (L.) Karst. și *Abies alba* Mill.: W-AL, W-OR, W-RM, C-BV, S-VL*; cu *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. și *Acer pseudoplatanus* L.: E-BC*), fie pure (S-PV). Acele au fost recoltate cu ajutorul unei foarfece telescopice, iar cele de cambiu cu un perforator pentru piele. Trebuie menționat faptul că probele de cambiu au fost colectate doar atunci când acele nu erau accesibile.

Tabelul 6.1. Caracteristicile principale ale celor șapte populații de duglas luate în considerare pentru acest studiu

Populația	Abreviere	Latitudine	Longitudine	Nr. de probe	Vârstă	Altitudine	Suprafață (ha)
Rusca Montana	W-RM	45.56741	22.45816	25	45	653-795	19.08
Otelul Roșu	W-OR	45.50105	22.36805	25	48	729-940	11.79
Ana Lugojana	W-AL	45.70618	22.25637	25	39	1018-844	64.02
Polovragi	S-PV	45.18688	23.80119	25	55	610-850	58.09
Brașov	C-BV	45.54645	25.76663	25	55	873-903	23.04
Bacău*	E-BC	46.37725	26.52118	7	110	370-380	0.95
Vâlcea*	S-VL	44.99654	24.38414	5	50	450-500	1.30

* exemplare izolate (dimensiunea eșantionului < 10, toți arborii din această zonă au fost selectați); suprafața – conform amenajamentului

Extragerea ADN-ului, reacția PCR și secvențierea

ADN-ul a fost extras din ace sau cambiu folosind metoda CTAB (Doyle și Doyle, 1990). Concentrația și puritatea ADN-ului au fost determinate spectrofotometric cu ajutorul NanoDrop™ 8000 (ThermoFisher Scientific). Toate probele au fost genotipate utilizând zece microsateliți nucleari (nSSR) - PmOSU_1F9, PmOSU_3G9, PmOSU_2D4, PmOSU_3F1, PmOSU_3B2, PmOSU_3B9, PmOSU_3D5, PmOSU_4A7, PmOSU_2G12, PmOSU_5A8 (Slavov et al., 2004) și 3 microsateliți cloroplastici (cpSSR) - Pt26081, Pt71936, Pt63718 (Vendramin et al., 1996). Amplificarea microsateliților a fost realizată într-un volum de reacție de 10 μl care conținea 5 μl Qiagen Master Mix, 1.5 μl amestec de markeri, 0.5 μl soluție Q și 2 μl ADN. Reacția PCR a fost realizată pe un thermal cycler Eppendorf și a presupus o etapă inițială de denaturare la 95°C timp de 5 minute, urmată de 30 de cicluri: la 95°C timp de 30 s, 52–54°C timp de 1.30 min și 72°C timp de 30 s și o ultimă etapă de extensie la 60°C timp de 30 minute. Electroforeza capilară a fost realizată pe un secvențiator automat de ADN, Beckman Coulter.

Analiza datelor

În analizele genetice la nivel nuclear au fost utilizate datele provenite de la 125 sau 137 de arbori (arborii din populațiile E-BC și S-VL fiind utilizați doar pentru analizele STRUCTURE și DPAC). Pentru markerii cloroplastici, un total de 52 de arbori au fost genotipați (câte 8 arbori din fiecare populație; respectiv, 7 arbori din populația E-BC* și 5 arbori din populația S-VL*).

Pentru testare privind prezența alelelor nule și posibile erori de identificare provenite din dispariția alelelor mari și de prezența benzilor de tip *stutter* ale microsateliților, a fost utilizat software-ul Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004). Pentru markerii nucleari (nSSR), indicii de diversitate genetică (numărul de alele (Na), numărul efectiv de alele (Ne), numărul de alele private (Np), heterozigoția așteptată (He), heterozigoția observată (Ho), coeficientul de consangvinizare (F_{IS})) au fost calculați pentru fiecare populație folosind programul GenAlEx v.6.51b2 (Peakall și Smouse, 2012, 2006). Pentru markerii cloroplastici (cpSSR), numărul de haplotipuri din fiecare populație (A), numărul efectiv de haplotipuri (Ne), numărul de haplotipuri private (P), bogăția haplotipică (Rh), diversitatea haplotipică (He) și distanța genetică medie între arbori (D^2sh) au fost calculați folosind programul Haplotype Analysis 1.05 (Eliades și Eliades, 2009):

Software-ul Population 1.2.32 (Langella, 1999) a fost utilizat pentru a construi dendrograma UPGMA (metoda grupului neponderat de medii aritmetice) bazată pe distanțele genetice Nei în pereche. Software-ul Treeview (Page, 2003) a fost ulterior utilizat pentru a vizualiza arborele filogenetic rezultat din analiza UPGMA (dendrograma).

Metoda de grupare bayesiană inclusă în software-ul STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000) a fost utilizată pentru a evalua structura genetică a populațiilor. Structura genetică a populațiilor a fost analizată fără informații anterioare privind locațiile de eșantionare, modelul *admixture* și frecvențele alelice corelate. Au fost realizate cinci rulări pentru fiecare valoare a posibilelor clustere genetice (K), cu K variind de la 1 la 7, folosind 100000 de iterații „burn-in” și 500000 de iterații MCMC. Valoarea optimă a lui K a fost evaluată pe baza metodei logaritmice ($\ln Pr(X|k)$) și a metodei Δk (Evanno et al., 2005), folosind programul STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 (Earl și vonHoldt, 2012).

O analiză discriminantă a componentelor principale (DAPC) folosind pachetul R *adegenet* a fost utilizată pentru a observa variabilitatea generală a genotipurilor pe cele mai informative două axe ale componentelor principale (PCs).

Relația dintre haplotipurile identificate cu ajutorul markerilor cpSSR a fost construită folosind metoda Median-Joining (Bandelt et al., 1999) implementată în software-ul Network 10 (<https://www.fluxus-engineering.com/>). Harta structurilor genetice și distribuția haplotipurilor a fost realizată cu software-ul Qgis 3.22 (<http://www.qgis.org>). Pentru a evalua nivelurile de diferențiere genetică, s-a realizat o analiza moleculară a varianței

(AMOVA) și s-a calculat matrice de diferențiere a indicelui F_{ST} între populații (doar pentru markerii nSSR) utilizând software-ul ARLEQUIN (Excoffier și Lischer, 2010).

Rezultate

Variabilitatea genetică în cadrul populațiilor evaluată cu ajutorul markerilor nucleari

Parametrii diversității genetice intrapopulaționale au fost calculați doar pentru 125 de arbori de duglas (E-BC și S-VL au fost excluse din această analiză) din 5 populații (W-RM, W-OR, W-AL, S-PV, C-BV). Rezultatele pentru acești parametri (N_a , N_e , N_p , H_e , H_o , F_{IS}), în cele 5 populații de duglas menționate anterior sunt prezentate în Tabelul 6.2. Numărul mediu de alele per locus (N_a) a variat între 14.500 (W-OR) și 17.200 (S-PV), valoarea medie generală pentru toate cele 5 populații fiind de 15.900. În general, diversitatea genetică a fost ridicată (H_e mediu = 0.879), variind de la 0.870 (W-AL) la 0.891 (S-PV). Heterozigoția observată (H_o) a înregistrat valori cuprinse între 0.724 (W-OR) și 0.830 (S-PV). În general, indicele de fixare (F_{IS}) a arătat valori pozitive mai mici de 0.100, cu excepția populației W-OR, unde valoarea F_{IS} a fost 0.168. Rezultatele analizei matricei indicelui F_{ST} pentru fiecare pereche de populații (Figura 6.1) sugerează diferențe minore între cele 5 populații de duglas, cea mai mare diferențiere genetică fiind găsită între populațiile W-OR și C-BV.

Tabelul 6.2. Parametrii diversității genetice în populațiile de duglas din România, bazate pe analiza markerilor nucleari

Populație	N_a	N_e	N_p	H_o	H_e	F_{IS}
W-RM	15.700	9.451	9.000	0.806	0.876	0.077
W-OR	14.500	9.423	9.000	0.724	0.880	0.168
W-AL	15.200	9.533	8.000	0.777	0.870	0.096
S-PV	17.200	11.271	11.000	0.830	0.891	0.066
C-BV	16.900	10.489	12.000	0.793	0.881	0.090
Mean	15.900	10.033	9.800	0.786	0.879	0.099
SE	0.620	0.542	-	0.016	0.009	0.023

* W-RM, Ruscă Montană; W-OR, Oțelu Roșu; W-AL, Ana Lugojană; S-PV, Polovragi; C-BV, Brașov; N_a , numărul de alele; N_e , numărul efectiv de alele; N_p , numărul de alele private; H_o , heterozigoția observată; H_e , heterozigoția așteptată; F_{IS} , coeficientul de consangvinizare; SE, eroarea standard.

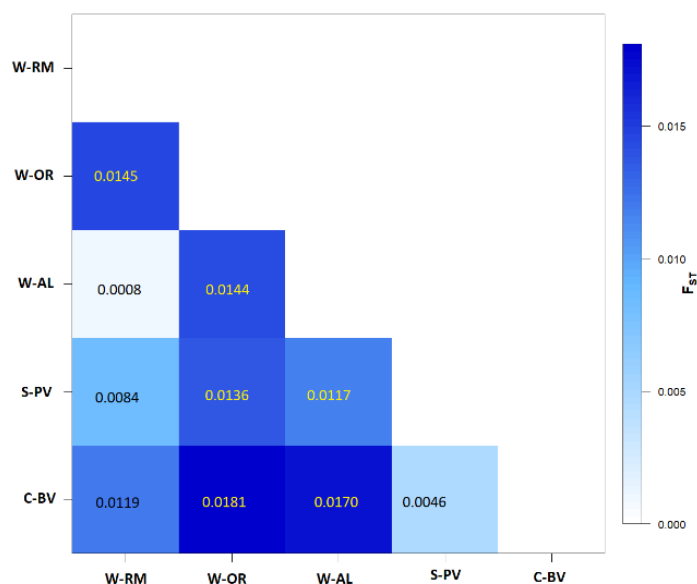


Figura 6.1. Matricea indicelui de diferențiere F_{ST} a perechilor de populații de duglas analizate: W-RM (Ruscă Montană), W-OR (Oțelu Roșu), W-AL (Ana Lugojană), S-PV (Polovragi) și C-BV (Brașov).

Rezultatele analizei UPGMA (Figura 6.2) redau modul de grupare a celor 5 populații de duglas analizate (W-RM, W-OR, W-AL, S-PV, C-BV), pe baza distanței genetice Nei. Acestea au evidențiat o diferențiere clară a celor trei populații din vestul țării (W-RM, W-OR, W-AL) față de celelalte 2 populații din sud (S-PV) și centru (C-BV), cu valori ale bootstrap-ului ridicate (> 50).

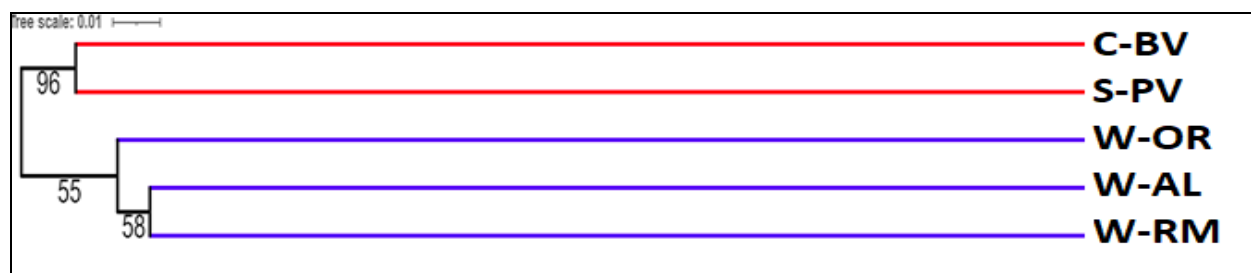


Figura 6.2. Arborele filogenetic UPGMA, bazat pe distanțele genetice Nei pentru cele 5 populații de duglas din România: W-RM (Ruscă Montană), W-OR (Oțelu Roșu), W-AL (Ana Lugojană), S-PV (Polovragi) și C-BV (Brașov).

Variabilitatea genetică în cadrul populațiilor evaluată cu ajutorul markerilor cloroplastici

Au fost observate treisprezece haplotipuri cloroplastice diferite în cadrul celor șapte populații de duglas analizate cu ajutorul a 3 markeri cpSSR. Distribuția geografică a acestor haplotipuri poate fi observată în Figura 6.3. În mod specific, în fiecare populație au fost identificate între trei și șase haplotipuri. Cel mai comun haplotip (H7) a avut o frecvență de 24.54% și a fost observat în toate populațiile analizate. Haplotipurile 6, 8 și 9 au prezentat frecvențe cuprinse între 12.55% și 20.00%. Haplotipul H2 a fost găsit doar în trei populații (W-

OR, C-BV, E-BC*). Haplotipul H10 a avut o frecvență de doar 3,57% și a fost găsit doar în populația C-BV. Haplotipurile rămase (1, 3, 4, 5, 11, 12 și 13) au fost haplotipuri private, prezente doar la un singur arbore. În toate populațiile, numărul efectiv de haplotipuri (N_e) a variat între 5.333 (C-BV) și 2.462 (W-AL). Bogăția haplotipică (R_h) a variat de la 3.286 (C-BV) la 1.607 (W-AL), cu o valoare medie de 2.560 (Tabelul 6.3). Diversitatea medie a haplotipurilor (H_e) a fost de 0.826, înregistrând valori cuprinse între 0.679 (W-AL) și 0.929 (C-BV). Distanța genetică medie între arbori a avut valoarea maximă de 39.048 în populația E-BC*. Nu a fost observată nicio corelație între D^2sh și parametrii diversității genetice (Tabelul 6.3). Altfel spus, populațiile cu valori mai mari ale D^2sh nu au prezentat valori mai mari ale diversității (H_e).

În ceea ce privește relațiile genealogice dintre haplotipuri se poate observa în Figura 6.4 o divergență relativ scăzută între haplotipuri, toate haplotipurile derivând dintr-o variantă centrală. De asemenea această reliefează faptul că haplotipurile au fost distribuite în funcție de proximitatea geografică a populațiilor.

Tabelul 6.3. Parametrii diversității genetice la nivel cloroplastic (cpSSR), în 7 populații de duglas din România (W-RM, Ruscă Montană; W-OR, Oțelu Roșu; W-AL, Ana Lugojana; S-PV, Polovragi; C-BV, Brașov; S-VL*, Vâlcea; E-BC*, Bacău).

Population	N	A	P	N_e	R_h	H_e	D^2sh
W-RM	8	4	0	2.909	2.143	0.750	12.179
W-OR	8	5	2	4.000	2.750	0.857	1.750
W-AL	8	3	0	2.462	1.607	0.679	0.655
S-PV	8	5	2	4.000	2.750	0.857	14.524
C-BV	8	6	2	5.333	3.286	0.929	14.702
E-BC*	7	4	1	3.267	2.381	0.810	39.048
S-VL*	5	4	1	3.571	3.000	0.900	1.400
Mean	-	4.429	1.143	3.649	2.560	0.826	12.037

* numărul de arbori selectați (N), numărul de haplotipuri detectate în fiecare populație (A), numărul efectiv de haplotipuri (N_e), numărul de haplotipuri private (P), bogăția haplotipurilor (R_h), diversitatea haplotipurilor (H_e) și distanța genetică medie între indivizi (D^2sh)

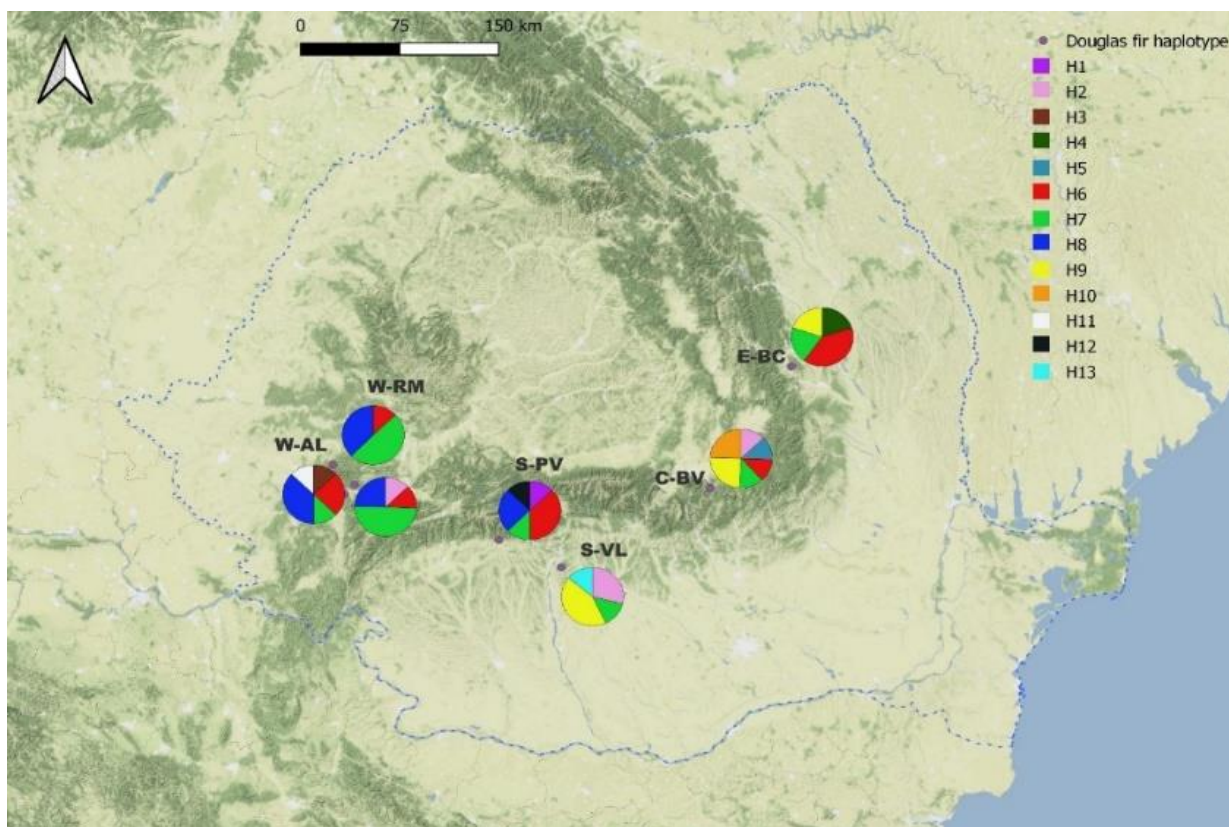


Figura 6.3. Distribuția haplotipurilor în cele 7 populații de duglas din România (W-RM, Ruscă Montană; W-OR, Oțelu Roșu; W-AL, Ana Lugojana; S-PV, Polovragi; C-BV, Brașov; S-VL*, Vâlcea; E-BC*, Bacău). Culoarele variază conform haplotipurilor cloroplastice identificate.

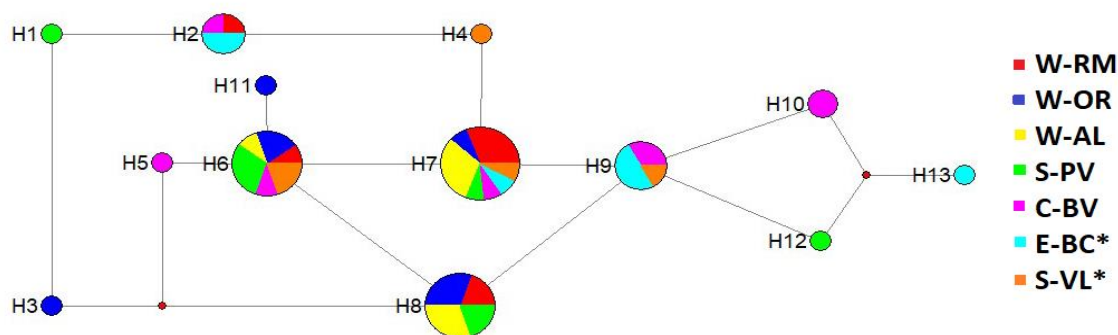


Figura 6.4. Relațiile genealogice dintre haplotipuri. Fiecare cerc reprezintă unul dintre cele 13 haplotipuri cloroplastice observate. Fiecare culoare reprezintă una din cele 7 populații de duglas din România (W-RM, Ruscă Montană; W-OR, Oțelu Roșu; W-AL, Ana Lugojană; S-PV, Polovragi; C-BV, Brașov; S-VL*, Vâlcea; E-BC*, Bacău). Mărimea cercurilor este proporțională cu frecvența haplotipurilor.

Structura genetică a populațiilor

Structura genetică a populațiilor de duglas analizate a arătat că numărul cel mai probabil de clustere (K), determinat prin metoda lui Evanno et al. (2005), a fost egal cu 2 (Figura 6.5 b). Pentru markerii nSSR, rezultatele analizei STRUCTURE sunt prezentate atât pentru K = 2 cât

și pentru $K = 3$ (Figura 6.5 a). Structura populațională în ambele cazuri prezentate a fost o structură populațională relativ omogenă. Rezultate comparabile au fost obținute și pentru markerii cpSSR, cei 52 de indivizi analizați având o structură genetică nediferențiată pe populații (Figura 6.5 c).

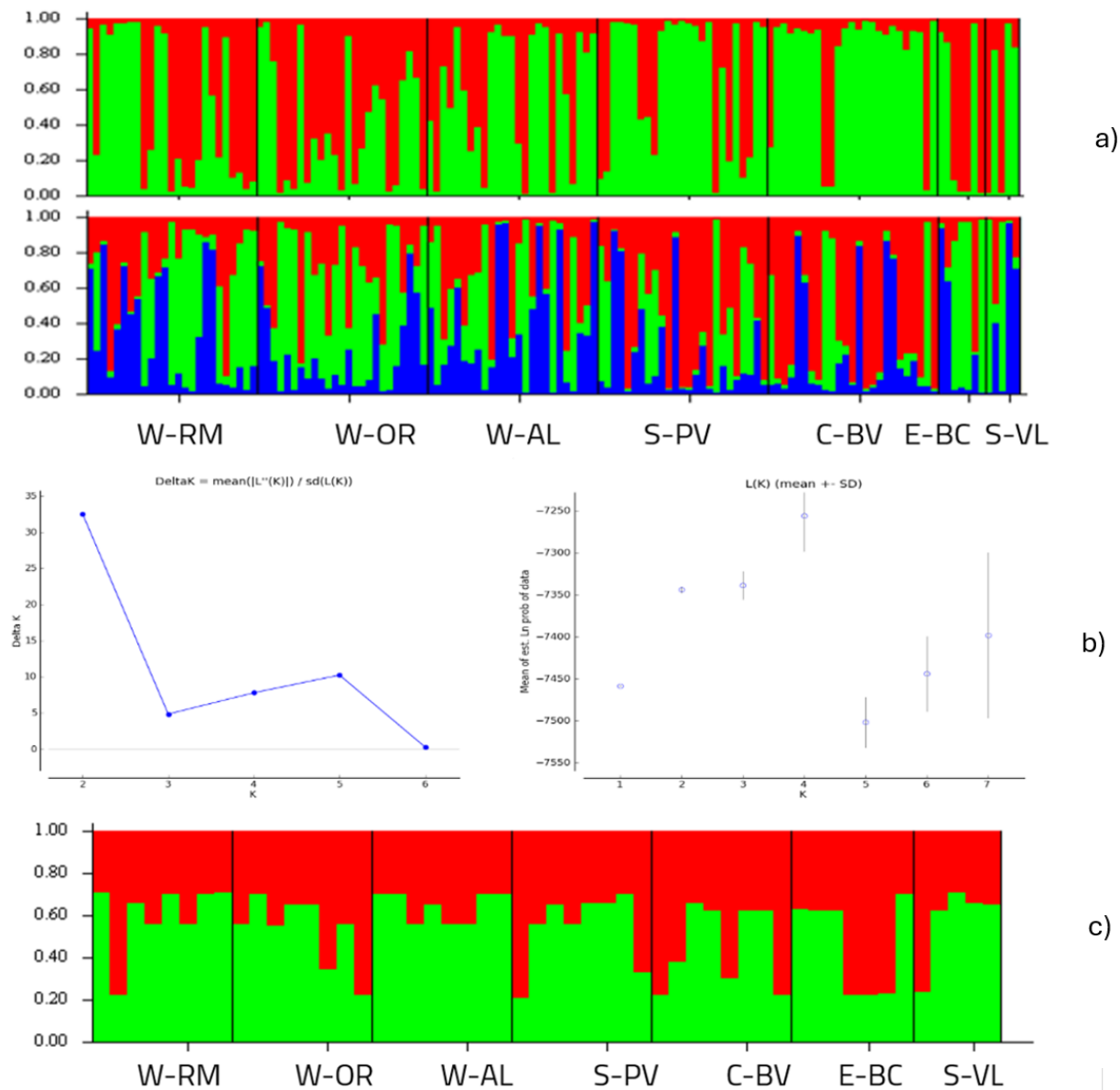


Figura 6.5. Structura genetică pentru 7 populații de duglas din România a) structura estimată pentru $K = 2$ și $K=3$ utilizând markeri nucleari (nSSR) b) cel mai probabil număr de clustere pe baza parametrului Δk c) structura estimată pentru $K = 2$ utilizând markeri cloroplastici (cpSSR).

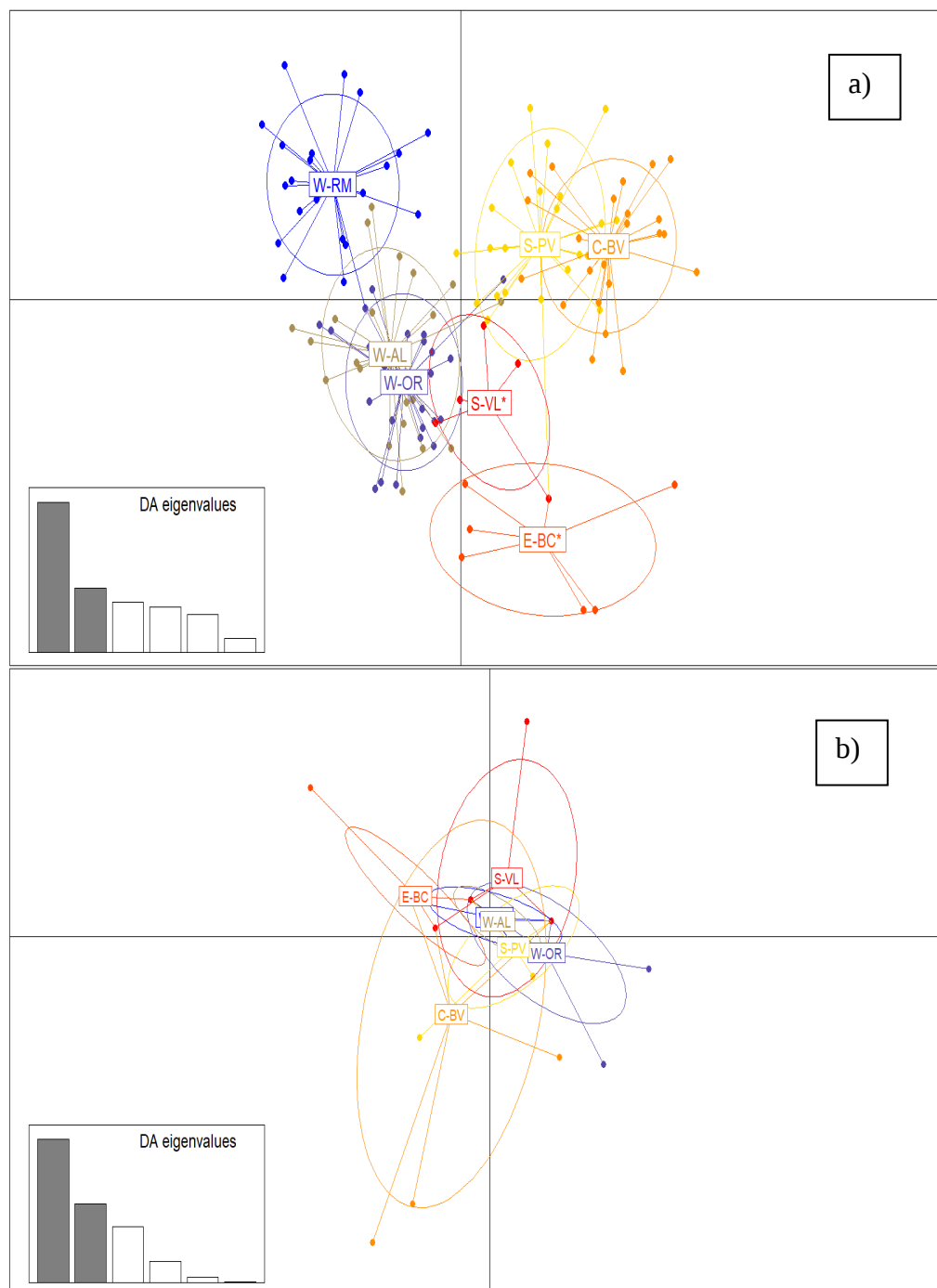


Figura 6.6. Analiza Discriminantă a Componentelor Principale (DAPC) bazată pe (a) zece microsateliți nucleari (nSSR) și (b) trei microsateliți cloroplastici (cpSSR) analizați pentru 7 populații de duglas: W-RM (Rusca Montană), W-OR (Oțelu Roșu), W-AL (Ana Lugojana), S-PV (Polovragi), C-BV (Brașov), S-VL* (Vâlcea) și E-BC* (Bacău).

Analiza discriminantă a componentelor principale (DAPC) a fost realizată pentru toate populațiile eșantionate. Rezultatele analizei discriminante a componentelor principale (DAPC), efectuate pentru cele 7 populații de duglas din România, la nivel nuclear, au arătat că cele trei populații din vest (W-RM, W-OR, W-AL) s-au diferențiat de celelalte patru populații atunci când s-a luat în considerare prima componentă principală (PC1; Figura 6.6). PC1 a

explicat 56,21% din variația totală. La nivel cloroplastic, analiza DAPC realizată pentru cele 7 populații de duglas (Figura 6.6), utilizând 3 markeri cloroplastici, a evidențiat o structură genetică slab definită, fără o apartenență clară a arborilor la populații distincte.

Distribuția variației genetice la nivel nuclear (nSSR) pe baza analizei AMOVA, a indicat că cel mai ridicat nivel al variației genetice a fost înregistrat la nivelul indivizilor, reprezentând 90%, în timp ce 9 % din variație s-a observat între indivizi, iar 1% din variație a fost identificată între populații (Tabelul 6.4). Rezultate similare au fost obținute și pentru markerii cpSSR, cea mai mare parte a variației fiind distribuită în interiorul populațiilor (94%) și doar 6% între populații (Tabelul 6.4).

Tabelul 6.4. Analiza moleculară a varianței (AMOVA), luând în considerare atât microsateliții nucleari (nSSR) analizați, cât și microsateliții cloroplastici (cpSSR)

cpSSR	Sursa variației	df	SS	Varianța estimată.	Procentul de variație(%)
	Între populații	6	3204.591	22.738	6%
	În interiorul populațiilor	45	16458.639	365.748	94%
	Total	51	19663.231	388.486	100%
nSSR					
	Între populații	4	18.872	0.029	1%
	Între indivizi	120	390.960	0.271	9%
	La nivel de individ	125	339.500	2.716	90%
	Total	249	749.332	3.016	100%

Abrevieri: df: grade de libertate, SS: suma pătratelor

Discuții

În acest studiu, au fost analizate șapte populații diferite de duglas din România din perspectiva diversității genetice și a structurii populaționale. În acest scop, au fost utilizați zece markeri nucleari (nSSR) și 3 markeri cloroplastici (cpSSR).

În general, nivelul de diversitate genetică, evaluat prin nSSR, a fost considerat relativ ridicat pentru cinci dintre populațiile analizate (W-RM, W-OR, W-AL, S-PV, C-BV). Rezultate similare au fost obținute anterior în alte studii care s-au axat pe studiul diversității genetice a duglasului în populații naturale. Astfel, s-a constatat că în arboretele naturale valorile heterozigoției observate (H_o) au fost cuprinse între 0.639 și 0.783. Totuși, heterozigoția așteptată (H_e) a înregistrat valori mai mari (0.935 și 0.936) comparativ cu cele găsite pentru cele cinci populații românești (Krutovsky et al., 2009). În schimb, valori ușor mai mici ale heterozigoției observate au fost găsite pentru plantațiile de duglas din Bulgaria (H_o = 0.617 - 0.961) (Milenkova et al., 2018) sau Polonia (H_o = 0.690 - 0.800) (Guziejko et al., 2024). Rezultate similare au fost obținut și în alte studii privind diversitatea genetică a duglasului în

culturi de proveniențe (Neophytou et al. 2016) sau pentru diferite loturi de semințe (Eckhart et al., 2017; Pakull et al., 2021; Wojacki et al., 2019). Diversitatea genetică mai scăzută a populațiilor din vestul României, în special a celei din Oțelul Roșu (W-OR), poate fi pusă pe seama faptului că semințele utilizate pentru înființarea acestei plantații ar fi putut proveni din primele populațiile locale stabilite în vestul României (Nicolescu et al., 2014). Aceste rezultate sunt în concordanță cu recomandările silvice care stabilesc că, pentru realizarea de noi plantații de duglas în România, prioritate ar trebui acordată utilizării semințelor provenite din arboretele deja stabilite aici și, doar ca a doua opțiune, ar trebui utilizate semințe provenite din cele 6 proveniențe din Washington (SUA) sau cele 3 proveniențe din Columbia Britanică (Canada). Astfel, rezultatele din acest studiu indică faptul că, cel puțin în cazul arboretului de la Oțelul Roșu (W-OR), un număr limitat de arbori reproductivi au fost utilizați pentru a stabili aceste arborete mai tinere de duglas analizate (Popa-Costea, 1973). Totuși, pentru o identificare mai precisă a originii acestor arborete mai tinere de duglas, ar fi foarte utilă o analiză comparativă cu eșantioane de referință provenite din testele de proveniență stabilite în perioada 1964-1965.

Diversitatea haplotipică ridicată observată ($H_e = 0.826$) în rândul populațiilor reflectă variabilitatea genetică substanțială prezentă în aceste plantații de duglas, aspect crucial pentru potențialul lor adaptativ în condițiile schimbărilor climatice. Conform așteptărilor, un număr mare de haplotipuri cpSSR a fost detectat (15 variante alelice identificate în 13 haplotipuri cloroplastice diferite) în cele șapte populații de duglas din România. Detectarea a 13 haplotipuri cloroplastice distincte, inclusiv a unor haplotipuri private, evidențiază influența unor linii genetice atât comune, cât și unice, derivate din sursele inițiale de semințe. Un număr mare de haplotipuri, utilizând markeri genetici similari, a fost raportat și în studii anterioare (Gugger et al., 2010; Viard et al., 2001). Dominanța unui haplotip comun (H7) în toate populațiile sugerează o origine comună a materialului reproductiv, probabil dintr-un număr limitat de proveniențe utilizate inițial la realizarea plantațiilor. Distribuția geografică a haplotipurilor și modelele rețelei de haplotipuri susțin ipoteza unui amestec istoric de material genetic înainte de stabilirea plantațiilor, contribuind la omogenitatea genetică observată.

Analizele privind diferențierea genetică și gruparea populațiilor, bazate pe analiza STRUCTURE, nu au indicat o diferențiere clară între populațiile de duglas studiate. În ciuda similitudinii mai mari dintre populațiile S-PV (Polovragi) și C-BV (Brașov), structura la nivelul tuturor populațiilor a fost relativ omogenă. Acest lucru era de așteptat, având în vedere că, cel mai probabil, puietii folosiți pentru realizarea acestor plantații de duglas ar fi putut proveni doar din câteva populații sursă de semințe. Totuși trebuie ținut cont și de faptul că în general speciile de rășinoase prezintă nivelurile scăzute de diferențiere genetică între populații. Conform cercetărilor realizate speciile de rășinoase păstrează cea mai mare parte a variației în cadrul populațiilor, fenomen explicabil dat fiind sistemul de reproducere, fluxul genetic ridicat și distribuția largă (Belletti et al., 2012). Se poate observa însă că indivizii de

duglas din populațiile Polovragi (S-PV) și Brașov (C-BV) au fost atribuiți într-o proporție mai mare unui cluster genetic, în timp ce gradul de amestec genetic a fost mai ridicat pentru populațiile din vest (W-AL, Ana Lugojana; W-RM, Rusca Montană; W-OR, Oțelu Roșu). Studiile privind originea geografică a vechilor arborete de duglas din Europa au indicat că majoritatea acestora provin din aceeași zonă de proveniență (de exemplu, Washington, SUA; Hintsteiner et al., 2018) și aparțin varietății de coastă. Această proveniență deține cea mai mare diversitate genetică (heterozigoție așteptată, bogăție alelică) dintre toate proveniențele de duglas din SUA (van Loo et al., 2015). Conform informațiilor referitoare la organizarea recoltării și comerțului cu semințe în Europa, putem concluziona că materialul forestier de reproducere utilizat inițial în România aparține varietății de coastă. În plus, apartenența la această proveniență a putut fi observată și prin analiza frecvențelor alelice (unele alele specifice absente sau cu frecvențe reduse) la nivelul markerilor PmOSU_3B2 și PmOSU_4A7 (rezultatele nu sunt prezentate), așa cum au arătat alți autori în studii similare (Fussi et al., 2013; Konnert, 2018). Pentru populațiile vestice (W-AL, Ana Lugojana; W-RM, Rusca Montană; W-OR, Oțelu Roșu), caracterizate printr-un grad ridicat de amestec genetic, putem presupune că materialul forestier de reproducere utilizat era deja amestecat înainte de a fi plantat în Europa (van Loo et al., 2019).

Concluzii

Acest studiu oferă prima evaluare a structurii populaționale și a diversității genetice, utilizând microsateliți nucleari și cloroplastici, pentru plantațiile duglas din România. Rezultatele indică un nivel ridicat de diversitate genetică în rândul celor 7 populații de duglas analizate, cu valori ale heterozigoției așteptate comparabile cu cele observate în populațiile europene (i.e., din afara ariei naturale de distribuție) și nord-americane (i.e., din arealul natural). De asemenea, rezultatele obținute au arătat o diferențiere genetică limitată între populațiile studiate, sugerând că materialele forestiere de reproducere utilizate la înființarea plantațiilor au provenit, cel mai probabil, dintr-un număr restrâns de proveniențe, contribuind astfel la o structură genetică relativ omogenă. Diversitatea genetică relativ ridicată și valorile scăzute ale coeficientului de consangvinizare în populațiile analizate indică viabilitatea pe termen mediu și lung a acestora și posibilitatea utilizării lor ca surse de material forestier de reproducere. Aceste cercetări subliniază importanța continuării eforturilor de menținere și creștere a diversității genetice în plantațiile de duglas, mai ales în contextul schimbărilor climatice preconizate. În ansamblu, această cercetare reprezintă un pas important în consolidarea cunoștințelor despre resursele genetice forestiere ale duglasului în România, oferind perspective valoroase care pot ghida viitoarele practici de management a pădurilor, selecția arboretelor sursă de sămânță și strategiile de conservare. Aceste concluzii sunt esențiale pentru susținerea unor ecosisteme forestiere reziliente și adaptabile într-o eră a schimbărilor de mediu.

(B-ii) Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei

1. Introducere

Evoluția mea profesională aș putea spune că a început încă din școala generală, când am constatat că îmi prezintă interes toate informațiile legate de mediul înconjurător și, în special, cele legate de plante și animale. Cu toate că liceul absolvit a fost unul cu profil teoretic, iar specializarea urmată a fost *matematică-informatică*, am continuat să fiu preocupată de ecosistemele naturale, ajungând ca în loc de studii medicale, pentru care mă pregătisem intens, să urmez *Facultatea de Silvicultură și Exploatare Forestiere*. Pot spune că a fost o alegere foarte înțeleaptă, deoarece aici am găsit informații care mi-au stârnit interesul într-un mod deosebit, mai ales că au fost predate de specialiști cu renume în învățământul silvic superior.

Profesionalismul și dăruirea de care am beneficiat din partea cadrelor didactice pe perioada derulării studiilor de licență, iar apoi la masterat și doctorat, m-au făcut să îmi doresc o carieră în învățământul silvic superior, motiv pentru care am urmat și cursurile de pregătire psiho-pedagogică.

Cum studiile nu sunt întotdeauna de ajuns, iar contractele în care am fost implicată, la doctorat și pe perioada angajată ca cercetător, au impus acest lucru, am început să public articole științifice și să particip la o serie de conferințe naționale și internaționale. În plus, eforturile depuse și dorința de a evolua nu au rămas fără ecou, astfel că, prin bunăvoința și încrederea de care m-am bucurat din partea cadrelor didactice ale *Departamentului de Silvicultură* și, în special, din partea cadrelor didactice de la colectivul de *Dendrologie și Genetică forestieră*, am fost implicată mai întâi în activități de cercetare și ulterior în activități didactice.

Toate activitățile desfășurate, chiar dacă au reprezentat provocări la momentul respectiv, mi-au dat oportunitatea de a înțelege mai bine aspectele care definesc cariera didactică din cadrul învățământului superior.

În cele ce urmează sunt prezentate punctual studiile absolvite, activitatea profesională desfășurată până în acest moment și realizările științifice.

1.1. Studiile absolvite

În ordine cronologică inversă, studiile absolvite sunt următoarele:

- **2005 – 2009:** Universitatea *Transilvania* din Braşov, Facultatea de Silvicultură şi Exploatare Forestiere – specializarea *Silvicultură*, studii de licenţă (Diplomă de inginer);
- **2009 – 2011:** Universitatea *Transilvania* din Braşov, Facultatea de Silvicultură şi Exploatare Forestiere, masterat la programul de studii: Managementul Ecosistemelor Forestiere (Diplomă de master);
- **2011 – 2014:** Universitatea *Transilvania* din Braşov, Facultatea de Silvicultură şi Exploatare Forestiere, doctorat în domeniul *Silvicultură*, sub conducerea Domnului Profesor dr. ing. Neculae ŞOFLETEA (Diplomă de doctor în domeniul Silvicultură).

1.2. Activitatea profesională

Activitatea mea profesională s-a concentrat, atât pe activităţile didactice, cât şi pe activităţi de cercetare ştiinţifică.

După obţinerea titlului de doctor – decembrie 2014, în martie 2015 am fost angajată ca şi cercetător la Institutului de Cercetare - Dezvoltare al Universităţii Transilvania din Braşov, în cadrul laboratorului de Genetică forestieră.

Încă din perioada de doctorat şi ulterior pe perioada angajată ca şi cercetător, am efectuat ore de lucrări practice la disciplinele Dendrologie şi Genetică la programul de studii Silvicultură şi Cinegetică – ID. Din anul 2021 predau cursurile şi lucrările practice la disciplinele *Dendrologie I* şi *Dendrologie II* studenţilor din anul I şi II ciclul de licenţă, de la programul de studii Silvicultură şi Cinegetică ID; cursurile şi lucrările practice la disciplina *Genetică* studenţilor din anul I de la programul de studii Cinegetică ID; cursurile şi lucrările practice la disciplina *Conservarea resurselor genetice forestiere*, studenţilor anului II de la programul de masterat Managementul ecosistemelor forestiere.

Tabelul 1. Evoluţia profesională în cadrul Universităţii Transilvania din Braşov

Activitate	Funcţia	Locul de muncă	Perioada
Cercetare	Cercetător	Institutul de Cercetare - Dezvoltare al Universităţii Transilvania din Braşov, Centrul de cercetare Managementul durabil al resurselor forestiere şi cinegetice	2015-2018

Didactică	Şef lucrări	Facultatea de Silvicultură şi Exploatare forestiere, Departamentul Silvicultură	2018 - 2022
	Conferenţiar	Facultatea de Silvicultură şi Exploatare forestiere, Departamentul Silvicultură	2022 - prezent

În cadrul activităţilor didactice întreprinse, am participat anual la coordonarea studenţilor pentru realizarea proiectelor de diplomă şi a lucrărilor de disertaţie, abordând teme de importanţă şi relevanţă pentru domeniul silviculturii.

Totodată am fost implicată şi în activităţi de coordonare în cadrul Institutului de Cercetare - Dezvoltare al Universităţii Transilvania din Braşov pentru o perioadă de 4 ani (2019-2024) fiind Coordonator al centrului de cercetare Managementul durabil al resurselor forestiere şi cinegetice. Din 2019, sunt membru al Consiliului Departamentului, contribuind activ la luarea deciziilor şi la coordonarea strategiilor educaţionale şi de cercetare în cadrul departamentului. Începând cu 2024, coordonez programul de studii de master Managementul Ecosistemelor Forestiere.

1.3. Activitatea de cercetare ştiinţifică

Activitatea de cercetare ştiinţifică s-a concretizat atât prin publicarea de articole şi cărţi de specialitate, cât şi prin participarea activă în contracte de cercetare derulate în cadrul Facultăţii de Silvicultură şi Exploatare forestiere, în calitate de responsabil sau membru/expert în colectivul de cercetare şi implementare.

În ceea ce privesc **articolele**, menţionez că acestea au prezentat rezultatele obţinute în urma cercetărilor întreprinse în cadrul proiectelor de cercetare sau a unor teze de doctorat, dar şi articole redactate în colaborare cu alţi colegi din universitate sau din afara universităţii. Astfel, au fost publicate până în prezent **18 lucrări ISI**, dintre care **4 ca prim autor/autor corespondent** şi **10 articole indexate BDI**, dintre care **4 ca prim autor/autor corespondent**.

Pe parcursul activităţilor desfăşurate am elaborat şi publicat **3 cărţi/capitole** şi **2 cursuri** în format electronic.

Până în prezent am coordonat activităţi de cercetare în cadrul a **3 contracte** şi am fost cooptată ca şi membru în echipa a **12 contracte de cercetare** în care, am beneficiat, încă o dată, de încrederea şi susţinerea cadrelor didactice ale Facultăţii de Silvicultură şi Exploatare Forestiere, dar şi a cercetătorilor din cadrul Institutului Naţional de Cercetare şi Dezvoltare în Silvicultură "Marin Drăcea".

2. Plan de dezvoltare profesională a carierei universitare

Planul de dezvoltare profesională pe care mi-l propun și vi-l propun se bazează pe experiența acumulată până în prezent și pe o serie de valori care țin de profesionalism, perseverență, răbdare, comunicare, colaborare și lucru în echipă, mai ales că se pune din ce în ce mai mult accent pe cercetarea interdisciplinară și pe creșterea vizibilității la nivel internațional.

Astfel, pe viitor, îmi doresc să păstrez și să extind colaborările atât cu cadrele didactice și cercetătorii din universitate, cât și cu cei din afara acesteia (alte instituții de învățământ silvic / institute de cercetare-dezvoltare din țară și străinătate / Regia Națională a Pădurilor – Romsilva).

Punctual, planul de dezvoltare profesională se axează pe dezvoltarea carierei didactice, pe activitatea științifică și, nu în ultimul rând, pe activități de coordonare/administrative, toate acestea fiind detaliate în cele ce urmează.

2.1. Dezvoltarea carierei didactice

Activitatea didactică joacă un rol esențial în formarea și dezvoltarea competențelor academice ale studenților, facilitând transferul de cunoștințe și pregătirea acestora pentru provocările profesionale viitoare. Astfel, activitatea didactică va reprezenta o componentă esențială în parcursul meu profesional, fiind dedicată formării de noi generații de specialiști în domeniul silviculturii. Un prim obiectiv va fi elaborarea unor suporturi moderne pentru cursuri și lucrări practice, care să integreze cele mai recente cercetări și realizări în domeniu. Aceste materiale vor reflecta nu doar evoluțiile teoretice ale domeniului, dar și aplicațiile sale practice, având ca scop aprofundarea cunoștințelor studenților într-un mod interactiv și aplicat.

În vederea îmbunătățirii procesului educațional, atenția va fi îndreptată spre metodele de predare inovative, care să sporească atractivitatea și eficiența învățării. Aceste metode vor include studii de caz, deplasări în teren, învățare prin proiecte și utilizarea tehnologiei în procesul educațional, toate acestea putând contribui pe de o parte la stimularea gândirii critice, iar pe de altă parte la înțelegerea mai bună a conținutului disciplinei. În același timp, voi încuraja studenții să participe activ la manifestări științifice (conferințe și simpozioane studentești), pentru a-și dezvolta abilități de comunicare științifică și de prezentare a cercetărilor proprii.

O altă direcție va fi coordonarea de proiecte de diplomă și lucrări de disertație pe diverse teme actuale de cercetare, astfel încât studenții să poată aplica cunoștințele dobândite în activitățile profesionale pe care le vor întreprinde.

Un ultim obiectiv propus ar fi acela de a participa constant la stagii de formare și schimburi naționale / internaționale de experiență, dat fiind faptul că acestea reprezintă o oportunitate pentru îmbogățirea propriei experiențe educaționale sau pentru consolidarea relațiilor academice.

În calitate de conducător de doctorat, voi contribui activ la formarea și dezvoltarea viitorilor cercetători, oferindu-le sprijin în elaborarea unor teze de doctorat relevante și inovative în domeniul silviculturii. Voi încuraja studenții-doctoranzi să exploreze teme de cercetare originale, care să abordeze probleme de actualitate și să aducă o contribuție practică și științifică semnificativă.

2.2. Dezvoltarea activității de cercetare științifică

În ceea ce privește activitatea de cercetare științifică, pe măsură ce continui să avansez în cariera mea academică și profesională, direcția cercetărilor se va extinde pentru a aborda noi provocări în studiul diversității genetice a diverselor specii de interes forestier. Cercetările viitoare se vor concentra pe aprofundarea înțelegerii diversității genetice și a rolului acesteia în adaptarea populațiilor de plante. Aceste cercetări vor include analiza variației genetice atât la nivel intra-populațional, cât și inter-populațional, pentru a descoperi mecanismele de adaptare ale speciilor la acțiunea unor factori evolutivi. Scopul pe termen lung al cercetărilor mele este de a contribui la conservarea speciilor de arbori și la păstrarea biodiversității. Astfel, atât în domeniul cercetărilor realizate până în prezent dar și în strânsă legătură cu direcțiile viitoare de cercetare atenția va fi îndreptată asupra:

- studiul adaptabilității genetice a speciilor forestiere prin analiza markerilor SNP, bazați pe tehnica *next-generation sequencing* și aplicarea acestor tehnologii în practica silvică.
- realizarea unor modele ecologice predictive pentru studiul influenței factorilor de mediu asupra fenologiei și structurii genetice a populațiilor de arbori.
- înființarea unor livezi de semințe pentru conservarea diversității genetice a speciilor forestiere, ca sursă sustenabilă de material forestier de reproducere;

Rezultatele obținute din cercetările actuale și din cele care se vor derula pe viitor vor fi prezentate la manifestări științifice naționale sau internaționale și vor fi publicate în reviste de specialitate, fiind vizate, cu precădere, revistele cotate ISI.

Obținerea de finanțare prin contracte de cercetare va reprezenta una dintre prioritățile mele, motiv pentru care voi redacta și voi participa activ la redactarea unor propuneri de proiecte de cercetare științifică de fiecare dată când voi avea ocazia.

(B-iii) Bibliografie

1. Afzal-Rafii, Z., & Dodd, R. S. (2007). Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe: Phylogeography of european black pine. *Mol Ecol*, 16(4), 723–736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2006.03183.x>
2. Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. A., Wang, T., & Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, 1(1). <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00013.x>
3. Alberto, F. J., Aitken, S. N., Alía, R., González-Martínez, S. C., Hänninen, H., Kremer, A., Lefèvre, F., Lenormand, T., Yeaman, S., Whetten, R., & Savolainen, O. (2013). Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Global Change Biology*, 19(6), 1645–1661. <https://doi.org/10.1111/gcb.12181>
4. Alizoti, P., Bastien, J. C., Chakraborty, D., Klisz, M. M., Kroon, J., Neophytou, C., Schueler, S., van Loo, M., Westergren, M., Konnert, M., Andonovski, V., Andreassen, K., Brang, P., Brus, R., Cvjetković, B., Đodan, M., Fernández, M., Frýdl, J., Karlsson, B., ... Tsvetkov, I. (2022). Non-Native Forest Tree Species in Europe: The Question of Seed Origin in Afforestation. *Forests*, 13(2), 273. <https://doi.org/10.3390/F13020273/S1>
5. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W147–W153. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW419>
6. Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
7. Barbu, I., Barbu, C. (2005). Silver fir (*Abies alba* Mill.) in Romania. Editura Tehnică Silvică, 220 p.
8. Belletti, P., Ferrazzini, D., Piotti, A., Monteleone, I., & Ducci, F. (2012). Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy. *European Journal of Forest Research*, 131(4), 1127–1138. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0584-3>
9. Bergmann, F., & Ruetz, W. (1991). Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. *Forest Ecology and Management*, 46(1–2), 39–47. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(91\)90243-0](https://doi.org/10.1016/0378-1127(91)90243-0)
10. Bernhardsson, C., Floran, V., Ganea, S. L., & García-Gil, M. R. (2016). Present genetic structure is congruent with the common origin of distant Scots pine populations in its Romanian distribution. In *Forest Ecology and Management* (Vol. 361, pp. 131–143). <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.10.047>

11. Blair, C., Weigel, D. E., Balazik, M., Keeley, A. T., Walker, F. M., Landguth, E., ... & Balkenhol, N. (2012). A simulation-based evaluation of methods for inferring linear barriers to gene flow. *Molecular Ecology Resources*, 12(5), 822–833.
12. Bogunić, F., Siljak-Yakovlev, S., Muratović, E., & Ballian, D. (2009). Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics. *Plant Biol*, 13(1), 194–200. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00326.x>
13. Bolte, A., Hilbrig, L., Grundmann, B., Kampf, F., Brunet, J., & Roloff, A. (2009). Climate change impacts on stand structure and competitive interactions in a southern Swedish spruce–beech forest. *European Journal of Forest Research*, 129(3), 261–276. <https://doi.org/10.1007/s10342-009-0323-1>
14. Bonavita, S., Vendramin, G. G., Bernardini, V., Avolio, S., & Regina, T. M. R. (2016). The first SSR-based assessment of genetic variation and structure among *Pinus laricio* Poiré populations within their native area. *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol*, 150(6), 1271–1281. <https://doi.org/10.1080/11263504.2015.1027316>
15. Bosela, M., Lukac, M., Castagneri, D., Sedmák, R., Biber, P., Carrer, M., Konôpka, B., Nola, P., Nagel, T. A., Popa, I., Roibu, C. C., Svoboda, M., Trotsiuk, V., & Büntgen, U. (2018). Contrasting effects of environmental change on the radial growth of co-occurring beech and fir trees across Europe. *Science of the Total Environment*, 615, 1460–1469. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.092>
16. Borza, A. (1947). *Conspectus florae Romaniae regionumque affinium*. Romanian Book, Cluj.
17. Boşcaiu, N., Boşcaiu, M. (1999). On the presence of *Pinus nigra* subs. *pallasiana* in Romania, *Wiss. Mitt. Niederösterreich. Landesmuseum*. 12: 21–24.
18. Brus, R., Pötzelsberger, E., Lapin, K., Brundu, G., Orazio, C., Straigyte, L., & Hasenauer, H. (2019). Extent, distribution and origin of non-native forest tree species in Europe. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34(7), 533–544. <https://doi.org/10.1080/02827581.2019.1676464>
19. Budde, K. B., González-Martínez, S. C., Navascués, M., Burgarella, C., Mosca, E., Lorenzo, Z., Zabal-Aguirre, M., Vendramin, G. G., Verdú, M., Pausas, J. G., & Heuertz, M. (2017). Increased fire frequency promotes stronger spatial genetic structure and natural selection at regional and local scales in *Pinus halepensis* Mill. *Annals of Botany*, 119(6), 1061–1072. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw286>
20. Budeanu, M., Apostol, E. N., Popescu, F., Postolache, D., & Ioni ă, L. (2019). Testing of the narrow crowned Norway spruce ideotype (*Picea abies* f. *pendula*) and the hybrids with normal crown form (*pyramidalis*) in multisite comparative trials. *Science of The Total Environment*, 689, 980–990. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.06.518>
21. Burrows, G. E. (2021). Gymnosperm resprouting—a review. *Plants*, 10(12), 2551. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10122551/S1>

22. Castro, J., Gómez, J. M., García, D., Zamora, R., & Hódar, J. A. (1999). Seed predation and dispersal in relict Scots pine forests in southern Spain. *Plant Ecology*, 145(1), 115–123. <https://doi.org/10.1023/A:1009865703906>
23. Çengel, B., Tayanç, Y., Kandemir, G., Velioglu, E., Alan, M., & Kaya, Z. (2012). Magnitude and efficiency of genetic diversity captured from seed stands of *Pinus nigra* (Arnold) subsp. *pallasiana* in established seed orchards and plantations. *New Forests*, 43(3), 303–317. <https://doi.org/10.1007/S11056-011-9282-8/TABLES/6>
24. Chaisurisri, K., & El-Kassaby, Y. A. (1994). Genetic diversity in a seed production population vs. natural populations of Sitka Spruce. *Biodiversity and Conservation*, 3(6), 512–523. <https://doi.org/10.1007/BF00115157>
25. Chakraborty, D., Wang, T., Andre, K., Konner, M., Lexer, M. J., Matulla, C., Weißenbacher, L., & Schueler, S. (2016). Adapting Douglas-fir forestry in Central Europe: evaluation, application, and uncertainty analysis of a genetically based model. *European Journal of Forest Research*, 135(5), 919–936. <https://doi.org/10.1007/s10342-016-0984-5>
26. Chaloupková, K., Stejskal, J., El-Kassaby, Y. A., Frampton, J., & Lstibůrek, M. (2019). Current Advances in Seed Orchard Layouts: Two Case Studies in Conifers. *Forests* 2019, Vol. 10, Page 93, 10(2), 93. <https://doi.org/10.3390/F10020093>
27. Chapin, F. S., Carpenter, S. R., Kofinas, G. P., Folke, C., Abel, N., Clark, W. C., Olsson, P., Smith, D. M. S., Walker, B., Young, O. R., Berkes, F., Biggs, R., Grove, J. M., Naylor, R. L., Pinkerton, E., Steffen, W., & Swanson, F. J. (2010). Ecosystem stewardship: sustainability strategies for a rapidly changing planet. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 25, Issue 4, pp. 241–249). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.008>
28. Cheddadi, R., Birks, H. J. B., Tarroso, P., Liepelt, S., Gömöry, D., Dullinger, S., Meier, E. S., Hülber, K., Maiorano, L., & Laborde, H. (2014). Revisiting tree-migration rates: *Abies alba* (Mill.), a case study. *Vegetation History and Archaeobotany*, 23(2), 113–122. <https://doi.org/10.1007/S00334-013-0404-4>
29. Cheng, J., Kao, H., & Dong, S. (2020). Population genetic structure and gene flow of rare and endangered *Tetraena mongolica* Maxim. revealed by reduced representation sequencing. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12870-020-02594-Y/FIGURES/4>
30. Chybicki, I. J., Dzialuk, A., Trojankiewicz, M., Slawski, M., & Burczyk, J. (2008). Spatial genetic structure within two contrasting stands of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genetica*, 57(4–5), 193–202. <https://doi.org/10.1515/SG-2008-0030>
31. Ciocîrlan, E., Sofletea, N., Ducci, F., & Curtu, A. L. (2017). Patterns of genetic diversity in european beech (*Fagus sylvatica* L.) at the eastern margins of its distribution range. *IForest*, 10(6), 916–922. <https://doi.org/10.3832/ifor2446-010>
32. Ciocîrlan, V. (2000). *Flora ilustrată a României*. Editura Ceres, Bucuresti.

33. Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001–2014. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1207747&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Cremer, E., Liepelt, S., Sebastiani, F., Buonamici, A., Michalczyk, I. M., Ziegenhagen, B., & Vendramin, G. G. (2006). Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 374–376. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2005.01238.X>
35. Critchfield, WB., Little, EL. (1966). Geographic distribution of the pines of the world. U.S.D.A. Forest Service, Miscellaneous Publications 991. Washington DC, 1966, 97 p.
36. Curt, T., & Prévosto, B. (2003). Rooting strategy of naturally regenerated beech in Silver birch and Scots pine woodlands. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1023/A:1026132021506>
37. Curtu, A. L., Sofletea, N., Radu, R., Bacea, A., Abrudan, I. V., Butiuc-Keul, A., & Farcas, S. (2009). Allozyme Variation of Coniferous Tree Species from Maramures Mountains, Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(2), 245–251. <https://doi.org/10.15835/NBHA3723250>
38. Cvrčková, H., Máchová, P., & Malá, J. (2015). Use of nuclear microsatellite loci for evaluating genetic diversity among selected populations of *Abies alba* Mill. in the Czech Republic. *JOURNAL OF FOREST SCIENCE*, 61(8), 345–351. <https://doi.org/10.17221/25/2015-JFS>
39. De Rogatis, A., Ducci, F., Francioli, D., Teani, A., & Giovannelli, G. (2024). Genetic origin of two Italian provenances I11 and I15 compared to possible eight American IUFRO provenances of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) from North America. *European Journal of Forest Research*, 143(3), 751–772. <https://doi.org/10.1007/s10342-023-01649-7>
40. De-Lucas, A. I., GonzÁlez-Martínez, S. C., Vendramin, G. G., Hidalgo, E., & Heuertz, M. (2009). Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. *Molecular Ecology*, 18(22), 4564–4576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04372.x>
41. Dering, M., Kosiński, P., Wyka, T. P., Pers-Kamczyc, E., Boratyński, A., Boratyńska, K., Reich, P. B., Romo, A., Zadworny, M., Żytkowiak, R., & Oleksyn, J. (2017). Tertiary remnants and Holocene colonizers: Genetic structure and phylogeography of Scots pine reveal higher genetic diversity in young boreal than in relict Mediterranean populations and a dual colonization of Fennoscandia. *Diversity and Distributions*, 23(5), 540–555. <https://doi.org/10.1111/DDI.12546>
42. Diaconeasa, B., and Fărcaș, S.(2001). Istorical brădetelor din România, descifrat prin metoda polen-analitică." *Studia Univ." Babeș-Bolyai", Biol*: 3-20
43. Dias, A., Gaspar, M. J., Carvalho, A., Pires, J., Lima-Brito, J., Silva, M. E., & Louzada, J. L. (2018). Within- and between-tree variation of wood density components in *Pinus nigra* at six sites in Portugal. *Ann For Sci*, 75(2), 58. <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0734-6>
44. Dias, A., Giovannelli, G., Fady, B., Spanu, I., Vendramin, G. G., Bagnoli, F., Carvalho, A., Silva, M. E., Lima-Brito, J., Lousada, J. L., & Gaspar, M. J. (2020). Portuguese *Pinus nigra* J.F. Arnold populations:

- genetic diversity, structure and relationships inferred by SSR markers. *Annals of Forest Science*, 77(3), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S13595-020-00967-9/FIGURES/3>
45. Dias, A., Lemos, M., Pavia, I., Gaspar, M. J., Silva, M. E., Louzada, J. L., Lima-Brito, J., & Carvalho, A. (2019). Genetic characterization of Portuguese allochthonous populations of *Pinus nigra* using ISSRs and SCoTs and extrapolation of their infraspecific taxonomy. *Physiol Mol Biol Plants*, 25(3), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00649-5>
46. Dieringer, D., & Schlötterer, C. (2003). <scp>microsatellite analyser</scp> (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 167–169. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00351.x>
47. Dlugosch, K. M., & Parker, I. M. (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17(1), 431–449. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2007.03538.X>
48. Dobrowolska, D., Bončina, A., & Klumpp, R. (2017). Ecology and silviculture of silver fir (*Abies alba* Mill.): a review. *Journal of Forest Research*, 22(6), 326–335. <https://doi.org/10.1080/13416979.2017.1386021>
49. Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15. https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf
50. Dumolin, S., Demesure, B., & Petit, R. J. (1995). Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 1253–1256.
51. Duncan, S. I., Crespi, E. J., Mattheus, N. M., & Rissler, L. J. (2015). History matters more when explaining genetic diversity within the context of the core-periphery hypothesis. *Molecular Ecology*, 24(16), 4323–4336. <https://doi.org/10.1111/MEC.13315>
52. Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/S12686-011-9548-7/FIGURES/3>
53. Eckert, C. G., Samis, K. E., & Loughheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17(5), 1170–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x>
54. Eckhart, T., Walcher, S., Hasenauer, H., & van Loo, M. (2017). Genetic diversity and adaptive traits of European versus American Douglas-fir seedlings. *European Journal of Forest Research*, 136(5–6), 811–825. <https://doi.org/10.1007/s10342-017-1072-1>
55. Egnell, G. (2016). Effects of slash and stump harvesting after final felling on stand and site productivity in Scots pine and Norway spruce. *Forest Ecology and Management*. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.03.006>

56. Eilmann, B., de Vries, S. M. G., den Ouden, J., Mohren, G. M. J., Sauren, P., & Sass-Klaassen, U. (2013). Origin matters! Difference in drought tolerance and productivity of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)) provenances. *Forest Ecology and Management*, 302, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.03.031>
57. Eliades, N.-G., & Eliades, D. G. (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. In *Forest Genetics and Forest Tree Breeding*, Georg-August University Goettingen, Germany. <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.html>
58. El-Kassaby, Y. A. (1992). Domestication and genetic diversity - should we be concerned? *Forestry Chronicle*, 68(6), 687–700. <https://doi.org/10.5558/TFC68687-6>
59. Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 217–242. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ES.24.110193.001245/CITE/REFWORKS>
60. Elsik, C. G., & Williams, C. G. (2001). Low-copy microsatellite recovery from a conifer genome. *Theor Appl Genet*, 103(8), 1189–1195. <https://doi.org/10.1007/s001220100725>
61. Enescu, CM., de Rigo, D., Caudullo, G., Mauri, A., Houston Durrant, T. (2016). *Pinus nigra* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. Publ. Off. EU, Luxembourg.
62. Epperson, B. K. (1992). Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees (pp. 257–278). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2815-5_14
63. Ertekin, M. (2012). Genetic Diversity of Seed Orchard Crops. *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*. <https://doi.org/10.5772/33802>
64. Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
65. Excoffier, L., & 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(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
66. Fady, B., Aravanopoulos, F. A., Alizoti, P., Mátyás, C., von Wühlisch, G., Westergren, M., Belletti, P., Cvjetkovic, B., Ducci, F., Huber, G., Kelleher, C. T., Khaldi, A., Kharrat, M. B. D., Kraigher, H., Kramer, K., Mühlethaler, U., Peric, S., Perry, A., Rousi, M., ... Zlatanov, T. (2016). Evolution-based approach needed for the conservation and silviculture of peripheral forest tree populations. In *Forest Ecology and Management* (Vol. 375, pp. 66–75). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.05.015>
67. FAO. (2020). The State of the World's Forests 2020. In *The State of the World's Forests 2020*. FAO and UNEP. <https://doi.org/10.4060/ca8642en>
68. Fărcaș, S., Tanțău, I., Bodnariuc, A., Feurdean, A. (2007). L'histoire des forêts et du paléoclimat Holocène dans les Monts Apuseni. *Contribuții Botanice* 42 (1): 115–126.

69. Fărcaș, S., Tanțău, I., Mândrescu, M., Hurdu B. (2013). Holocene vegetation history in the Maramureș Mountains (Northern Romanian Carpathians). *Quaternary International* 293: 92-104. DOI: 10.1016/j.quaint.2012.03.057
70. Farjon, A. (2018). The Kew Review Conifers of the World. *Kew Bulletin*, 73(1). <https://doi.org/10.1007/S12225-018-9738-5>
71. Farjon, A., Filer, D. (2013). *An Atlas of the World's Conifers: An Analysis of their Distribution, Biogeography, Diversity and Conservation Status* Brill
72. Farjon, A. (2010). *A handbook of the world's conifers*. BRILL.
73. Feurdean, A., & Tanău, I. (2017). The evolution of vegetation from the last glacial maximum until the present. *Springer Geography*, 67–83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32589-7_4
74. Feurdean, A., Tanău, I., & Fărcaș, S. (2011). Holocene variability in the range distribution and abundance of *Pinus*, *Picea abies*, and *Quercus* in Romania; implications for their current status. *Quaternary Science Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2011.07.005>
75. Feurdean, A., & Willis, K. J. (2008). Long-term variability of *Abies alba* in NW Romania: Implications for its conservation management. *Diversity and Distributions*, 14(6), 1004–1017. <https://doi.org/10.1111/J.1472-4642.2008.00514.X>
76. Feurdean, A., Wohlfarth, B., Björkman, L., Tantau, I., Bennike, O., Willis, K. J., Farcas, S., & Robertsson, A. M. (2007). The influence of refugial population on Lateglacial and early Holocene vegetational changes in Romania. *Review of Palaeobotany and Palynology*. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.12.004>
77. Finkeldey, R., & Hattemer, H. H. (2007). *Tropical Forest Genetics*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-37398-8>
78. Fluch, S., Burg, A., Kopecky, D., Homolka, A., Spiess, N., & Vendramin, G. G. (2011). Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research Notes*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-401/TABLES/3>
79. Foulley, J.-L., & Ollivier, L. (2018). Estimating allelic richness and its diversity. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.021>
80. Francis, R. M. (2017). pophelper : an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 27–32. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509>
81. Funda, T., & El-Kassaby, Y. A. (2012). Seed orchard genetics. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127013>
82. Funda, T., Lstibůrek, M., Lachout, P., Klápště, J., & El-Kassaby, Y. A. (2009). Optimization of combined genetic gain and diversity for collection and deployment of seed orchard crops. *Tree Genetics and Genomes*, 5(4), 583–593. <https://doi.org/10.1007/S11295-009-0211-3>

83. Fussi, B., Dounavi, A., Konnert, M., & Fussi, B. (2013). Identification of varieties and gene flow in Douglas fir exemplified in artificially established stands in Germany. *Annals of Forest Research*, 56(2), 249–268. <https://doi.org/10.15287/AFR.2013.26>
84. García Gil, M. R., Floran, V., Östlund, L., Mullin, T. J. "Tim," & Andersson Gull, B. (2015). Genetic diversity and inbreeding in natural and managed populations of Scots pine. *Tree Genetics & Genomes*, 11(2), 28. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0850-5>
85. Geburek, T. (1997). Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest trees. *Biodiversity & Conservation* 1997 6:12, 6(12), 1639–1654. <https://doi.org/10.1023/A:1018330906758>
86. Georgescu CC, (1936). Neue Beiträge zur Systematik der Schwarzföhre. – Feddes Repert. 41: 181-188.
87. Georgescu, CC., Doniță, N. (1965). Raionarea floristică a Carpaților din R.S. Română. St. Și Cert. Biol. Ser. Bot. I, 17, 6, Bucuresti
88. Giovannelli, G., Roig, A., Spanu, I., Vendramin, G. G., & Fady, B. (2017). A new set of nuclear microsatellites for an ecologically and economically important conifer: the European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Plant Mol Biol Report*, 35(3), 379–388. <https://doi.org/10.1007/s11105-017-1029-z>
89. Giovannelli, G., Scotti-Saintagne, C., Scotti, I., Roig, A., Spanu, I., Vendramin, G. G., Guibal, F., & Fady, B. (2019). The genetic structure of the European black pine (*Pinus nigra* Arnold) is shaped by its recent Holocene demographic history. *BioRxiv*, 535591. <https://doi.org/10.1101/535591>
90. Gomory, D., Longauer, R., Liepelt, S., Ballian, D., Brus, R., Kraigher, H., Parpan, V. I., Parpan, T. V., Paule, L., Stupar, V. I., & Ziegenhagen, B. (2004). Variation patterns of mitochondrial DNA of *Abies alba* Mill. in suture zones of postglacial migration in Europe. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 73(3).
91. Gömöry, D., Paule, L., Krajmerová, D., Romšáková, I., & Longauer, R. (2012). Admixture of genetic lineages of different glacial origin: A case study of *Abies alba* Mill. in the Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*, 298(4), 703–712. <https://doi.org/10.1007/S00606-011-0580-6>
92. González-Díaz, P., Jump, A. S., Perry, A., Wachowiak, W., Lapshina, E., & Cavers, S. (2017). Ecology and management history drive spatial genetic structure in Scots pine. *Forest Ecology and Management*, 400, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.05.035>
93. González-díaz, P., Jump, A. S., Perry, A., Wachowiak, W., Lapshina, E., & Cavers, S. (2017). Forest Ecology and Management Ecology and management history drive spatial genetic structure in Scots pine. 400, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.05.035>
94. Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. <Http://Www2.Unil.Ch/Popgen/Softwares/Fstat.Htm>. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029733720>
95. Goudet J (1995). FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistic. *Journal of Heredity* 86: 485-486. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627 (Weir și Cockerham, 1984)

96. Gubler, M., Henne, P. D., Schwörer, C., Boltshauser-Kaltenrieder, P., Lotter, A. F., Brönnimann, S., & Tinner, W. (2018). Microclimatic gradients provide evidence for a glacial refugium for temperate trees in a sheltered hilly landscape of Northern Italy. *Journal of Biogeography*, 45(11), 2564–2575. <https://doi.org/10.1111/JBI.13426>
97. Gugger, P. F., Sugita, S., & Cavender-Bares, J. (2010). Phylogeography of Douglas-fir based on mitochondrial and chloroplast DNA sequences: Testing hypotheses from the fossil record. *Molecular Ecology*, 19(9), 1877–1897. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04622.x>
98. Guziejko, A., Przybylski, P., Jastrzebowski, S., Mohytych, V., & Klisz, M. (2024). Genetic variability of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco in northern Poland. *Sylvan* 168, 4, 274–286. <https://doi.org/https://doi.org/10.26202/sylvan.2024007>
99. Habel, J. C., & Assmann, T. (2010). Relict species: Phylogeography and conservation biology. In *Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92160-8>
100. Hamann, A., & Wang, T. (2006). Potential effects of climate change on ecosystem and tree species distribution in British Columbia. *Ecology*, 87(11), 2773–2786. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2773:peocco\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2773:peocco]2.0.co;2)
101. Hampe, A., & Petit, R. J. (2005). Conserving biodiversity under climate change: The rear edge matters. *Ecology Letters*, 8(5), 461–467. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00739.x>
102. Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. 95–124. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2815-5_7
103. Hansen, O. K. (2008). Mating patterns, genetic composition and diversity levels in two seed orchards with few clones—Impact on planting crop. *Forest Ecology and Management*, 256(5), 1167–1177. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2008.06.032>
104. Hansen, O. K., Vendramin, G. G., Sebastiani, F., & Edwards, K. J. (2005). Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 784–787. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2005.01062.X>
105. Hardy, O. J., & Vekemans, X. (2002). SPAGeDi 1.5 a program for Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity User's manual. <http://www.gnu.org/licenses/>
106. Hebda, A., Wójkiewicz, B., & Wachowiak, W. (2017). Genetic characteristics of Scots pine in Poland and reference populations based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. 51(2), 1–17.
107. Hintsteiner, W. J., van Loo, M., Neophytou, C., Schueler, S., & Hasenauer, H. (2018). The geographic origin of old Douglas-fir stands growing in Central Europe. *European Journal of Forest Research*, 137(4), 447–461. <https://doi.org/10.1007/S10342-018-1115-2/FIGURES/5>

108. Howe, G. T., Aitken, S. N., Neale, D. B., Jermstad, K. D., Wheeler, N. C., & Chen, T. H. H. (2003). From genotype to phenotype: Unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Canadian Journal of Botany*, 81(12), 1247–1266. <https://doi.org/10.1139/B03-141>
109. Hurdu, B. I., Escalante, T., Puşcaş, M., Novikoff, A., Bartha, L., & Zimmermann, N. E. (2016). Exploring the different facets of plant endemism in the South-Eastern Carpathians: a manifold approach for the determination of biotic elements, centres and areas of endemism. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 649–672. <https://doi.org/10.1111/BIJ.12902>
110. Huson, D. H. (1998). SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, 14(1), 68–73. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/14.1.68>
111. Ilinov, A. A., & Raevsky, B. V. (2017). Comparative evaluation of the genetic diversity of natural populations and clonal seed orchards of *Pinus sylvestris* L. and *Picea × fennica* (Regel) Kom. in Karelia. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 2017 7:6, 7(6), 607–616. <https://doi.org/10.1134/S2079059717060065>
112. Isajev, V., Fady, B., Semerci, H., & Andonovski, V. (2004a). EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use for European black pine (). International Plant Genetic Resources Institute.
113. Isajev, V., Fady, B., Semerci, H., & Andonovski, V. (2004b). EUFORGEN technical guidelines for genetic conservation and use for European black pine (). International Plant Genetic Resources Institute.
114. Ivetić, V., Devetaković, J., Nonić, M., Stanković, D., & Šijačić-Nikolić, M. (2016). Genetic diversity and forest reproductive material - From seed source selection to planting. *IForest*, 9(5), 801–812. <https://doi.org/10.3832/ifor1577-009>
115. Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
116. Jansen, S., Konrad, H., & Geburek, T. (2017). The extent of historic translocation of Norway spruce forest reproductive material in Europe. *Annals of Forest Science*, 74(3), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S13595-017-0644-Z/FIGURES/4>
117. Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Jaques Miret, J. A., MacLeod, A., Navajas Navarro, M., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., Van Bruggen, A., Van der Werf, W., West, J., ... Grégoire, J. C. (2018). Pest categorisation of *Dendrolimus sibiricus*. *EFSA Journal*, 16(6). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2018.5301>
118. Johnson, R., & Lipow, S. (2002). Compatibility of breeding for increased wood production and longterm sustainability: the genetic variation of seed orchard seed and associated risks. In: *Proceedings Wood Compatibility Initiative Workshop*. 18: 169-179, 18.

119. Kang, K. S., Harju, A. M., Lindgren, D., Nikkanen, T., Almqvist, C., & Suh, G. U. (2001). Variation in effective number of clones in seed orchards. *New Forests* 2001 21:1, 21(1), 17–33. <https://doi.org/10.1023/A:1010785222169>
120. Konnert, M., & Bergmann, F. (1995). The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution*, 196(1–2), 19–30. <https://doi.org/10.1007/BF00985333>
121. Konnert, M., & Ruetz, W. (2006). Genetic aspects of artificial regeneration of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in Bavaria. *European Journal of Forest Research*, 125(3), 261–270. <https://doi.org/10.1007/S10342-006-0116-8/FIGURES/2>
122. Konôpková, A., Krajmerová, D., Kurjak, D., Kmet', J., Pšidová, E., Kučerová, J., Hrivnák, M., Longauer, R., Ditmarová, L., & Gömöry, D. (2019). Nucleotide polymorphisms associated with climate and physiological traits in silver fir (*Abies alba* Mill.) provenances. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 250, 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.FLORA.2018.11.012>
123. Kreyling, J., Wiesenberg, G. L. B., Thiel, D., Wohlfart, C., Huber, G., Walter, J., Jentsch, A., Konnert, M., & Beierkuhnlein, C. (2012). Cold hardiness of *Pinus nigra* Arnold as influenced by geographic origin, warming, and extreme summer drought. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 99–108. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2011.12.026>
124. Krutovsky, K. V., St. Clair, J. B., Saich, R., Hipkins, V. D., & Neale, D. B. (2009). Estimation of population structure in coastal Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*] using allozyme and microsatellite markers. *Tree Genetics and Genomes*, 5(4), 641–658. <https://doi.org/10.1007/S11295-009-0216-Y/FIGURES/6>
125. Langella, O. (1999). Populations 1.2.32. <http://bioinformatics.org/populations/>
126. Lavender, D. P., & Hermann, R. K. (2014). Douglas-fir: The Genus *Pseudotsuga*. <https://ir.library.oregonstate.edu/concern/defaults/sf268560k?locale=en>
127. Lesica, P., & Allendorf, F. W. (1995). When Are Peripheral Populations Valuable for Conservation? *Conservation Biology*, 9(4), 753–760. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1739.1995.09040753.X>
128. Liepelt, S., Cheddadi, R., de Beaulieu, J. L., Fady, B., Gömöry, D., Hussendörfer, E., Konnert, M., Litt, T., Longauer, R., Terhürne-Berson, R., & Ziegenhagen, B. (2009). Postglacial range expansion and its genetic imprints in *Abies alba* (Mill.) — A synthesis from palaeobotanic and genetic data. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 153(1–2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/J.REVPALBO.2008.07.007>
129. Lindgren, D., & Prescher, F. (2005). Optimal clone number for seed orchards with tested clones. *Silvae Genetica*, 54(2), 80–92. <https://doi.org/10.1515/SG-2005-0013>
130. Lischke, H., Löffler, T. J., & Fischlin, A. (1998). Aggregation of Individual Trees and Patches in Forest Succession Models: Capturing Variability with Height Structured, Random, Spatial

- Distributions. Theoretical Population Biology, 54(3), 213–226.
<https://doi.org/10.1006/TPBI.1998.1378>
131. Liu, Z. L., Cheng, C., & Li, J. (2012). High genetic differentiation in natural populations of *Pinus henryi* and *Pinus tabulaeformis* as revealed by nuclear microsatellites. *Biochem Syst Ecol*, 42, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.07.005>
132. Lucău-Dănila A. (1991). Variabilitatea genetică a bradului. Universitatea "Transilvania" Braşov. Teza de doctorat.
133. Luikart, G., Sherwin, W. B., Steele, B. M., & Allendorf, F. W. (1998). Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology*, 7(8), 963–974. <https://doi.org/10.1046/J.1365-294X.1998.00414.X>
134. Máchová, P., Trčková, O., & Cvrčková, H. (2018). Use of Nuclear Microsatellite Loci for Evaluating Genetic Diversity of Selected Populations of *Picea abies* (L.) Karsten in the Czech Republic. *Forests* 2018, Vol. 9, Page 92, 9(2), 92. <https://doi.org/10.3390/F9020092>
135. Magyari, E. K., Jakab, G., Bálint, M., Kern, Z., Buczkó, K., & Braun, M. (2012). Rapid vegetation response to Lateglacial and early Holocene climatic fluctuation in the South Carpathian Mountains (Romania). *Quaternary Science Reviews*, 35, 116–130.
<https://doi.org/10.1016/J.QUASCIREV.2012.01.006>
136. Manni, F., Guérard, E., & Heyer, E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, 76(2), 173–190. <https://doi.org/10.1353/hub.2004.0034>
137. Marangoci, M. (2019). PINUS NIGRA ARN. AND THE INFRATAXON PINUS NIGRA SSP. BANATICA A SHORT REVIEW. *Journal of Experimental and Molecular Biology*, 19(4), 107–112.
<https://www.jemb.bio.uaic.ro/index.php/jemb/article/view/28>
138. Marchi, M., Nocentini, S., & Ducci, F. (2016). Future scenarios and conservation strategies for a rear-edge marginal population of *Pinus nigra* Arnold in Italian central Apennines. *Forest Systems*, 25(3). <https://doi.org/10.5424/FS/2016253-09476>
139. Marquardt, P. E., Echt, C. S., Epperson, B. K., & Pubanz, D. M. (2007). Genetic structure, diversity, and inbreeding of eastern white pine under different management conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, 37(12), 2652–2662. <https://doi.org/10.1139/X07-114>
140. Mátyás, C. (2009). Ecological Challenges of Climate Change in Europe's Continental, Drought-Threatened Southeast. 35–46. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2283-7_5
141. Mátyás, C., Ackzell, L., & Samuel, C. J. A. (2004). Technical guidelines for genetic conservation and use for Scots pine (*Pinus sylvestris*). International Plant Genetic Resources Institute, 6.
142. Meirmans, P. G. (2012). The trouble with isolation by distance. *Molecular Ecology*, 21(12), 2839–2846. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2012.05578.X>

143. Mihai, G., Bârsan, M. V., Dumitrescu, A., Alexandru, A., Mirancea, I., Ivanov, P., Stuparu, E., Teodosiu, M., & Daia, M. (2018). Adaptive genetic potential of European silver fir in Romania in the context of climate change. *Annals of Forest Research*, 61(1), 95–108. <https://doi.org/10.15287/AFR.2018.1021>
144. Mihai, G., Curtu, A. L., Garbacea, P., Alexandru, A. M., Mirancea, I., & Teodosiu, M. (2019). Genetic variation and inheritance of bud flushing in a Norway spruce seed orchard established in Romania. *Proceedings of the Biennial International Symposium "Forest and Sustainable Development"*, Braşov, Romania, 25-27 October 2018, 73–82.
145. Mihai, G., Teodosiu, M., Birsan, M. V., Alexandru, A. M., Mirancea, I., Apostol, E. N., Garbacea, P., & Ionita, L. (2020). Impact of Climate Change and Adaptive Genetic Potential of Norway Spruce at the South-eastern Range of Species Distribution. *Agricultural and Forest Meteorology*, 291, 108040. <https://doi.org/10.1016/J.AGRFORMET.2020.108040>
146. Milenkova, A., Konnert, M., Fussi, B., & Petkova, K. (2018). Identification of varieties and genetic diversity of douglas-fir stands in the region of osogovo, south west Bulgaria. *Forestry Ideas*, 24(1), 37–50.
147. Miller, M. P. (2005). Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information. *Journal of Heredity*, 96(6), 722–724. <https://doi.org/10.1093/JHERED/ESI119>
148. Monmonier, M. S. (1973). Maximum-Difference Barriers: An Alternative Numerical Regionalization Method. *Geographical Analysis*, 5(3), 245–261. <https://doi.org/10.1111/j.1538-4632.1973.tb01011.x>
149. Morton, N. E. (2013). Isolation by Distance. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 28, Issue 2, pp. 139–139). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00820-2>
150. Mosca, E., Di Pierro, E. A., Budde, K. B., Neale, D. B., & González-Martínez, S. C. (2018). Environmental effects on fine-scale spatial genetic structure in four Alpine keystone forest tree species. *Molecular Ecology*, 27(3), 647–658. <https://doi.org/10.1111/mec.14469>
151. Mosca, E., Eckert, A. J., Di Pierro, E. A., Rocchini, D., La Porta, N., Belletti, P., & Neale, D. B. (2012). The geographical and environmental determinants of genetic diversity for four alpine conifers of the European Alps. *Molecular Ecology*, 21(22), 5530–5545. <https://doi.org/10.1111/MEC.12043>
152. Mukhopadhyay, T., & Bhattacharjee, S. (2016). Genetic Diversity: Its Importance and Measurements. <https://www.researchgate.net/publication/309290823>
153. Muona, O., & Harju, A. (1989). Effective population sizes, genetic variability, and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris*. *Silvae Genetica*, 38(5), 221–228. https://www.thuenen.de/media/institute/fg/PDF/Silvae_Genetica/1989/Vol._38_Heft_5-6/38_5-6_221.pdf

154. Namroud, M. C., Bousquet, J., Doerksen, T., & Beaulieu, J. (2012). Scanning SNPs from a large set of expressed genes to assess the impact of artificial selection on the undomesticated genetic diversity of white spruce. *Evolutionary Applications*, 5(6), 641–656. <https://doi.org/10.1111/J.1752-4571.2012.00242.X>
155. Naydenov, K. D., Tremblay, F. M., Fenton, N. J., & Alexandrov, A. (2006). Structure of *Pinus nigra* Arn. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochem Syst Ecol*, 34(7), 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.01.011>
156. Naydenov, K., Senneville, S., Beaulieu, J., Tremblay, F., & Bousquet, J. (2007). Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor. 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-233>
157. Neale, D. B., & Kremer, A. (2011). Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* 2011 12:2, 12(2), 111–122. <https://doi.org/10.1038/nrg2931>
158. Neophytou, C., Hasenauer, H., & Kroon, J. (2022). Molecular Genetic Identification Explains Differences in Bud Burst Timing among Progenies of Selected Trees of the Swedish Douglas Fir Breeding Programme. *Forests*, 13(6), 895. <https://doi.org/10.3390/f13060895>
159. Neophytou, C., Van Loo, M., & Hasenauer, H. (2020). Genetic diversity in introduced Douglas-fir and its natural regeneration in Central Europe. *Forestry*, 93(4), 535–544. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpz055>
160. Neophytou, C., Weisser, A. M., Landwehr, D., Šeho, M., Kohnle, U., Ensminger, I., & Wildhagen, H. (2016). Assessing the relationship between height growth and molecular genetic variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) provenances. *European Journal of Forest Research*, 135(3), 465–481. <https://doi.org/10.1007/S10342-016-0946-Y/TABLES/5>
161. Nicolescu, V. N., Femmig, J., Filipescu, C. N., Ramskogler, K., & Candrea-Bozga, B. Ș. (2014). Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco) in Europe: past, present and future. *Revista Pădurilor*, 129(5/6), 3–19.
162. Nicolescu, V. N., Mason, W. L., Bastien, J. C., Vor, T., Petkova, K., Podrázský, V., Đodan, M., Perić, S., La Porta, N., Brus, R., Andrašev, S., Slávik, M., Modranský, J., Pástor, M., Rédei, K., Cvjetkovic, B., Sivacioğlu, A., Lavnyy, V., Buzatu-Goanță, C., & Mihăilescu, G. (2023). Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) in Europe: an overview of management practices. In *Journal of Forestry Research* (Vol. 34, Issue 4, pp. 871–888). Northeast Forestry University. <https://doi.org/10.1007/s11676-023-01607-4>
163. Nikolić, D., & Tucic, N. (1983). Isoenzyme variation within and among populations of European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Silvae Genet*, 32, 3–4.
164. Nowakowska, J. A., Zachara, T., & Konecka, A. (2014). Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. 75(March), 47–54. <https://doi.org/10.2478/frp-2014-0005>

165. Ortego, J., Riordan, E. C., Gugger, P. F., & Sork, V. L. (2012). Influence of environmental heterogeneity on genetic diversity and structure in an endemic southern Californian oak. *Molecular Ecology*, 21(13), 3210–3223. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2012.05591.X>
166. Page, R. D. M. (2003). Visualizing Phylogenetic Trees Using TreeView. *Current Protocols in Bioinformatics*, 00(1), 6.2.1–6.2.15. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0602s01>
167. Pakull, B., Eusemann, P., Wojacki, J., Ahnert, D., & Liesebach, H. (2021). Genetic diversity of seeds from four German Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seed orchards. *European Journal of Forest Research*, 140(6), 1543–1557. <https://doi.org/10.1007/s10342-021-01419-3>
168. Pan, Y., Birdsey, R. A., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P. E., Kurz, W. A., Phillips, O. L., Shvidenko, A., Lewis, S. L., Canadell, J. G., Ciais, P., Jackson, R. B., Pacala, S. W., McGuire, A. D., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., & Hayes, D. (2011). A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science*, 333(6045), 988–993. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1201609/SUPPL_FILE/PAPV2.PDF
169. Pavia, I., Mengl, M., João Gaspar, M., Carvalho, A., Heinze, B., & Lima-Brito, J. (2014). Preliminary evidence of two potentially native populations of *Pinus sylvestris* L. in Portugal based on nuclear and chloroplast SSR markers. *Austrian Journal of Forest Research*, 1(January 2016), 1–22
170. Pârnuță, G., Stuparu, E., Budeanu, M., Scărlătescu, V., Marica, F.-M., Lala, I., Tudoroiu, M., Lorent, A., Filat, M., Teodosiu, M., Nica, M.S., Chesnoiu, E.N., Pârnuță, P., Mirancea, I., Marcu, C., Pepelea, D., Dinu, C., Marin, S., Daia, M., Dima, G., Șofletea, N., Curtu, A. L. (2012). Catalogul Național al materialelor de bază pentru producerea materialelor forestiere de reproducere din România. Editura Silvică, București, 304 p.
171. Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
172. Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
173. Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., & Vendramin, G. G. (2005). Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14(3), 689–701. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2004.02410.X>
174. Pfeiffer, A., Olivieri, A. M., & Morgante, M. (1997). Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40(4), 411–419. <https://doi.org/10.1139/G97-055>

175. Picon-Cochard, C., Coll, L., & Balandier, P. (2006). The role of below-ground competition during early stages of secondary succession: The case of 3-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in an abandoned grassland. *Oecologia*. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0379-2>
176. Piotti, A., Leonardi, S., Heuertz, M., Buiteveld, J., Geburek, T., Gerber, S., Kramer, K., Vettori, C., & Vendramin, G. G. (2013). Within-population genetic structure in beech (*Fagus sylvatica* L.) stands characterized by different disturbance histories: does forest management simplify population substructure? *PloS One*, 8(9), e73391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073391>
177. Piotti, A., Leonarduzzi, C., Postolache, D., Bagnoli, F., Spanu, I., Brousseau, L., Urbinati, C., Leonardi, S., & Vendramin, G. G. (2017). Unexpected scenarios from Mediterranean refugial areas: disentangling complex demographic dynamics along the Apennine distribution of silver fir. *Journal of Biogeography*, 44(7), 1547–1558. <https://doi.org/10.1111/JBI.13011>
178. Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90(4), 502–503. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.4.502>
179. Popa-Costea, V. (1973). Cercetari privind comportarea unor proveniente comerciale de duglas verde in conditiile tarii noastre. *ICAS Bucuresti, Studii Si Cercetari, Seria I, XXIX(1)*, 249–305.
180. Porth, I., & El-Kassaby, Y. A. (2014). Assessment of the Genetic Diversity in Forest Tree Populations Using Molecular Markers. *Diversity 2014*, Vol. 6, Pages 283-295, 6(2), 283–295. <https://doi.org/10.3390/D6020283>
181. Postolache, D., Popescu, F., Pitar, D., Apostol, E.N., Iordan, A., Avram, M., Iordan, O., Zhelev, P., (2016). Originea, evoluția și structura genetică a brădetelor din România evaluate prin intermediul markerilor moleculari. *Revista de Silvicultură și Cinegetică Anul XXI (38)*: 8-14.
182. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. In *Molecular Breeding (Vol. 2)*. Kluwer Academic Publishers.
183. Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/155.2.945>
184. Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N. J., McNicol, J. W., Forrest, G. I., Cottrell, J., & Powell, W. (1998). Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1407), 1697–1705. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1998.0491>
185. Prus-Głowacki, W., Urbaniak, L., Bujas, E., & Curtu, A. L. (2012). Genetic variation of isolated and peripheral populations of *Pinus sylvestris* (L.) from glacial refugia. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.11.006>

186. Radu, G. R., Curtu, A. L., Spârchez, G., & Șofletea, N. (2014). Genetic diversity of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] in Romanian Carpathians. *Annals of Forest Research*, 57(1), 19–29. <https://doi.org/10.15287/AFR.2014.178>
187. Rajora, O. P., & Mosseler, A. (2001). Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. *Euphytica*, 118(2), 197–212. <https://doi.org/10.1023/A:1004150525384/METRICS>
188. Ray, D., Berlin, M., Alia, R., Sanchez, L., Hynynen, J., González-Martinez, S., & Bastien, C. (2022). Transformative changes in tree breeding for resilient forest restoration. *Frontiers in Forests and Global Change*, 5, 1005761. <https://doi.org/10.3389/FFGC.2022.1005761/BIBTEX>
189. Rezultate IFN – Ciclu II. (2018).
190. Robledo-Arnuncio, J. J., Collada, C., Alía, R., & Gil, L. (2005). Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography*, 32(4), 595–605. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2699.2004.01196.X>
191. Ronikier, M. (2011). Biogeography of high-mountain plants in the Carpathians: An emerging phylogeographical perspective. *Taxon*, 60(2), 373–389. <https://doi.org/10.1002/TAX.602008>
192. Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2007.01931.X>
193. Rubio-Moraga, A., Candel-Perez, D., Lucas-Borja, M. E., Tiscar, P. A., Viñegla, B., Linares, J. C., Gómez-Gómez, L., & Ahrazem, O. (2012). Genetic diversity of *Pinus nigra* arn. Populations in southern Spain and northern Morocco revealed by inter-simple sequence repeat profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 5645–5658. <https://doi.org/10.3390/IJMS13055645>
194. Rungis, D., Bérubé, Y., Zhang, J., Ralph, S., Ritland, C. E., Ellis, B. E., Douglas, C., Bohlmann, J., & Ritland, K. (2004). Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1283–1294. <https://doi.org/10.1007/S00122-004-1742-5/FIGURES/4>
195. Ruņģis, D., Luguza, S., Baders, E., Šķipars, V., & Jansons, A. (2019). Comparison of Genetic Diversity in Naturally Regenerated Norway Spruce Stands and Seed Orchard Progeny Trials. *Forests* 2019, Vol. 10, Page 926, 10(10), 926. <https://doi.org/10.3390/F10100926>
196. Ruosch, M., Spahni, R., Joos, F., Henne, P. D., van der Knaap, W. O., & Tinner, W. (2016). Past and future evolution of *Abies alba* forests in Europe – comparison of a dynamic vegetation model with palaeo data and observations. *Global Change Biology*, 22(2), 727–740. <https://doi.org/10.1111/GCB.13075>
197. Samartin, S., Heiri, O., Kaltenrieder, P., Köhl, N., & Tinner, W. (2016). Reconstruction of full glacial environments and summer temperatures from Lago della Costa, a refugial site in Northern

- Italy. Quaternary Science Reviews, 143, 107–119.
<https://doi.org/10.1016/J.QUASCIREV.2016.04.005>
198. Sancho-Knapik, D., Peguero-Pina, J. J., Cremer, E., Camarero, J. J., Fernández-Cancio, Ibarra, N., Konnert, M., & Gil-Pelegrín, E. (2014). Genetic and environmental characterization of *Abies alba* Mill. populations at its western rear edge. *Pirineos*, 169.
<https://doi.org/10.3989/PIRINEOS.2014.169007>
199. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., & Mauri, A. (2016). European Atlas of Forest Tree Species. In *Director* (Vol. 11, Issue April).
<https://doi.org/10.2788/038466>
200. Šarac, Z., Aleksić, J. M., Dodoš, T., Rajčević, N., Bojović, S., & Marin, P. D. (2015). Cross-species amplification of nuclear EST-microsatellites developed for other *Pinus* species in *Pinus nigra*. *Genetika*, 47(1), 205–217. <https://doi.org/10.2298/gensr1501205s>
201. Savolainen, O. (1996). Pines beyond the polar circle: Adaptation to stress conditions. *Euphytica*, 92(1–2), 139–145. <https://doi.org/10.1007/BF00022839>
202. Savolainen, O., Pyhäjärvi, T., & Knürr, T. (2007). Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(Volume 38, 2007), 595–619.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.38.091206.095646/1>
203. Scalfi, M., Piotti, A., Rossi, M., & Piovani, P. (2009). Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: The rear edge of the range. *European Journal of Forest Research*. <https://doi.org/10.1007/s10342-009-0273-7>
204. Schiop, S. T., Al Hassan, M., Sestras, A. F., Boscaiu, M., Sestras, R. E., & Vicente, O. (2017). Biochemical responses to drought, at the seedling stage, of several Romanian Carpathian populations of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *Trees - Structure and Function*, 31(5), 1479–1490. <https://doi.org/10.1007/S00468-017-1563-1/FIGURES/7>
205. Schmid, M., Pautasso, M., & Holdenrieder, O. (2014). Ecological consequences of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) cultivation in Europe. *European Journal of Forest Research*, 133(1), 13–29. <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0745-7>
206. Scotti, I., Magni, F., Paglia, G. P., & Morgante, M. (2002). Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(1), 40–50. <https://doi.org/10.1007/S00122-002-0986-1>
207. Scotti-Saintagne, C., Giovannelli, G., Scotti, I., Roig, A., Spanu, I., Vendramin, G. G., Guibal, F., & Fady, B. (2019). Recent, late-Pleistocene fragmentation shaped the phylogeographic structure of the European black pine (*Pinus nigra* Arnold). *Tree Genetics Genomes*, 15(5), 76.
<https://doi.org/10.1007/s11295-019-1381-2>
208. Sebastiani, F., Kujala, S. T., & González-Martínez, S. C. (2013). Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. December. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9513-5>

209. Semerikov, V. L., Semerikova, S. A., Dymshakova, O. S., Zatsepina, K. G., Tarakanov, V. V., Tikhonova, I. V., Ekart, A. K., Vidyakin, A. I., Jamiyansuren, S., Rogovtsev, R. V., & Kalchenko, L. I. (2014). Microsatellite loci polymorphism of chloroplast DNA of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Asia and eastern Europe. *Russian Journal of Genetics*, 50(6), 577–585. <https://doi.org/10.1134/S1022795414040127>
210. Sheller, M., Ciocîrlan, E., Mikhaylov, P., Kulakov, S., Kulakova, N., Ibe, A., Sukhikh, T., & Curtu, A. L. (2021). Chloroplast dna diversity in populations of p. *Sylvestris* l. from middle siberia and the romanian carpathians. *Forests*, 12(12), 1–12. <https://doi.org/10.3390/f12121757>
211. Șofletea, N., Mihai, G., Ciocîrlan, E., & Curtu, A. L. (2020). Genetic diversity and spatial genetic structure in isolated scots pine (*Pinus sylvestris* l.) populations native to eastern and southern carpathians. *Forests*, 11(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/F11101047>
212. Șofletea, Nicolae., & Curtu, A. L. (2007). *Dendrologie*. Editura Universității "Transilvania." <http://bibliotecamm.ebibliophil.ro/carte/dendrologie-sofletea-n?limba=en>
213. Șofletea, N, Curtu, AL. (2001). *Dendrologie [Dendrology]*. Editura Pentru Via ă, Brașov, România, pp.300.
214. Sønstebo, J. H., Tollefsrud, M. M., Myking, T., Steffenrem, A., Nilsen, A. E., Edvardsen, M., Johnskås, O. R., & El-Kassaby, Y. A. (2018). Genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seed orchard crops: Effects of number of parents, seed year, and pollen contamination. *Forest Ecology and Management*, 411, 132–141. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2018.01.009>
215. Soranzo, N., Provan, J., & Powell, W. (1998). Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 7(9), 1260–1261. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734086>
216. Soto, A., Robledo-Arnuncio, J. J., González-Martínez, S. C., Smouse, P. E., & Alía Miranda, R. (2010). Climatic niche and neutral genetic diversity of the six Iberian pine species: a retrospective and prospective view. *Mol Ecol*, 19(7), 1396–1409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2010.04571.x>
217. Spiecker, H., Lindner, M., & Schuler, J. K. (2019). What Science Can Tell Us 9 - Douglas-fir: an option for Europe.
218. Stoehr, M. U., & El-Kassaby, Y. A. (1997). Levels of genetic diversity at different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 94(1), 83–90. <https://doi.org/10.1007/S001220050385>
219. Tang, D.-Q., & Ide, Y. (2001). Genetic Variation in Fruitfulness in a Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) Seed Orchard and Its Impact on the Maintenance of Genetic Diversity in Seedlots. *J. For. Res*, 6, 67–72.
220. Tan ău, I., Feurdean, A., de Beaulieu, J. L., Reille, M., & Fărcaș, S. (2011). Holocene vegetation history in the upper forest belt of the Eastern Romanian Carpathians. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2011.06.011>

221. Tanțău, I., Reille, M., de Beaulieu, J.L., Fărcaș, S., Goslar, T., Paterne, M. (2003). Vegetation history in the eastern Romanian Carpathians: pollen analysis of two sequences from the Mohos crater. *Vegetation History and Archeobotany* 12: 113–125. DOI: 10.1007/s00334-003-0015-6
222. Teodosiu, M. (2011). Research regarding genetic variability in Norway spruce stands from Obcinele Bucovinei. Transilvania University of Brasov.
223. Terhürne-Berson, R., Litt, T., & Cheddadi, R. (2004). The spread of *Abies* throughout Europe since the last glacial period: Combined macrofossil and pollen data. *Vegetation History and Archaeobotany*, 13(4), 257–268. <https://doi.org/10.1007/S00334-004-0049-4>
224. Tinner, W., Colombaroli, D., Heiri, O., Henne, P. D., Steinacher, M., Untenecker, J., Vescovi, E., Allen, J. R. M., Carraro, G., Conedera, M., Joos, F., Lotter, A. F., Luterbacher, J., Samartin, S., & Valsecchi, V. (2013). The past ecology of *Abies alba* provides new perspectives on future responses of silver fir forests to global warming. *Ecological Monographs*, 83(4), 419–439. <https://doi.org/10.1890/12-2231.1>
225. Tollefsrud, M. M., Kissling, R., Gugerli, F., Johnsen, Ø., Skrøppa, T., Cheddadi, R., Van Der Knaap, W. O., Latałowa, M., Terhürne-Berson, R., Litt, T., Geburek, T., Brochmann, C., & Sperisen, C. (2008). Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: Combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen. *Molecular Ecology*, 17(18), 4134–4150. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2008.03893.X>
226. Tong, Y., Durka, W., Zhou, W., Zhou, L., Yu, D., & Dai, L. (2020). Ex situ conservation of *Pinus koraiensis* can preserve genetic diversity but homogenizes population structure. *Forest Ecology and Management*, 465, 117820. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2019.117820>
227. Tóth, E. G., Bede-Fazekas, Á., Vendramin, G. G., Bagnoli, F., & Höhn, M. (2019). Mid-Pleistocene and Holocene demographic fluctuation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Carpathian Mountains and the Pannonian Basin: Signs of historical expansions and contractions. *Quaternary International*, 504, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2017.11.024>
228. Tóth, E. G., Vendramin, G. G., Bagnoli, F., & Cseke, K. (2017). High genetic diversity and distinct origin of recently fragmented Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations along the Carpathians and the Pannonian Basin. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1137-9>
229. Valbuena-Carabana, M., Gonzalez-Martinez, S. C., Hardy, O. J., & Gil, L. (2007). Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization. *Molecular Ecology*, 16(6), 1207–1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03231.x>
230. van Loo, M., Hintsteiner, W., Pötzelsberger, E., Schüller, S., & Hasenauer, H. (2015). Intervarietal and intravarietal genetic structure in Douglas-fir: Nuclear SSRs bring novel insights into past population demographic processes, phylogeography, and intervarietal hybridization. *Ecology and Evolution*, 5(9), 1802–1817. <https://doi.org/10.1002/ece3.1435>
231. van Loo, M., Lazic, D., Chakraborty, D., Hasenauer, H., & Schüller, S. (2019). North American Douglas-fir (*P. menziesii*) in Europe: establishment and reproduction within new geographic space

- without consequences for its genetic diversity. *Biological Invasions*, 21(11), 3249–3267. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02045-2>
232. Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
 233. Vekemans, X., & Hardy, O. (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. August 2017. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2004.02076.x>
 234. Vendramin, G., Lelli, L., Rossi, P., & Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5, 595–598. <https://www.academia.edu/download/49623884/j.1365-294x.1996.00111.x20161015-30754-onkppz.pdf>
 235. Viard, F., El-Kassaby, Y. A., & Ritland, K. (2001). Diversity and genetic structure in populations of *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) at chloroplast microsatellite loci. <https://doi.org/10.1139/gen-44-3-336>
 236. Vidakovic, M. (1991). Conifers: morphology and variation. Translated from Croatian by Maja Soljan. Croatia: Graficki Zavod Hrvatske.
 237. Vitasse, Y., Bottero, A., Rebetez, M., Conedera, M., Augustin, S., Brang, P., & Tinner, W. (2019). What is the potential of silver fir to thrive under warmer and drier climate? *European Journal of Forest Research*, 138(4), 547–560. <https://doi.org/10.1007/S10342-019-01192-4>
 238. Wang, I. J. (2013). Examining the full effects of landscape heterogeneity on spatial genetic variation: A multiple matrix regression approach for quantifying geographic and ecological isolation. *Evolution*, 67(12), 3403–3411. <https://doi.org/10.1111/EVO.12134>
 239. Weiß, C. H. (2007). StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. *ASTA Advances in Statistical Analysis*, 91(3), 339–341. <https://doi.org/10.1007/s10182-007-0038-x>
 240. Westergren, M., Bozic, G., & Kraigher, H. (2018). Genetic diversity of core vs. peripheral Norway spruce native populations at a local scale in Slovenia. *IForest - Biogeosciences and Forestry*, 11(1), 104. <https://doi.org/10.3832/IFOR2444-011>
 241. Williams, J. H., Godt, M. J. W., Hamrick, J. L., Edwards-Burke, M. A., & Williams, J. H. (2001). Comparisons of genetic diversity in white spruce (*Picea glauca*) and jack pine (*Pinus banksiana*) seed orchards with natural populations. *Cdnsciencepub.Com*, 31(6), 943–949. <https://doi.org/10.1139/x01-024>
 242. Wojacki, J., Eusemann, P., Ahnert, D., Pakull, B., & Liesebach, H. (2019). Genetic diversity in seeds produced in artificial Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) stands of different size. *Forest Ecology and Management*, 438, 18–24. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2019.02.012>
 243. Zhou, Y., Bui, T., Auckland, L. D., & Williams, C. G. (2002). Undermethylated DNA as a source of microsatellites from a conifer genome. *Genome*, 45(1), 91–99. <https://doi.org/10.1139/g01-119>

244. Ziegenhagen, B., Fady, B., Kuhlenkamp, V., & Liepelt, S. (2005). Differentiating groups of *Abies* species with a simple molecular marker. *Silvae Genetica*, 54(3), 123–126.
<https://doi.org/10.1515/SG-2005-0019>

*** Plan management Parcul Național Domogled-Valea Cernei