



**Universitatea *Transilvania* din Braşov**

**TEZĂ DE ABILITARE**

**Evaluarea diversităţii genetice la specii de arbori din România**

**Domeniul: SILVICULTURĂ**

**Alexandru Lucian CURTU**  
**Universitatea *Transilvania* din Braşov**

**BRAŞOV, 2016**

**CUPRINS**

Cuvânt înainte .....	i
<b>(A) Summary .....</b>	<b>1</b>
<b>(B) Realizări științifice și profesionale și planuri de evoluție și dezvoltare a carierei .....</b>	<b>3</b>
<b>(B-i) Realizări științifice și profesionale .....</b>	<b>3</b>
1. Considerații introductive .....	3
1.1 Aspecte generale .....	3
1.2 Lucrări cuprinse în teza de abilitare .....	5
2. Diversitatea genetică la specii autohtone de cvercinee .....	6
2.1 Analiza comparativă a diversității genetice la stejarul brumăriu ( <i>Quercus pedunculiflora</i> K. Koch) și stejarul pedunculat ( <i>Q. robur</i> L.) .....	7
2.2 Diferențierea genetică între gârniță ( <i>Q. frainetto</i> Ten.) și stejarul pufos ( <i>Q. pubescens</i> Willd.) .....	43
2.3 Distribuția spațială a diversității genetice într-o pădure de amestec de cvercinee .....	54
2.4 Diversitatea speciilor autohtone de cvercinee la locusul <i>Dhn3</i> .....	72
2.5 Diversitatea genetică a taxonului <i>Q. virgiliana</i> Ten. în raport cu <i>Q. pubescens</i> Willd. ....	77
2.6 Diversitatea ADN-ului cloroplastic la gorunul ( <i>Q. petraea</i> (Matt.) Liebl.) și stejarul pedunculat ( <i>Q. robur</i> L.) din regiunea Moldovei .....	81
3. Diversitatea genetică la specii autohtone de conifere .....	85
3.1 Diversitatea genetică în populații de molid ( <i>Picea abies</i> L. Karst.) din România .....	85
3.2 Analize genetice în populații de brad ( <i>Abies alba</i> Mill.) afectate de fenomenul de uscare ..	95
<b>(B-ii) Planuri de evoluție și dezvoltare a carierei .....</b>	<b>101</b>
<b>(B-iii) Bibliografie .....</b>	<b>107</b>

## Cuvânt înainte

Această lucrare de sinteză nu ar fi fost posibilă fără ajutorul colegilor de la disciplina de genetică forestieră și a celor din Facultatea de Silvicultură și Exploatare Forestiere din Brașov. Înființarea și dotarea laboratorului de genetică moleculară, obținerea de proiecte de cercetare în competiții naționale, participarea în programe de cooperare internațională, precum și elaborarea articolelor științifice s-a făcut **prin munca unei echipe**. A fost astfel destul de greu să separ propria contribuție de cea a colegilor mei - oameni de mare caracter și înaltă ținută intelectuală - cu care, după finalizarea doctoratului la Universitatea Georg-August Göttingen, am lucrat împreună timp de aproape zece ani. Munca alături de colegii mei în laboratorul de genetică moleculară și pe teren, în pădurile României, de pe valea Vaserului din Maramureș până în sudul Olteniei și din pădurile Câmpiei de Vest până în pădurea de stejari seculari de pe grindul Letea din Delta Dunării, mi-a făcut o plăcere deosebită. Dacă aș putea da timpul înapoi, cu siguranță, aș alege aceeași cale. **Tuturor acestor colegi dragi le mulțumesc din suflet**. Nu voi da nume, dar sunt convins că citind această lucrare îi veți putea identifica cu ușurință. Mulțumesc, de asemenea, colaboratorilor din Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Silvicultură "Marin Drăcea", Universitatea Georg-August Göttingen, School of Forest Resources and Environmental Science - Michigan Tech, Universitatea Adam Mickiewicz, Universitatea Kazimierz Wielki, Institutul de Cercetări Biologice Cluj-Napoca, Institute of Biosciences and Bioresources Florența, Regia Națională a Pădurilor – Romsilva, Regii Publice Locale ale Pădurilor, cu care am lucrat foarte bine la realizarea multor proiecte de cercetare și publicații. Închei prin a mulțumi familiei mele pentru ajutorul și înțelegerea de care a dat dovadă în toți acești ani.

## (A) Summary

Genetic diversity is essential to the adaptive potential and long-term survival of species. The purpose of this thesis was to evaluate the patterns of genetic diversity of forest tree species in Romania by using various types of genetic markers (enzyme coding genes, PCR-RFLPs, genomic SSRs, EST-SSRs). The focus was on the understanding of the evolutionary forces responsible for causing the current distribution of genetic diversity within and among tree populations.

A lot of research has been devoted to determine the patterns of genetic diversity within and among species belonging to genus *Quercus* (oaks) that is well known for its taxonomic complexity. Differences in leaf morphology and genetic structure between *Q. robur* and its closest relative, the drought tolerant *Q. pedunculiflora*, were evaluated. The analysis of seven enzyme coding gene loci revealed a very low level of nuclear divergence and an incomplete sorting of *Q. robur* and *Q. pedunculiflora* populations according to their physical appearance. All DNA chloroplast haplotypes observed in *Q. pedunculiflora* have been detected in the *Q. robur* sample or have been previously reported in *Q. robur*. However, the two taxa were genetically separated by means of 22 highly polymorphic gSSR and EST-SSR markers. One population of each taxon was sampled at three geographic locations. In accordance with the assumption that *Q. pedunculiflora* and *Q. robur* are separate taxonomic units, all populations of the same taxon grouped together. The Bayesian analyses indicated that a genetic structure with two clusters, corresponding to *Q. pedunculiflora* and to *Q. robur*, respectively, best fits the molecular data. As expected, EST-SSR markers showed lower diversity within oak populations and higher divergence among populations and species than gSSRs. The results suggest that *Q. pedunculiflora* is an incipient species or subspecies of *Q. robur*, and that the process of ecological speciation is not yet completed.

A high and significant genetic differentiation was observed between *Q. frainetto* and *Q. pubescens*, two species of section *Dascia* that reach in Romania the margins of their natural distribution range. By using a combined set of only seven gSSR and EST-SSR markers, the vast majority of sampled individuals were genetically assigned to the cluster corresponding to their phenotype. The higher degree of admixture in *Q. frainetto* compared to *Q. pubescens* may be explained by different rates of introgressive hybridization.

The presence of fine-scale spatial genetic structure (SGS) was tested in a four-oak-species forest with contrasting species abundances and hybridization rates. A weak but significant SGS was

observed in each of the four oak species, with *Q. frainetto*, the species with the lowest density in the sampling plot, exhibiting the strongest SGS. The spatial correlogram of the total population was significantly different when hybrids were removed from the analysis, which suggests that hybridization has weakened the SGS.

A high genetic differentiation among Romanian oak species ( $F_{ST}$  values up to 0.91) was revealed at a dehydrin gene (*Dhn-3*) that is involved in plant response to environmental stress. Frequencies of the two major alleles varied markedly between four oak species (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. frainetto* and *Q. pubescens*) but not among populations within species. Only the closely related *Q. robur* and *Q. pedunculiflora* were not significantly differentiated at *Dhn-3* locus.

To test for genetic differences between the two pubescent oak species of Romania, *Q. pubescens* and *Q. virgiliana*, seven highly polymorphic gSSRs were used. A very low level of genetic differentiation was found and no statistical support for two distinct genetic entities was obtained.

Chloroplast DNA diversity was analyzed in 61 populations of *Q. robur* and *Q. petraea* in Eastern Romania. A high number of chloroplast DNA haplotypes were observed and shared by both species. Different dispersal abilities may explain the higher value of genetic differentiation among populations in *Q. petraea* than in *Q. robur*.

The level and distribution of genetic diversity at enzyme coding loci was analyzed in the most important coniferous species of Romania (*Picea abies*). Extensive gene flow may explain the very low genetic divergence among populations across Carpathians and pairs of low and high elevation populations. Genetic diversity of drought-tolerant and sensitive individuals from an ecologically marginal population of *Abies alba* was assessed using newly characterized EST-SSR markers.

My future research directions will focus on using the new genotyping and analytical tools to infer the evolutionary history of forest tree (and wild animal) populations and to address future evolution of populations in the context of environmental changes.

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

### **(B-i) Realizări științifice și profesionale**

#### **1. Considerații introductive**

##### **1.2 Aspecte generale**

Diversitatea (variația) genetică, fundamentul pe care acționează evoluția, influențează în mod determinant potențialul de adaptare al populațiilor și speciilor la mediul lor de viață (HATTEMER și GREGORIUS 1990). Cunoașterea mărimii (magnitudinii) și distribuției diversității genetice între indivizi și populații, precum și a factorilor care influențează această diversitate, reprezintă o prioritate pentru cercetările actuale și este, totodată, deosebit de utilă în acțiunea de conservare a resurselor genetice (GONZALEZ-QUEVEDO *et al.* 2015). Existența diversității genetice constituie o premisă pentru îmbunătățirea (ameliorarea) unor caracteristici de importanță adaptativă și economică și permite crearea unor varietăți superioare care să satisfacă nevoile actuale și viitoare ale societății.

Arborii, elementele definitorii ale ecosistemelor forestiere, se deosebesc de celelalte plante în primul rând prin cicluri de viață lungi și dimensiuni mari - cele mai multe substanțe organice sintetizate fiind folosite la formarea trunchiurilor. Datorită longevității foarte mari, arborii sunt expuși pe parcursul vieții unei eterogenități ridicate a mediului de viață. Totodată, multe specii de arbori ocupă teritorii întinse și cresc în condiții variate de mediu (eterogenitate spațială). Existența unui nivel foarte ridicat de diversitate genetică la speciile de arbori, în comparație cu plantele ierbacee, este pusă în legătură cu particularitățile biologice ale acestora și capacitatea lor de a supraviețui în condiții eterogene de mediu (HAMRICK și GODT 1989).

Evaluarea variației genetice la speciile de arbori forestieri s-a făcut cu precădere începând din a doua jumătate a secolului al XX-lea, atunci când au fost înființate primele culturi experimentale (de proveniențe, descendente) având la bază principii ale statisticii matematice. În aceste culturi a fost evaluată variația genetică cantitativă pentru relativ puține caracteristici adaptative și de importanță economică. Odată cu dezvoltarea tehnicilor moleculare, a devenit posibilă, în special începând cu anii '80, analiza unor gene individuale și calculul unor indici ai diversității genetice pentru populații (genetica populațiilor). A început astfel perioada de utilizare a diferitelor tipuri

de markeri genetici. Prin marker genetic se înțelege un fenotip (caracter) observabil de regulă prin tehnici moleculare, care ne oferă informații (de ex. lungimea, secvența) despre o regiune de ADN (de ex. o genă, o porțiune dintr-o genă sau o zonă care nu codifică). Cei mai utili markeri genetici sunt cei codominanți - există o corespondență univocă între stările unui fenotip și variantele (alelele) unei regiuni din genom. Foarte folosiți în genetica forestieră au fost la început markerii biochimici de tipul izoenzimelor (aloenzimelor). Pe lângă faptul că sunt codominanți și relativ ușor de observat, un mare avantaj constă în reliefaarea diferențelor la gene care codifică enzime implicate în metabolismul primar și secundar. Odată cu apariția și optimizarea reacției de polimerizare în lanț (*Polymerase Chain Reaction*, abr. PCR) s-a ajuns la analiza directă a fragmentelor de ADN și apariția markerilor moleculari (ADN).

Unii dintre cei mai folosiți markeri moleculari sunt microsateleții sau secvențele simple repetitive de ADN (engl. *simple sequence repeats*, abr. SSRs) care constau în repetarea unor secvențe foarte scurte de ADN formate de obicei din două sau trei nucleotide. Avantajul SSRs comparativ cu celelalte tipuri de markeri genetici (de ex. izoenzimele) este gradul foarte ridicat de polimorfism. Markerii genetici de tip SSRs dezvoltăți prin sondarea întregului genom și care nu au aparent nicio legătură cu regiunile din ADN care codifică informația (genele) se numesc *genomic SSRs* (abr. gSSRs). Ei se încadrează în categoria markerilor genetici anonimi. În ultimii ani, odată cu progresele înregistrate în genomică, s-a reușit dezvoltarea unei noi categorii de markeri SSRs, care sunt situați în secvențele informaționale ale genelor (exoni) exprimate în condiții particulare de mediu sau diferite stadii ontogenetice. Acești noi markeri se numesc EST (*Expressed Sequence Tag*) – SSRs și prezintă un polimorfism mai redus decât markerii de tipul SSRs (DURAND *et al.* 2010; HU *et al.* 2011; POSTOLACHE *et al.* 2014). Totuși, avantajul EST-SSRs față de gSSRs rezidă în identificarea variației din secvențele informaționale (engl. *coding DNA*) exprimate la un anumit moment dat în timp.

În România, primele date privind variația genetică a unor caracteristici de interes economic și adaptativ la specii autohtone de arbori (de ex. creșteri, rezistența la boli și dăunători) au fost obținute în culturi experimentale instalate începând cu anii '70 ai secolului trecut (BLADA și POPESCU 2007; ENESCU și CONTESCU 1984; MIHAI *et al.* 2008; PÂRNUȚĂ 2010; SOFLETEA *et al.* 2012). Primele evaluări ale diversității genetice pentru populații de arbori din România, cu ajutorul markerilor genetici, au fost făcute în laboratoare din străinătate și s-au limitat la câteva specii de interes european (de ex. GOMORY *et al.* 2003; HEUERTZ *et al.* 2003; PETIT *et al.* 2002b; ZANETTO și KREMER 1995). Până în anul 2006 nu existau decât informații sporadice privind mărimea și distribuția geografică a diversității genetice la specii autohtone de arbori, ceea ce a justificat, o dată cu înființarea unor laboratoare de genetică moleculară în țară, inițierea unor

cercetări de genetica populațiilor pe scară largă, care să abordeze și tematica diversității și diferențierii genetice la specii de arbori foarte asemănătoare din punct de vedere morfologic, inclusiv la taxoni al căror statut de specie este pus sub semnul întrebării.

Prin specie, unitatea biologică și taxonomică fundamentală, se înțelege un grup de populații naturale izolate reproductiv de alte asemenea grupuri (MAXIMILIAN și IOAN 1984). În prezent, acesta este cel mai răspândit concept cu privire la termenul de specie, fiind cunoscut și sub numele de *conceptul speciei biologice* (MAYR 1942). Indivizii unei specii sunt interfecunzi, asemănători prin caracterele morfologice și însușirile fiziologice, iar prin încrucișarea între ei dau naștere la descendenți fertili (DANCIU și PARASCAN 2002). Izolarea reproductivă, elementul cheie în conceptul de specie biologică, nu trebuie să excludă complet existența fluxului genic interspecific, care poate avea loc cu intensități variabile, de regulă foarte reduse, și în situații particulare (CURTU *et al.* 2009a; LEPAIS *et al.* 2009), fără însă să conducă la o uniformizare a structurilor genetice ale celor două entități (specii). Prin subspecie sau rasă geografică se înțelege un grup de indivizi din cadrul unei specii care ocupă o regiune dată, se încrucișează mai frecvent între ei decât cu alți membri ai speciei și se aseamănă între ei prin mai multe caractere (DANCIU și PARASCAN 2002; MAXIMILIAN și IOAN 1984).

## 1.2 Lucrări cuprinse în teza de abilitare

Majoritatea rezultatelor din teză au fost publicate în reviste recenzate sau au fost prezentate cu ocazia unor sesiuni, simpozioane și congrese internaționale (de ex. IUFRO Congress, World Forestry Congress). În continuare sunt enumerate cele mai reprezentative lucrări, care conțin rezultate obținute după obținerea doctoratului și care sunt publicate în limba engleză **în reviste cotate ISI cu factor de impact**. Lista completă de publicații este atașată ca anexă la această teză. Lucrarea conține și rezultate care se găsesc în faza de publicare sau de pregătire pentru publicare.

- **Curtu, A. L.**, I. Crăciunesc, C. Enescu, A. Vidalis, and N. Șofletea. 2015. Fine-scale spatial genetic structure in a multi-oak-species (*Quercus* spp.) forest. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 8:324-332.
- Crăciunesc, I., B. Vornam, L. Leinemann, R. Finkeldey, N. Șofletea, and **A. L. Curtu**. 2015. High genetic differentiation among European white oak species (*Quercus* spp.) at a dehydrin gene. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 43:582-588.
- **Curtu, A. L.**, N. Șofletea, A. V. Toader, and M. C. Enescu. 2011. Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus robur* L. and its closest relative, the drought tolerant *Quercus pedunculiflora* K. Koch. *Annals of Forest Science* 68:1163-1172.



- **Curtu, A. L.**, I. C. Moldovan, M. C. Enescu, I. Crăciunesc, and N. Șofletea. 2011. Genetic differentiation between *Quercus frainetto* Ten. and *Q. pubescens* Willd. in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 39:275-282.
- **Curtu, A. L.**, N. Șofletea, R. Radu, A. Bacea, I. V. Abrudan, A. Butiuc-Keul, and S. Farcas. 2009. Allozyme variation of coniferous tree species from Maramures Mountains, Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 37:245-251.
- Enescu, C. M., **A. L. Curtu**, and N. Șofletea. 2013. Is *Quercus virgiliana* a distinct morphological and genetic entity among European white oaks? *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37:632-641.
- Gailing, O. and **A. L. Curtu**. 2014. Interspecific gene flow and maintenance of species integrity in oaks. *Annals of Forest Research* 57:5-18.
- Radu, R. G., **A. L. Curtu**, G. Spârchez, and N. Șofletea. 2014. Genetic diversity of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] in Romanian Carpathians. *Annals of Forest Research* 57:19-29.
- Moldovan, I. C., N. Șofletea, **A. L. Curtu**, I. V. Abrudan, D. Postolache and F. Popescu. 2010. Chloroplast DNA diversity of oak species in Eastern Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 38: 301-307

## 2. Diversitatea genetică la specii autohtone de cvercinee

Delimitarea speciilor pe criterii morfologice este în multe cazuri un demers dificil (DE QUEIROZ 2007). Spre exemplu, în cazul cvercineelor (genul *Quercus*, familia Fagaceae) au existat întotdeauna păreri diferite cu privire la numărul de specii (RUSHTON 1993). În ultimii ani, analizele genetice au fost folosite din ce în ce mai des pentru clarificarea statutului taxonomic (MUIR *et al.* 2000). Dacă speciile s-au format recent sau procesul de speciație este în desfășurare, diferențierea între taxoni la nivel fenotipic și genetic este încă foarte redusă. Adeseori, diferențele morfologice se reduc la câteva caractere ale frunzelor și florilor (ca de ex. în cazul cvercineelor SCHWARZ 1993), în timp ce diferențele la nivel genetic se restrâng la câteva regiuni aflate sub acțiunea selecției (TURNER și HAHN 2007).

În prezent, cvercineele ocupă în România 1,22 ±4% mil. ha (aproximativ 16% din suprafața vegetației forestiere) și prezintă un volum de 316 mil. m<sup>3</sup> (aprox. 14% din volumul total de lemn pe picior), conform celor mai recente date comunicate de Inventarul Forestier Național ([www.roifn.ro](http://www.roifn.ro)). În România se găsesc șapte specii de cvercinee (DONIȚĂ *et al.* 2004; ȘOFLETEA și CURTU 2007) – Tab. 2-1.

**Tabelul 2-1** Încadrarea sistematică a speciilor autohtone de cvercinee (SCHWARZ 1937; STĂNESCU *et al.* 1997)

Gen	Subgen	Secția	Seria	Specia și subspecia
<i>Quercus</i>	<i>Lepidobalanus</i>	<i>Roburoides</i>	<i>Sessiliflorae</i>	<i>Q. petraea</i> (Matt.) Liebl. ssp. <i>petraea</i> (Liebl.) Soó
				<i>Q. petraea</i> ssp. <i>dalechampii</i> (Ten.) Soó
				<i>Q. petraea</i> ssp. <i>polycarpa</i> (Schur.) Soó
		<i>Robur</i>	<i>Pedunculatae</i>	<i>Q. robur</i> L.
				<i>Q. pedunculiflora</i> K. Koch.
<i>Dascia</i>	<i>Confertae</i>	<i>Q. frainetto</i> Ten.		
		<i>Lanuginosae</i>	<i>Q. pubescens</i> Willd. <i>Q. virgiliana</i> Ten.	
	<i>Cerris</i>	<i>Eucerris</i>	<i>Cerrides</i>	<i>Q. cerris</i> L.

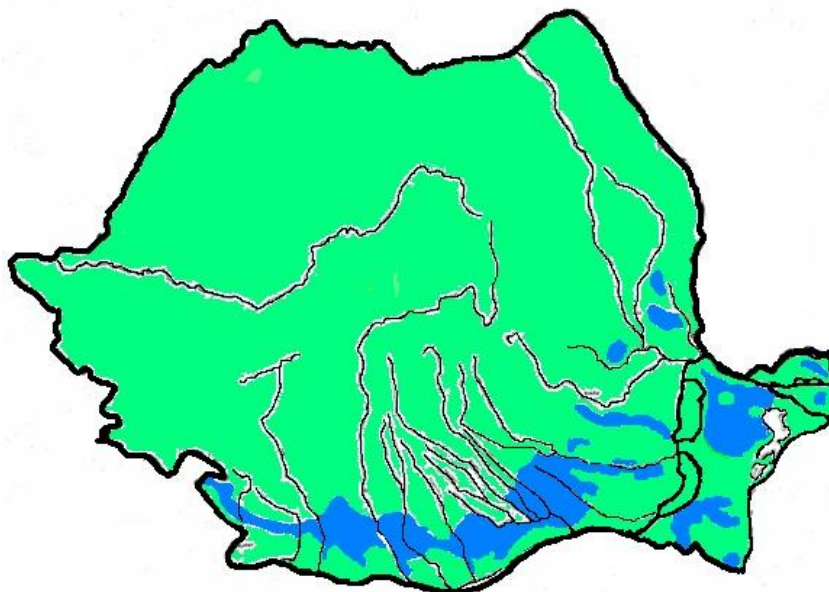
Cinci din cele șapte specii autohtone (gorunul - *Q. petraea* (Matt.) Liebl., stejarul pedunculat - *Q. robur* L., gârnița - *Q. frainetto* Ten., stejarul pufos - *Q. pubescens* Willd. și cerul - *Q. cerris* L.) prezintă particularități morfologice evidente iar statutul lor de specie nu este pus în discuție. În cazul stejarului brumăriu - *Q. pedunculiflora* K. Koch., dar mai ales al stejarului italian - *Q. virgiliana* Ten., statutul de specie este pus sub semnul întrebării, în special de autori din străinătate (de ex. în PETIT *et al.* 2002b).

## 2.1 Analiza comparativă a diversității genetice la stejarul brumăriu (*Quercus pedunculiflora* K. Koch) și stejarul pedunculat (*Q. robur* L.)

### Introducere

Prima mențiune privind prezența stejarului brumăriu (*Q. pedunculiflora* K. Koch) în România a fost făcută de către botanistul Al. Borza, în anul 1936 (BORZA 1936), astfel încât, ulterior, au fost delimitate din arealul stejarului pedunculat (*Q. robur* L.) trupurile de pădure atribuite până la vremea respectivă acestuia în stațiuni din silvostepa Olteniei și Munteniei, în sud-estul Moldovei, Dobrogea și în Basarabia (GEORGESCU și CRETZOIU 1941; GEORGESCU *et al.* 1942)

(Fig. 2-1). Se extinde astfel până în țara noastră arealul stejarului brumariu descris de către monograful stejarilor europeni, O. Schwartz (SCHWARZ 1937).



**Fig. 2-1** Arealul stejarului brumăriu (cu albastru) în România (prelucrare după GEORGESCU *et al.* 1942)

Deși *Q. pedunculiflora* este evidențiat ca specie de sine stătătoare în cele mai multe lucrări publicate în Grecia, Serbia, România (CIOCĂRLAN 2000; DONIȚĂ *et al.* 2004), inclusiv în ultima ediție a Florei Europaea (SCHWARZ 1993), există și opinia că acesta ar reprezenta o unitate intraspecifică (ecotip, subspecie) a stejarului pedunculat (KLEINSCHMIT *et al.* 1995; STEINHOFF 1997). În sprijinul acestei afirmații, STEINHOFF (1997) invocă argumentul interfertilității între stejarul brumăriu și stejarul pedunculat. Totuși, în Monografia stejarilor din România (GEORGESCU și MORARIU 1948), în care se descriu și formele hibridogene indentificate în țara noastră între speciile autohtone de stejari, nu se evidențiază existența hibridului natural dintre stejarul pedunculat și stejarul brumăriu. Încadrarea taxonomică a stejarului brumăriu ca unitate intraspecifică pendinte de *Q. robur* apare însă într-o serie de lucrări publicate în literatura de specialitate, de cele mai multe ori fiind nominalizat ca *Q. robur* ssp. *pedunculiflora* (BROSHTILOV 2006; DAVIS 1965; MENITSKY 2005). Formele tipice ale acestuia au mai fost specificate și sub denumirile de *Q. pedunculata* var. *pedunculiflora* sau *Q. pedunculata* ssp. *pedunculiflora*. Broshtilov (2006) precizează că, în Bulgaria, nu a identificat diferențe cantitative și morfologice semnificative între cele două edafotipuri mai des întâlnite: *Q. robur* ssp. *longipes* și *Q. robur* ssp. *pedunculiflora* (CURTU *et al.* 2009c).

În acest context, cercetările abordează tematica statutului taxonomic al stejarului brumăriu, pe baza datelor obținute din analize morfologice și genetice comparative în populații autohtone de stejar brumăriu și stejar pedunculat (CURTU *et al.* 2011b). Este pentru prima dată în România și foarte probabil în Europa când s-au făcut investigații de natură genetică, utilizând markeri de diferite tipuri, la stejarul brumăriu, prin comparație cu stejarul pedunculat. Obiectivul principal a fost diferențierea genetică a stejarului brumăriu de stejarul pedunculat. S-au analizat atât regiuni ale genomului nuclear (gene care codifică enzime, secvențe simple repetitive situate în interiorul și în afara genelor – EST-SSRs și gSSRs), cât și ale genomului cloroplastic (fragmente de lungimi mari care au fost „tăiate” cu enzime de restricție). În cazul markerilor moleculari s-au comparat valorile diversității genetice estimate pentru regiuni localizate în transcriptom (EST-SSRs) și respectiv în afara genelor (gSSRs).

### **Material și metode de cercetare**

*Cercetările morfologice* au fost efectuate pe material recoltat din șapte populații de stejar pedunculat și șapte de stejar brumăriu. De asemenea, au fost eșantionate exemplare din ambii taxoni în pădurea Letea (Tab. 2-2). Din fiecare populație s-au recoltat frunze complet dezvoltate de la 50-55 de arbori situați la 30-50 m unul de altul. Pentru fiecare arbore s-au analizat câte trei frunze, care au fost scanate și măsurate cu software-ul WinFolia, fiind evaluați cantitativ sau calitativ 14 descriptori, după metodologia utilizată de Kremer *et al.* (2002). Descriptorii analizați se regăsesc și în alte studii morfologice efectuate la stejari (BACILIERI *et al.* 1995; BRUSCHI *et al.* 2000). Cei 14 descriptori ai frunzelor sunt: LL (lungimea laminei), PL (lungimea pețiolului), LW (mărimea lobului principal), SW (adâncimea sinului principal), WP (lungimea de la baza laminei la vârful lobului situat în zona de lățime maximă), NL (numărul de lobi), NV (numărul de nervuri intercalare), BS (forma bazei frunzei, evaluată după o scară de la 1 la 9), PU (pubescenta pe dosul laminei, evaluată după o scară cu 7 trepte de intensitate). La descriptorii anteriori se adaugă cinci caracteristici calculate (OB, PR, LDR, PV și LWR). În total au fost măsurate 2400 frunze. Setul de date obținut pentru cele șapte populații pure de *Q. robur* și respectiv șapte populații pure de *Q. pedunculiflora* a fost folosit pentru construcția unei funcții discriminante folosind pachetul software STATISTICA v.8 (STATSOFT 2008).

**Tabelul 2-2** Localizarea geografică și condițiile climatice pentru populațiile de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* eșantionate (din CURTU *et al.* 2011b)

Abreviere	Populația	Județul	Latitudinea N	Longitudinea E	Altitudinea (m)	Pa	Ps	T	MTH	MTC
<i>Populații de Q. robur</i>										
R-NOR	Noroieni	Satu Mare	47° 52'	22° 55'	120	670	410	9.5	19.5	-2.5
R-PAU	Păunoaia	Prahova	44° 45'	25° 58'	150	588	361	10.6	22.8	-3.1
R-CEN	Cenușa	Iași	47° 03'	27° 14'	300	550	364	9.1	20.1	-3.8
R-DAC	Dacia	Brașov	45° 58'	25° 06'	540	690	430	8.4	18.0	-4.0
R-BAZ	Bazoș	Timișoara	45° 45'	21° 30'	98	625	356	10.9	21.6	-1.2
R-VAM	Vânju Mare	Mehedinți	44° 26'	22° 50'	89	570	327	11.5	22.7	-1.5
R-RES	Reșca	Olt	44° 10'	24° 25'	75	540	330	10.6	23.3	-2.0
<i>Populații de Q. pedunculiflora</i>										
P-BRC	Braniștea Catârilor	Olt	43° 53'	24° 14'	65	550	300	11.2	23.3	-2.0
P-CIO	Ciornuleasa	Călărași	44° 13'	26° 45'	60	445	307	11.0	22.0	-3.0
P-URZ	Urziceni	Ialomița	44° 32'	26° 49'	60	470	300	10.8	22.0	-2.5
P-SNA	Snagov	Ilfov	44° 37'	26° 21'	90	540	330	11.2	22.5	-2.9
P-BAN	Băneasa	Constanța	44° 03'	27° 53'	110	470	260	11.3	23.0	-1.4
P-PUN	Punghina	Mehedinți	44° 15'	22° 50'	50	570	327	11.5	23.4	-1.5
P-VIS	Viișoara	Brăila	44° 52'	27° 39'	30	500	285	10.5	22.3	-2.3
<i>Pădure de amestec cu Q. robur și Q. pedunculiflora</i>										
LT	Letea	Tulcea	45° 20'	29° 31'	5	380	220	11.4	22.0	-0.5

Pa, precipitații medii anuale (mm); Ps, precipitații în timpul sezonului de vegetație (mm); T, temperatura medie anuală (°C); MTH, temperatura medie anuală a lunii celei mai calde (°C); MTC, temperatura medie anuală a lunii celei mai reci (°C). Datele climatice provin de la cea mai apropiată stație meteorologică.

*Cercetările cu ajutorul markerilor genetici* au cuprins analize de: 1 - aloenzime; 2 - ADN cloroplastic (ADNcp); 3 –ADN nuclear (gSSRs și EST-SSRs).

*Aloenzimele* au fost analizate după procedurile standard de electroforeză orizontală pe gel de amidon (MÜLLER-STARCK *et al.* 1996; ZANETTO *et al.* 1996). În total, s-au testat 11 sisteme enzimatice, dintre care s-au reținut șapte care au prezentat zimograme interpretabile (codul Enzyme Commission și gena care codifică sunt precizate în paranteză): aspartat-aminotransferaza (2.6.1.1; *Aat-B*), izocitrat-dehidrogenaza (1.1.1.42, *Idh-B*), menadion-reductaza

(1.6.99.2; *Mnr-A*), 6-fosfogluconat-dehidrogenaza (5.3.1.9; *6-Pgdh-B*), fosfoglucozo-izomeraza (5.3.1.9; *Pgi-B*), fosfoglucomutaza (2.7.5.1; *Pgm-A*), și sikimat-dehidrogenaza (1.1.1.25; *Skdh-A*). Cei șapte loci care codifică enzimele au prezentat un mod de transmitere Mendelian în încrucișările controlate (MÜLLER-STARCK *et al.* 1996; ZANETTO *et al.* 1996). Alelele au fost denumite în funcție de rata relativă de migrare a enzimelor în electroforeză. La fiecare locus, valoarea 100 a fost atribuită celei mai frecvente alele. Detalii privind metodologia de lucru folosită sunt prezentate în TOADER *et al.* (2009b).

*Analizele de ADN cloroplastic* au avut ca scop evidențierea haplotipurilor existente în populațiile eșantionate pentru cei doi taxoni. Ținându-se cont de variabilitatea intrapopulațională redusă evidențiată la nivelul ADN-ului cloroplastic, s-au analizat numai cinci arbori pentru fiecare din cele 16 populații eșantionate (8 de stejar pedunculat și 8 de stejar brumăriu). Izolarea ADN-ului s-a făcut urmând un protocol de lucru optimizat pentru condițiile noastre de laborator (TOADER *et al.* 2009a). Utilizându-se metodologia folosită în alte studii efectuate în Europa (BORDÁCS *et al.* 2002; PETIT *et al.* 2002b), s-au amplificat patru fragmente polimorfice de ADN din genomul cloroplastic care au fost ulterior „tăiate” cu enzime de restricție: *psaA-trnS* (AS) cu *HinfI*, *trnD-trnT* (DT) cu *TaqI*, *trnC-trnD* (CD) cu *TaqI*, și *trnT-trnF* (TF) cu *HinfI*. Fragmentele de ADN rezultate au fost vizualizate pe geluri de poliacrilamidă, de concentrație 8%, și colorate cu SYBR Gold (*Molecular Probes*). Nomenclatura haplotipurilor cloroplastice este cea folosită la nivel european (PETIT *et al.* 2002b). Haplotipurile cloroplastice a căror combinație de fragmente nu s-a potrivit exact cu modelele existente au fost denumite după cele care au fost cele mai asemănătoare cu adăugarea semnului de prim (de ex. haplotipul 15').

*Analizele de ADN nuclear.* În primă fază au fost testate aproximativ 40 de regiuni de ADN nuclear care conțin repetări de secvențe simple (gSSRs și EST-SSRs) pe un număr redus de arbori. S-au testat markeri genetici care diferențiază specii de cvercinee europene (GUICHOUX *et al.* 2011; LEPAIS *et al.* 2006; LEPAIS *et al.* 2009; NEOPHYTOU *et al.* 2010) sau care au fost dezvoltati recent din secvențe informaționale (DURAND *et al.* 2010). În final au rămas 22 de regiuni repetitive de ADN nuclear care nu au prezentat erori de amplificare sau alele nule. SSRs analizate pe întreg materialul existent sunt localizate pe 10 din cei 12 cromozomi (grupe de linkage) ai stejarului (Tab. 2-3). Reacțiile de amplificare au fost de tip *multiplexing* (un set de 3-4 SSRs amplificat într-o singură reacție). În total, cele 22 SSRs au fost grupate în șase seturi (Tab. 2-3). Primeri „înainte” au fost marcați cu un colorant fluorescent 6-carboxy-fluorescine (FAM) sau hexachloro-6-carboxy-fluorescine (HEX). Pentru cele șapte EST-SSRs identificate și caracterizate la Universitatea Göttingen (abr. GOT) s-a folosit primerul universal M13 cu

secvența 5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3' (SCHUELKE 2000) care a fost marcat cu FAM.

Reacția de polimerizare în lanț (PCR) s-a efectuat într-un volum de 14 μl care a inclus: aproximativ 10 ng ADN; 1x PCR buffer (0.8 M Tris-HCl pH 9.0, 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 % w/v Tween-20; Solis BioDyne, Tartu, Estonia); 2.6 mM of MgCl<sub>2</sub>; 0.17 mM of each dNTP; 0.36 μM pentru fiecare primer; 1U *Taq* DNA polymerase (HOT FIREPol DNA Polymerase, Solis BioDyne, Tartu, Estonia). Programul a constat din: pasul 1 -15 minute denaturare la 95 °C; pasul 2 - 30 de cicluri cu 45 s denaturare la 94 °C, 1 min. hibridare la 55 °C și 45 s elongare la 72 °C; pasul 3 - elongare la 72 °C pentru 20 min.

Pentru markerii de tip GOT s-a folosit metoda *nested PCR* și primerul universal M13 (SCHUELKE 2000). Volum total a fost de 14 μl și a inclus: aproximativ 10 ng ADN; 1x PCR buffer (0.8 M Tris-HCl pH 9.0, 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 % w/v Tween-20; Solis BioDyne, Tartu, Estonia); 2.6 mM of MgCl<sub>2</sub>; 0.17 mM of each dNTP; 0.07 μM pentru fiecare primer forward; 0.18 μM pentru primerul reverse, 0.54 μM pentru primerul universal M13, 1U *Taq* DNA polymerase (HOT FIREPol DNA Polymerase, Solis BioDyne, Tartu, Estonia). Programul a constat din: pasul 1 - 15 minute denaturare la 95 °C; pasul 2 - 30 de cicluri cu 30 s denaturare la 94 °C, 45 s hibridare la 56 °C și 45 s elongare la 72 °C; pasul 3 - 8 cicluri cu 30 s denaturare la 94 °C, 45 s hibridare la 53 °C și 45 s elongare la 72 °C; pasul 4 - elongare la 72 °C pentru 10 min.

Amplificarea s-a realizat cu Biometra Thermal Cycler (Analytik Jena), pentru ambele tipuri de reacții. Determinarea lungimii fragmentelor amplificate prin reacția de polimerizare de fragment (în pb – perechi de baze) s-a efectuat cu ajutorul secvențiatorul automat ABI Prism 3100 și pachetelor software GeneScan version 3.7 și GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA). S-a utilizat o scară internă de tip GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, USA).

**Tabelul 2-3** Caracteristicile secvențelor simple repetitive (SSRs) utilizate. LG – grupul linkage, pb – perechi de baze.

Locus (Marker)	Set	Tip	Sursa	LG	Colorant fluorescent	Unitatea de repetare	Mărimea (pb)
QrZAG7			(KAMPFER <i>et al.</i> 1998)	2	FAM	TG	113-163
QpZAG9			(STEINKELLNER <i>et al.</i> 1997)	7	HEX	AG	181-268
QrZAG11	1		(KAMPFER <i>et al.</i> 1998)	10	FAM	TC	241-305
QpZAG110			(STEINKELLNER <i>et al.</i> 1997)	8	FAM	AG	196-254
QrZAG112			(KAMPFER <i>et al.</i> 1998)	12	FAM	GA	72-130
QrZAG96	2	gSSR	(KAMPFER <i>et al.</i> 1998)	10	HEX	TC	136-178
MsQ13			(DOW <i>et al.</i> 1995)	6	FAM	GA	189-251
QpZAG15			(STEINKELLNER <i>et al.</i> 1997)	9	FAM	AG	99-143
QrZAG87	3		(KAMPFER <i>et al.</i> 1998)	2	HEX	TC	95-185
QpZAG1/5			(STEINKELLNER <i>et al.</i> 1997)	7	FAM	GT și GA	126-188
QrZAG20			(KAMPFER <i>et al.</i> 1998)	1	HEX	TC	157-213
PIE239				NA	FAM	AT	78-106
PIE227	4			6	FAM	TGG	149-174
PIE215				12	HEX	GAG	191-218
PIE223				2	FAM	GGT	199-223
GOT009				12		TC	241-269
GOT021	5	EST-SSR	(DURAND <i>et al.</i> 2010)	3		AT	111-141
GOT045				10		CT	143-166
GOT062				NA	FAM-M13	CTG	189-225
GOT032				12		AT	156-192
GOT037	6			5		CT	261-313
GOT061				10		CTG	241-262



*Analiza statistică a datelor*

Pentru fiecare locus și populație au fost calculați indicii de bază ai diversității genetice cu ajutorul pachetului software GenAlEx versiunea 6.3 și 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006). Pentru genele care codifică enzime s-au evidențiat și alelele specifice (i.e. care se găsesc la un singur taxon). Testarea semnificației diferențelor între valorile indicilor de diversitate estimați pe baza SSRs s-a făcut cu ajutorul testului *t* Student. Partiționarea variației genetice între taxoni (specii), populații și indivizii unei populații s-a efectuat cu ajutorul analizei varianței moleculare (AMOVA) și cu ajutorul pachetelor software ARLEQUIN software version 3.5.1.2 (EXCOFFIER *et al.* 2005) și GenAlEx versiunea 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006). Dendrogramele au fost construite cu algoritmul UPGMA (an unweighted pair group method arithmetic average) și cu ajutorul pachetelor software MEGA version 4 (TAMURA *et al.* 2007) și POPULATION 1.2.31 (LANGELLA 2000). Frecvența relativă a haplotipurilor de ADN cloroplastic și indicii statistici specifici datelor de ADN extranuclear au fost calculați cu pachetul software HAPLODIV (PONS și PETIT 1995). Mai multe amănunte privind analizele statistice pentru genele care codifică enzime și ADNcp sunt disponibile în CURTU *et al.* 2011.

Testul de apartenență genetică (PAETKAU *et al.* 1995) disponibil în programul GenAlEx v. 6.4 a fost folosit pentru alocarea indivizilor pe specii. Fiecărui individ i-a fost atribuită o probabilitate de a aparține uneia dintre specii. Această probabilitate a fost calculată pornind de la frecvențele relative ale alelelor la specia respectivă.

Pentru determinarea structurii genetice s-a folosit analiza Bayesiană și software-ul STRUCTURE vers. 2.3.4 (PRITCHARD *et al.* 2000). S-a utilizat procedura *blind* în care nu se furnizează nicio informație despre apartenența la o specie pe baza caracterelor morfologice sau localizării geografice. Pentru fiecare valoare a lui  $K$ , numărul posibil de grupe genetice (1..10), s-au efectuat 10 rulări independente. S-a folosit de fiecare dată opțiunea frecvenței corelate a alelelor (FALUSH *et al.* 2003). Fiecare rulare a constat din 100.000 de pași *burn-in* urmați de 100.000 de iterații. Pentru estimarea celei mai probabile valori a lui  $K$ , numărul de grupe genetice omogene (specii), s-au folosit două metode. Prima metodă constă în calculul valorii maxime a *log likelihood of the multilocus genotype data*,  $\ln \Pr(X|K)$ , iar a doua a presupus determinarea valorii *ad hoc*  $\Delta K$  care se bazează pe rata de schimbare a *log probability of data*,  $L(K)$ , între valori succesive ale lui  $K$  (EVANNO *et al.* 2005). Pachetul software STRUCTURE HARVESTER (EARL 2011) a fost utilizat pentru estimarea valorii  $\Delta K$ .

## Rezultate

### *Morfologia frunzei*

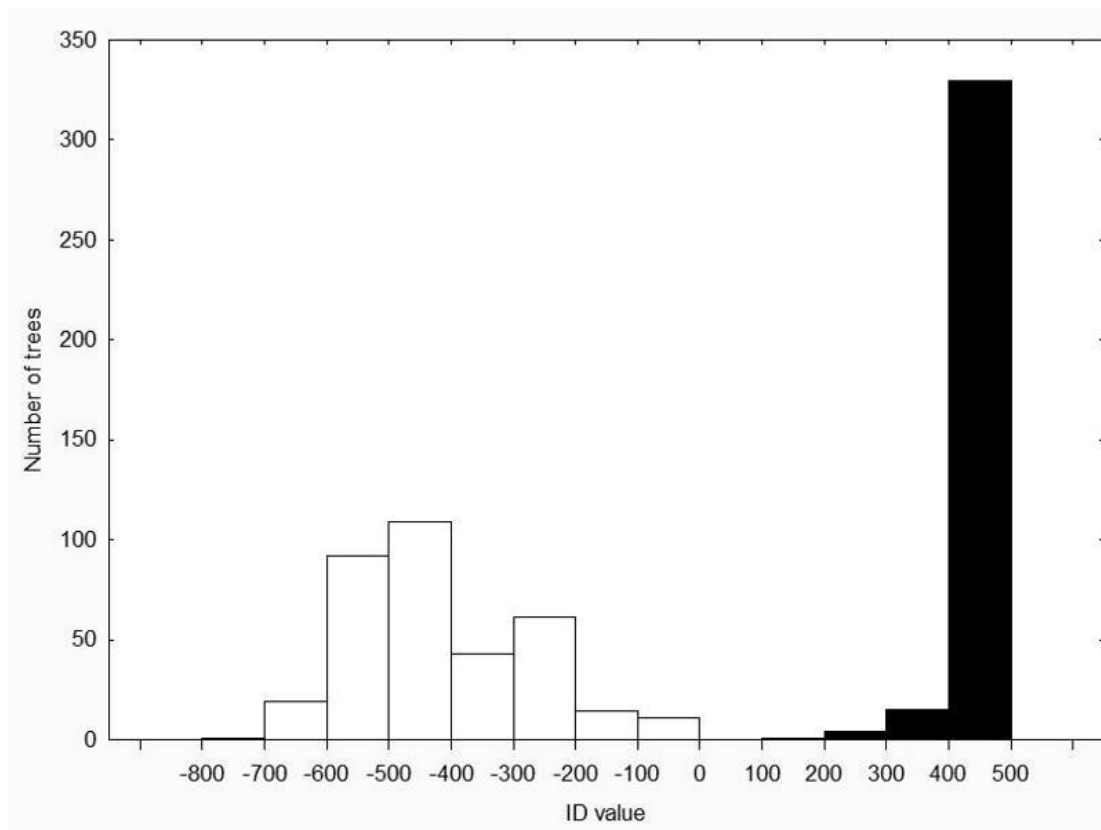
Numai una din cele cinci variabile dimensionale (lungimea pețiolului) a prezentat diferențe semnificative ( $P < 0.05$ ) între populațiile de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* (Tab. 2-4). Diferențele dintre cei doi taxoni au fost mai evidente în cazul variabilelor observate. Astfel, frunzele de *Q. pedunculiflora* au prezentat întotdeauna peri pe dos, spre deosebire de cele de *Q. robur* care au fost glabre sau glabrescente (Tab. 2-4).

**Tabelul 2-4** Valorile mediei și abaterii standard (SD) pentru 14 descriptori ai frunzelor (CURTU *et al.* 2011b). P - probabilitatea. Valorile semnificative ( $P < 0.05$ ) sunt evidențiate cu caractere îngroșate (bold).

Descriptor	<i>Q. robur</i>		<i>Q. pedunculiflora</i>		P
	media	SD	media	SD	
Lungimea laminei (mm)	116.91	±9.72	123.29	±11.20	0.28
Lungimea pețiolului (mm)	6.03	±0.84	8.33	±0.67	<b>0.00</b>
Lățimea lobului (mm)	37.73	±3.50	40.69	±3.86	0.16
Adâncimea sinului (mm)	14.29	±1.52	13.14	±1.68	0.20
Lungimea laminei până la lățimea maximă (mm)	69.80	±5.16	72.03	±7.77	0.54
Forma bazei frunzei	8.26	±0.33	7.65	±0.35	<b>0.00</b>
Pubescența pe dosul frunzei	1.01	±0.03	4.62	±0.09	<b>0.00</b>
Numărul de lobi	10.06	±0.60	9.95	±0.66	0.72
Numărul de nervuri intercalare	4.17	±0.69	4.28	±0.24	0.70
Forma laminei	59.69	±2.23	58.25	±1.48	0.18
Raportul pețiolului	4.99	±0.82	6.41	±0.69	<b>0.00</b>
Raportul adâncimii lobului	61.35	±2.25	67.15	±2.61	<b>0.00</b>
Procentajul nervației	42.15	±6.32	43.97	±2.33	0.48
Raportul lățimii lobului	32.36	±1.69	33.13	±0.81	0.29

Auriculele de la baza laminei au fost mai mici în cazul populațiilor de *Q. pedunculiflora*. Două variabile composite au prezentat de asemenea diferențe semnificative. Prima variabilă, raportul pețiolului, este direct corelată cu lungimea pețiolului (mai mic la *Q. robur*) iar cea de-a doua, raportul adâncimii lobului, a indicat valori mai mari pentru populațiile de *Q. pedunculiflora*, ceea ce înseamnă că frunzele acestui taxon au sinuri mai adânci comparativ cu cele de *Q. robur*.

Analiza discriminantă a indicat că pubescenta pe dosul frunzei contribuie în cea mai mare măsură la diferențierea morfologică între cei doi taxoni. Alte caracteristici care prezintă diferențe sunt, în ordine descrescătoare: lungimea pețiolului, lățimea lobului, baza laminei și forma laminei. Pe baza primelor două variabile s-a construit o funcție discriminantă între cei doi taxoni:  $ID = 686 - (228 \times PU) - (5.8 \times PL)$ . Această funcție dă valori pozitive pentru *Q. robur* și valori negative pentru *Q. pedunculiflora* (Fig. 2-2). Funcția discriminantă a fost folosită pentru clasificarea arborilor de stejar eșantionați pe grindul Letea din Delta Dunării (CURTU *et al.* 2011b).



**Fig. 2-2** Distribuția valorilor funcției discriminante pentru *Q. pedunculiflora* (culoare albă) și *Q. robur* (culoare neagră)

*Analiza aloenzimelor*

Cele șapte gene care codifică enzime au fost polimorfe în toate populațiile de stejar analizate. În total au fost observate 41 de alele (Tab. 2-5). Cele mai frecvente alele sunt aceleași la ambii taxoni. Au fost identificate patru alele specifice (frecvență $\leq$ 0.03) pentru *Q. robur* și cinci alele specifice pentru *Q. pedunculiflora*. Singura alelă specifică care a fost detectată în toate populațiile de *Q. robur* este alela *Pgi-B-129*, în timp ce, alte alele specifice au fost găsite numai în minim două și maxim cinci populații de *Q. robur* (Tab. 2-5). Niciuna din alelele specifice pentru *Q. pedunculiflora* nu a fost detectată în toate cele șapte populații pure de *Q. pedunculiflora*.

**Tabelul 2-5** Frecvențele relative medii ale alelelor la fiecare locus pentru *Q. robur* și *Q. pedunculiflora*. Alelele specifice unei specii sunt cu caractere îngroșate.

Locus genic	Alela	<i>Q. robur</i>	<i>Q. pedunculiflora</i>
<i>Idh-B</i>	139	0.000	<b>0.006</b>
	118	0.408	0.522
	105	0.000	<b>0.005</b>
	100	0.587	0.458
	82	0.000	<b>0.001</b>
	74	0.005	0.007
<i>Pgm-A</i>	130	<b>0.005</b>	0.000
	115	0.458	0.298
	100	0.488	0.682
	83	0.018	0.008
	75	0.030	0.012
<i>6-Pgdh-B</i>	124	0.009	0.002
	110	0.034	0.025
	100	0.941	0.945
	88	0.014	0.002
	52	0.001	0.025

**Tabelul 2-5** (continuare) Frecvențele relative medii ale alelelor la fiecare locus pentru *Q. robur* și *Q. pedunculiflora*

<i>Skdh-A</i>	113	0.017	0.013
	105	0.008	0.011
	100	0.956	0.933
	95	0.000	<b>0.008</b>
	93	0.018	0.032
	88	0.000	<b>0.003</b>
<i>Mnr-A</i>	144	0.016	0.002
	122	0.009	0.023
	100	0.913	0.952
	78	0.040	0.016
	63	0.004	0.004
	22	0.019	0.004
<i>Pgi-B</i>	160	0.006	0.005
	129	<b>0.030</b>	0.000
	123	0.002	0.015
	117	0.001	0.006
	100	0.954	0.952
	71	<b>0.002</b>	0.000
<i>Aat-B</i>	37	0.005	0.023
	120	<b>0.008</b>	0.000
	108	0.006	0.023
	100	0.929	0.899
	90	0.017	0.020
	85	0.032	0.041
	79	0.008	0.016

Numărul mediu de alele pe locus a variat între 3,00 și 3,86 pentru populațiile de *Q. robur* și respectiv între 2,86 și 3,86 în populațiile de *Q. pedunculiflora*. Media numărului de alele pe locus a fost ușor mai ridicată pentru *Q. robur* comparativ cu *Q. pedunculiflora* (Tab. 2-6). Aceeași tendință a fost observată și pentru numărul efectiv de alele ( $A_e$ ). Valoarea heterozigoției observate ( $H_o$ ) a fost aceeași în cazul ambilor taxoni. Diferențe semnificative ( $P < 0.05$ ) față de frecvențele de echilibru Hardy-Weinberg au fost observate numai în trei din cele 56 de cazuri

posibile. Atât *Q. robur*, cât și *Q. pedunculiflora*, au prezentat în medie un deficit foarte scăzut de heterozigoți, acesta variind de la o populație la alta (Tab. 2-6).

**Tabelul 2-6** Diversitatea genetică estimată pe baza a șapte loci genici care codifică enzime

Populația	N	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	F	
R-NOR	56	3.000	1.418	0.247	-0.023	
R-PAU	55	3.286	1.420	0.210	-0.014	
R-CEN	54	3.429	1.378	0.206	0.003	
R-DAC	53	3.571	1.440	0.240	0.014	
R-BAZ	52	3.143	1.368	0.209	0.008	
R-VAM	55	3.857	1.395	0.200	0.030	
R-RES	55	3.429	1.414	0.244	-0.033	
R-LT	47	3.571	1.344	0.185	0.046	
Media pentru <i>Q. robur</i>	53.4	3.411	1.397	0.218	0.004	
	SE	0.363	0.144	0.058	0.023	0.012
P-BRC	55	3.286	1.426	0.249	-0.008	
P-CIO	52	3.429	1.389	0.236	-0.048	
P-URZ	51	3.286	1.338	0.216	0.010	
P-SNA	50	3.286	1.357	0.229	-0.068	
P-BAN	52	3.857	1.376	0.247	-0.021	
P-PUN	54	3.571	1.403	0.198	0.075	
P-VIS	51	2.857	1.280	0.171	0.009	
P-LT	52	3.286	1.359	0.198	0.067	
Media pentru <i>Q. pedunculiflora</i>	52.1	3.357	1.366	0.218	0.002	
	SE	0.207	0.115	0.051	0.023	0.016

N – mărimea eșantionului; N<sub>a</sub> – numărul mediu de alele pe locus; N<sub>e</sub> – numărul efectiv de alele; H<sub>o</sub> – heterozigoția observată; F – deficitul de heterozigoți; SE – eroarea standard.

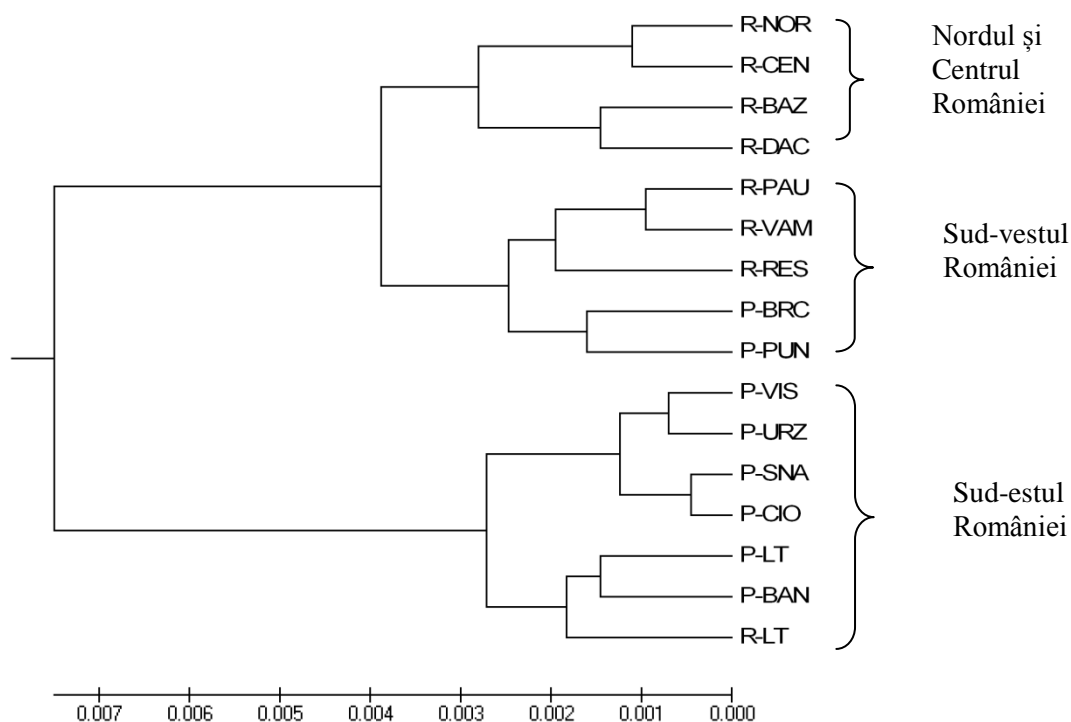
Analiza varianței moleculare (AMOVA) a arătat că marea majoritate a variației genetice se găsește în interiorul populațiilor și numai o mică fracțiune ( $F_{ST}=0.039$ ) se găsește între populații (Tab. 2-7). Variația genetică între taxoni a fost de cel puțin două ori mai mare în comparație cu variația între populațiile aceluiași taxon. Loci genici cu puterea cea mai mare de discriminare între *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* au fost *Pgm-A* și *Idh-B* (Tab. 2-7). Alți patru loci genici (*Pgdh-B*, *Skdh-A*, *Mnr-A* și *Aat-B*) au diferențiat mai bine între populațiile ce aparțin speciei *Q. robur* și respectiv *Q. pedunculiflora*.

**Tabelul 2-7** Analiza varianței moleculare (AMOVA) pentru fiecare locus genic și global pentru întregul set de gene

Genă care codifică enzima	$F_{ST}$	P	$F_{SC}$	P	$F_{CT}$	P
<i>Idh-B</i>	0.030	0.00	0.003	0.22	0.027	0.00
<i>Pgm-A</i>	0.075	0.00	0.018	0.00	0.058	0.00
<i>6-Pgdh-B</i>	0.016	0.00	0.015	0.00	0.001	0.29
<i>Skdh-A</i>	0.014	0.00	0.013	0.00	0.001	0.23
<i>Mnr-A</i>	0.021	0.00	0.014	0.00	0.007	0.05
<i>Pgi-B</i>	0.007	0.03	0.001	0.29	0.006	0.00
<i>Aat-B</i>	0.012	0.00	0.010	0.00	0.002	0.17
Media pentru 7 gene	<b>0.039</b>	0.00	<b>0.011</b>	0.00	<b>0.028</b>	0.00

Indici de fixare:  $F_{ST}$  – între populații,  $F_{SC}$  – între populații în interiorul taxonilor,  $F_{CT}$  - între populații între taxoni.

Dendrograma construită pe baza distanțelor genetice Nei între perechi de populații indică existența a trei grupuri care corespund foarte bine cu localizarea geografică a populațiilor (Fig. 2-3). Primul grup conține exclusiv populații de *Q. robur* din nordul și centrul țării, un al doilea grup include atât populații de *Q. robur*, cât și populații de *Q. pedunculiflora*, situate în sud-vestul României, în timp ce al treilea grup este format din populații de *Q. pedunculiflora* din sud-estul țării, la care se adaugă populația de *Q. robur* din Delta Dunării. În cadrul celui de-al doilea grup se individualizează un subgrup al populațiilor de *Q. robur* (Păunoaia-Prahova, Vânju Mare-Mehadinți și Reșca-Olt). Populații de stejar din Dobrogea (Letea și Băneasa-Constanța) formează de asemenea un subgrup în cadrul grupului de populații sud-estice (Fig. 2-3).

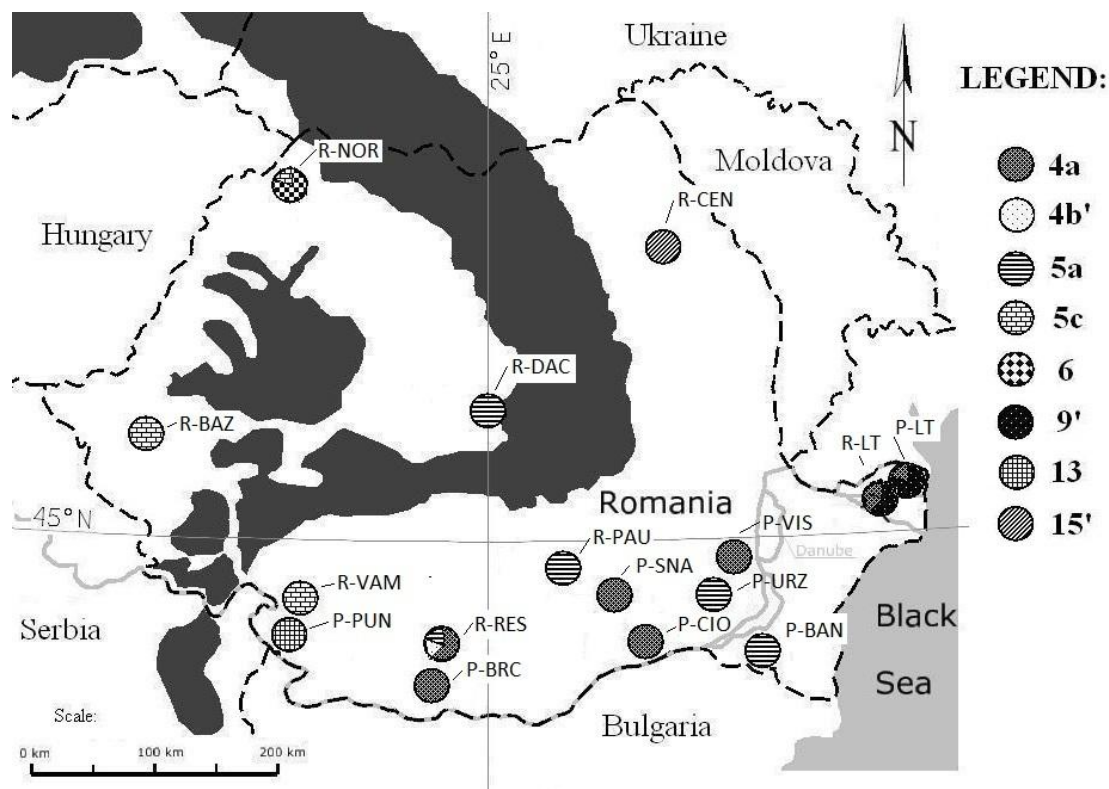


**Fig. 2-3** Dendrogramă UPGMA construită pe baza distanțelor genetice Nei pornind de la șapte gene care codifică enzime. Denumirile populațiilor de stejar sunt date în tabelul 2-2.

#### *Analiza ADN-ului cloroplastic*

În total au fost observate opt haplotipuri (combinații unice între alelele detectate pentru fiecare locus) de ADN cloroplastic. Cele mai multe haplotipuri (4a, 4b', 5a, 5c și 6) aparțin liniei filogenetice A a stejarilor europeni (PETIT *et al.* 2002b). Două haplotipuri (13 și 15') aparțin liniei filogenetice E, în timp ce, un haplotip aparține foarte probabil liniei filogenetice F (haplotipul 9'). Douăsprezece din cele 16 populații au prezentat un singur, dar nu același, haplotip (Fig. 2-4). În patru dintre populații au fost identificate două sau chiar trei haplotipuri. Cel mai frecvent haplotip în eșantionul total, care include atât *Q. robur*, cât și *Q. pedunculiflora*, a fost haplotipul 4a (frecvența=0.325) și haplotipul 5a (frecvența =0.263). Aceste două haplotipuri, împreună cu haplotipul 9', sunt prezente la ambii taxoni (Fig. 2-4). Patru haplotipuri cloroplastice au fost identificate numai la *Q. robur* (haplotipurile 6, 4b', 5c și 15') iar unul (haplotipul 13) numai la *Q. pedunculiflora*.





**Fig. 2-4** Distribuția geografică a haplotipurilor de ADN cloroplasic (CURTU *et al.* 2011b). Munții Carpați (altitudine peste 500 m) sunt reprezentați cu culoare neagră.

Stejarul pedunculat, *Q. robur*, care este răspândit pe o arie mult mai vastă decât stejarul brumăriu, *Q. pedunculiflora*, a prezentat o diversitate genetică totală mai mare ( $h_T = 0.891$  pentru *Q. robur* versus  $h_T = 0.721$  pentru *Q. pedunculiflora*). Indicele de diferențiere genetică,  $G_{ST}$ , a avut o valoare mai mare pentru *Q. pedunculiflora* decât pentru *Q. robur* ( $G_{ST} = 0.930$  versus  $G_{ST} = 0.761$ ). Ambele valori ale indicelui  $G_{ST}$  indică un nivel foarte redus al diversității genetice în interiorul populațiilor de stejar analizate.

#### Analiza ADN-ului nuclear

În total au fost analizate 22 SSRs, din care 11 gSSRs și 11 EST-SSRs, în trei perechi de populații extracarpatice, fiecare pereche cuprinzând o populație de *Q. pedunculiflora* și una de *Q. robur*. La acestea s-a adăugat o a șaptea populație de *Q. robur* situată în interiorul arcului carpatic (Fig. 2-4). Atât *Q. pedunculiflora*, cât și *Q. robur*, prezintă valori similare ale principalilor indici ai diversității genetice pentru întregul set de markeri nucleari (Tab. 2-8). Diferențe semnificative ( $P=0.03$ ) au fost găsite numai în cazul indicelui de fixare ( $F$ ). Există, de asemenea, un ușor deficit de heterozigoți în cele trei populații de *Q. pedunculiflora* (valoarea lui  $F$  variază între

0.002 și 0.029), în timp ce pentru *Q. robur* s-a constatat un ușor exces de indivizi heterozigoți ( $F$  are valori între -0.006 și -0.021). Totuși, valorile indicelui de fixare sunt foarte apropiate de zero la ambii taxoni (Tab. 2-8).

**Tabelul 2-8** Valorile indicilor diversității genetice pentru stejarul brumăriu (*Q. pedunculiflora*) și stejarul pedunculat (*Q. robur*) calculate pe baza a **22 SSRs**

Populația		N	Na	Ne	Ho	He	F
PED-PUN	Media	51.1	12.95	5.86	0.744	0.767	0.029
	SE	0.4	0.99	0.65	0.029	0.031	0.013
PED-BRC	Media	47.3	12.41	5.88	0.767	0.769	0.002
	SE	0.2	0.90	0.67	0.032	0.031	0.017
PED-CIO	Media	46.0	13.23	6.12	0.769	0.775	0.005
	SE	1.7	1.22	0.67	0.034	0.032	0.021
<i>Q. pedunculiflora</i>	Media	48.1	12.86	5.95	0.760	0.770	0.012
	SE	0.6	0.60	0.38	0.018	0.018	0.010
ROB-DAC	Media	47.7	12.18	5.90	0.787	0.770	-0.021
	SE	0.1	1.07	0.74	0.029	0.026	0.015
ROB-PAU	Media	46.5	12.50	6.18	0.772	0.766	-0.006
	SE	0.2	1.18	0.84	0.033	0.029	0.015
ROB-RES	Media	47.5	12.41	5.47	0.780	0.767	-0.019
	SE	0.2	1.07	0.59	0.025	0.025	0.014
ROB-VAM	Media	50.8	12.95	6.04	0.771	0.765	-0.010
	SE	0.1	1.24	0.77	0.031	0.031	0.011
<i>Q. robur</i>	Media	48.1	12.51	5.90	0.777	0.767	-0.014
	SE	0.2	0.56	0.37	0.015	0.014	0.007

Abrevierile pentru denumirile populațiilor sunt descrise în tabelul 2-2. N este mărimea eșantionului, Na – numărul mediu de alele, Ne – numărul efectiv de alele, Ho – heterozigoția observată, He – diversitatea genetică, F – indicele de fixare, SE – eroarea standard.

Dacă se ia în considerare numai subsetul de 11 gSSRs, diferențe semnificative ( $P < 0.05$ ) între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur* există numai în privința heterozigoției observate ( $H_o$ ), care este mai mare în cazul celei de-a doua specii (Tab. 2-9). Alți doi indici, numărul de alele ( $N_a$ ) și diversitatea genică ( $H_e$ ) au valori semnificativ mai mari ( $P < 0.05$ ) pentru *Q. pedunculiflora* în cazul analizei EST-SSRs (Tab. 2-10).

**Tabelul 2-9** Valorile indicilor diversității genetice pentru stejarul brumăriu (*Q. pedunculiflora*) și stejarul pedunculat (*Q. robur*) calculate pe baza a **11 gSSRs**

Populația		N	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	F
PED-PUN	Media	51.4	15.36	6.96	0.762	0.784	0.028
	SE	0.3	1.20	1.03	0.054	0.055	0.019
PED-BRC	Media	47.5	14.09	6.50	0.775	0.765	-0.016
	SE	0.2	1.12	1.07	0.056	0.057	0.016
PED-CIO	Media	47.5	15.73	7.23	0.766	0.786	0.018
	SE	0.2	1.68	1.07	0.056	0.060	0.023
<i>Q. pedunculiflora</i>	Media	48.8	15.06	6.90	0.768	0.778	0.010
	SE	0.3	0.77	0.59	0.031	0.032	0.011
ROB-DAC	Media	47.5	15.45	7.30	0.818	0.807	-0.012
	SE	0.2	1.44	1.21	0.043	0.039	0.014
ROB-PAU	Media	46.4	15.45	7.61	0.807	0.787	-0.028
	SE	0.2	1.68	1.41	0.052	0.051	0.015
ROB-RES	Media	47.1	14.45	6.12	0.786	0.787	0.002
	SE	0.3	1.54	0.89	0.042	0.039	0.019
ROB-VAM	Media	51.0	16.09	7.17	0.781	0.781	-0.002
	SE	0.0	1.81	1.27	0.052	0.052	0.014
<i>Q. robur</i>	Media	48.0	15.36	7.05	0.798	0.790	-0.010
	SE	0.3	0.79	0.59	0.023	0.022	0.008

**Tabelul 2-10** Valorile indicilor diversității genetice pentru stejarul brumăriu (*Q. pedunculiflora*) și stejarul pedunculat (*Q. robur*) calculate pe baza a **11 EST-SSRs**

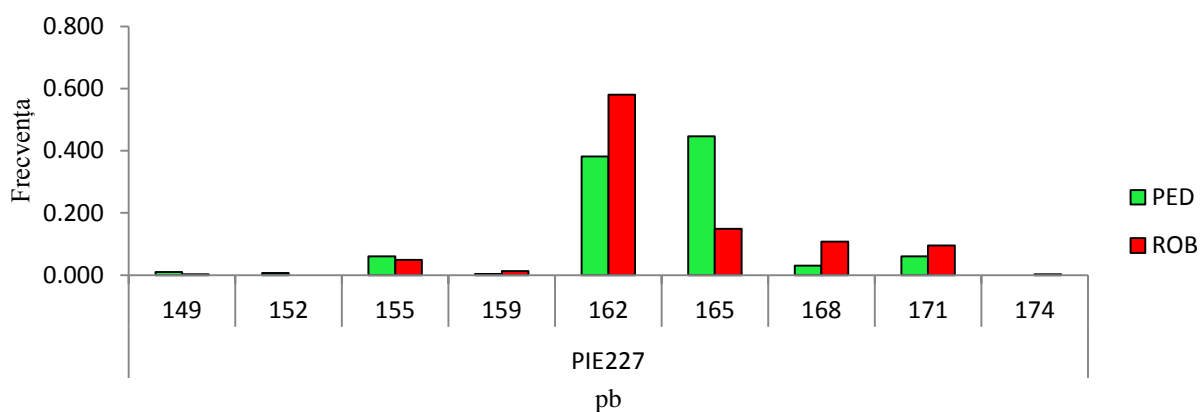
Populația		N	Na	Ne	Ho	He	F
PED-PUN	Media	50.8	10.55	4.76	0.725	0.751	0.029
	SE	0.8	1.23	0.68	0.021	0.028	0.020
PED-BRC	Media	47.2	10.73	5.26	0.758	0.772	0.019
	SE	0.4	1.25	0.81	0.034	0.026	0.030
PED-CIO	Media	44.5	10.73	5.00	0.771	0.765	-0.008
	SE	3.4	1.47	0.68	0.040	0.028	0.036
<i>Q. pedunculiflora</i>	Media	47.5	10.67	5.01	0.751	0.763	0.014
	SE	1.2	0.74	0.41	0.018	0.015	0.017
ROB-DAC	Media	47.8	8.91	4.51	0.755	0.734	-0.029
	SE	0.2	0.80	0.67	0.039	0.033	0.026
ROB-PAU	Media	46.7	9.55	4.75	0.736	0.745	0.016
	SE	0.3	1.13	0.76	0.041	0.031	0.026
ROB-RES	Media	47.9	10.36	4.83	0.774	0.747	-0.040
	SE	0.1	1.26	0.78	0.030	0.032	0.018
ROB-VAM	Media	50.6	9.82	4.91	0.761	0.749	-0.017
	SE	0.2	1.08	0.79	0.036	0.034	0.017
<i>Q. robur</i>	Media	48.3	9.66	4.75	0.757	0.744	-0.018
	SE	0.2	0.53	0.36	0.018	0.016	0.011

Diferențele sunt semnificative ( $P < 0.05$ ) atunci când se compară valorile indicilor diversității genetice calculați pe baza gSSRs și respectiv EST-SSRs, pentru același set de șapte populații. Diversitatea genetică intrapopulațională, estimată pe baza gSSRs, este mai ridicată decât cea estimată pe baza EST-SSRs (Tab. 2-9 și 2-10). Valoarea indicelui de fixare rămâne similară indiferent de tipul de marker genetic și indică un ușor exces de homozigoți pentru *Q. pedunculiflora*.

Gradul de diferențiere genetică între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur* este foarte scăzut, chiar dacă s-au analizat 22 de regiuni extrem de variabile din genom (Tab. 2-11). Locusul care diferențiază cel mai bine este PIE227 ( $F_{ST} = 0.051$ ; Fig. 2-5). Acesta este urmat la mare distanță de QrZAG11 și GOT062, ambii cu  $F_{ST} = 0.019$ , o valoare aproape dublă față de nivelul mediu de diferențiere genetică între cei doi taxoni. Diferențele în privința indicelui  $F_{ST}$ , calculat separat pentru cele două subseturi, EST-SSRs și gSSRs, rămân ne semnificative ( $P > 0.05$ ), chiar dacă valoarea pentru EST-SSRs este cu aproximativ 50% mai mare față de gSSRs (0.012 vs. 0.008). Cei doi loci EST-SSRs, cu puterea cea mai mare de discriminare între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur*, prezintă o unitate de repetare formată din trei nucleotide (Tab. 2-3).

**Tabelul 2-11** Valorile indicelui de diferențiere  $F_{ST}$  între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur*

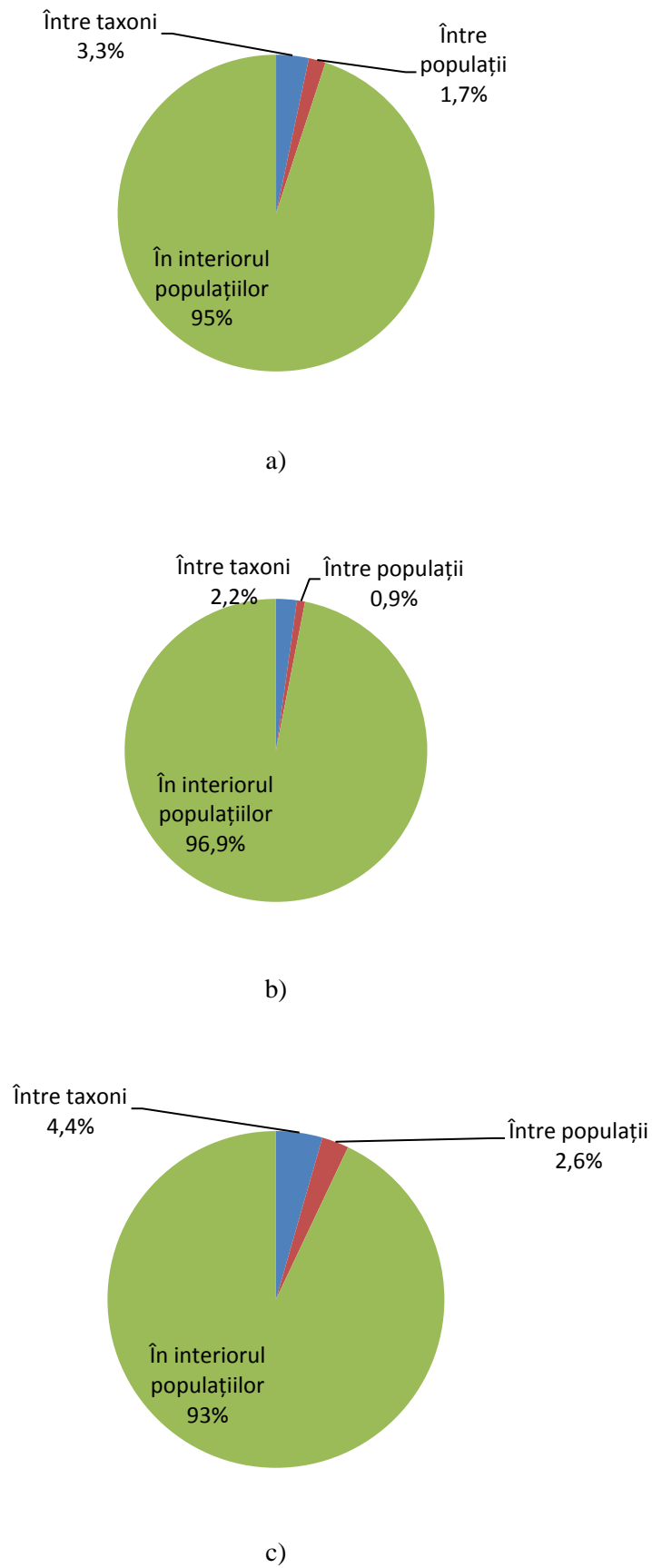
gSSR	$F_{ST}$	EST-SSR	$F_{ST}$
QrZAG112	0.010	PIE239	0.009
QrZAG96	0.007	PIE227	0.051
QpZAG110	0.005	PIE215	0.014
QrZAG11	0.019	PIE223	0.005
QrZAG87	0.007	GOT021	0.003
QrZAG7	0.005	GOT045	0.001
QrZAG20	0.007	GOT062	0.019
QpZAG9	0.004	GOT009	0.007
QpZAG1/5	0.004	GOT032	0.006
MSQ13	0.007	GOT061	0.008
QpZAG15	0.014	GOT037	0.014
Media	0.008	Media	0.012
SE	0.001	SE	0.004
Media pentru întregul set de markeri SSRs		0.010	
SE		0.002	



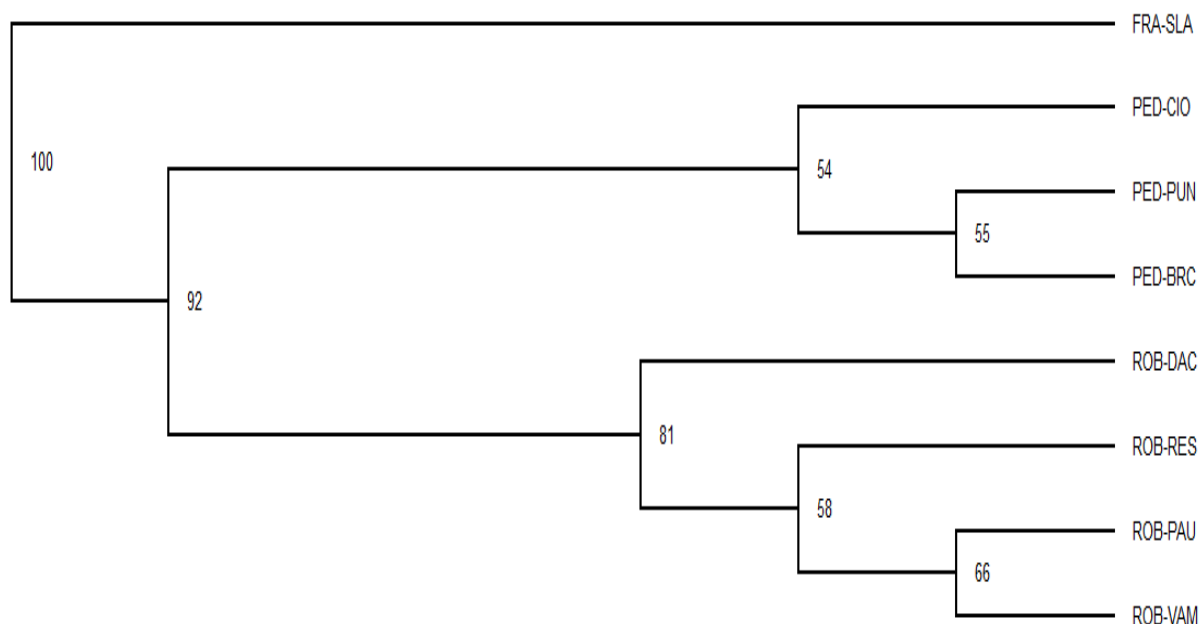
**Fig. 2-5** Structura alelică la locusul PIE227 pentru *Q. pedunculiflora* (PED) și *Q. robur* (ROB). Pb – perechi de baze.

Procentul cel mai mare din variația moleculară totală se găsește în interiorul populațiilor, indiferent de felul regiunilor de ADN analizate (Fig. 2-6). Variația moleculară între populațiile aceluiași taxon (*Q. pedunculiflora*/*Q. robur*) este de două ori mai mică decât variația între populațiile ce aparțin unor taxoni diferiți. Dacă se compară rezultatele pentru cele două subseturi de SSRs (gSSRs și EST-SSRs), procentul cel mai mare de variație genetică între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur* este în cazul secvențelor simple repetitive localizate în zonele transcrise (EST-SSRs) ale genomului stejarului (Fig. 2-6 b și c).

Dendrograma UPGMA construită pe baza distanțelor genetice *Nei* indică o separare clară a celor trei populații de *Q. pedunculiflora* față de cele de *Q. robur*. Pentru construcția dendrogramei s-a folosit și un *outgroup* constituit din arbori de gârniță (*Q. frainetto*) eșantionați în pădurea Seaca din județul Olt (Fig. 2-7). Separarea ramurilor specifice pentru *Q. pedunculiflora* și respectiv *Q. robur* prezintă un suport statistic ridicat (valori *bootstrap* > 50). Cele trei populații de *Q. robur* din sudul țării constituie un grup genetic distinct față de populația intracarpatică de *Q. robur*.



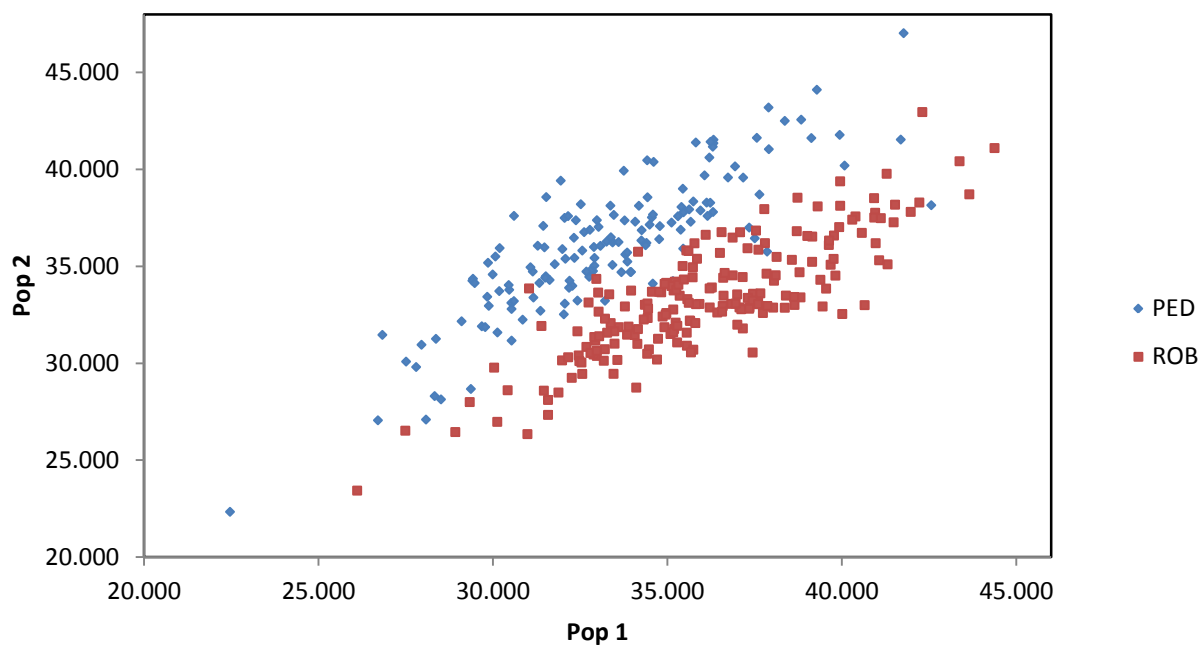
**Fig. 2-6** Analiza varianței moleculare (AMOVA) pentru setul de: a) 22 SSRs, b) 11 gSSRs c) 11 EST-SSRs



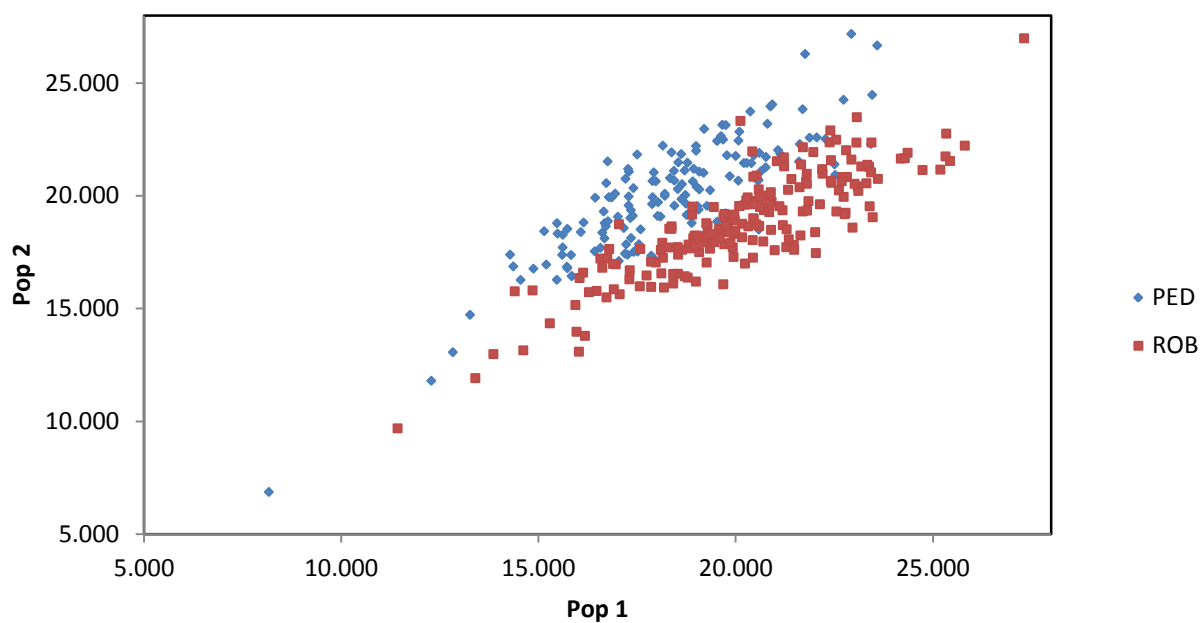
**Fig. 2-7** Dendrogramă UPGMA construită pe baza distanțelor genetice *Nei* între populații de *Q. pedunculiflora* (PED), *Q. robur* (ROB) și *Q. frainetto* (FRA). S-au folosit 22 SSRs. Numerele reprezintă *bootstrap support values*. Abrevierile denumirilor populațiilor sunt explicitate în tabelul 2-2.

Rezultatele testului de apartenență bazat pe frecvențele alelelor arată că marea majoritate a exemplarelor eșantionate (92%) au fost atribuite grupului genetic corespunzător unuia sau altuia dintre cei doi taxoni (*Q. pedunculiflora* sau *Q. robur*), atunci când au fost utilizate toate cele 22 SSRs (Fig. 2-8 a și Tab. 2-12). Analiza comparativă pe tipuri de marker genetic indică rezultate mai bune pentru gSSRs față de EST-SSRs (Fig. 2-8 b și c și Tab. 2-12). Atunci când s-au folosit numai gSSRs, mai mult de două treimi din arborii atribuiți incorect au fost de *Q. robur* (28/41). Numărul arborilor atribuiți celeilalte populații (grup genetic) a fost aproximativ egal atunci când s-au utilizat EST-SSRs sau întregul set de 22 de markeri SSRs (Tab. 2-12). Singurul caz (unica populație) în care toți arborii au fost atribuiți unui taxon (specii) în deplină concordanță cu încadrarea morfologică este cel al populației de *Q. robur* de la Rupea-Dacia.

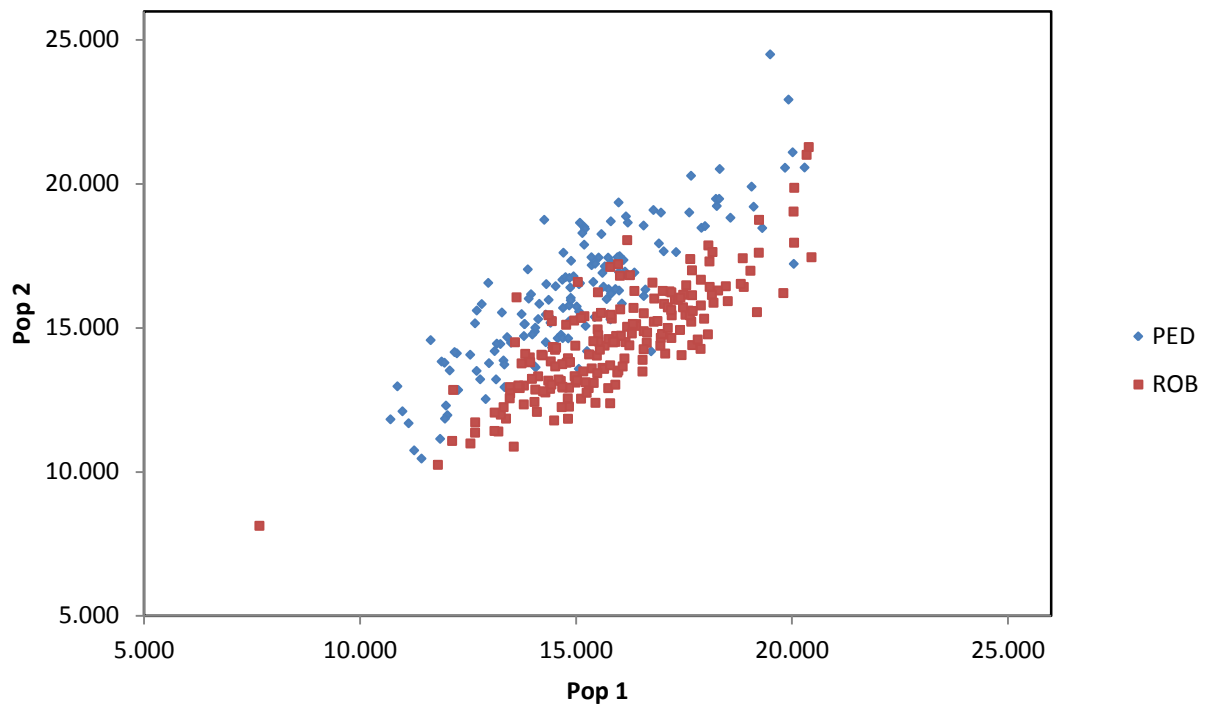




a) SSRs



b) gSSRs



c) EST-SSRs

**Fig. 2-8** Apartenența genetică a indivizilor de *Q. pedunculiflora* (PED) și *Q. robur* (ROB) pe baza: a) 22 SSRs; b) 11 gSSRs; c) 11 EST-SSRs.

**Tabelul 2-12** Rezultatele testului de apartenență genetică bazat pe frecvențele alelelor implementat în programul GenAlEx ver. 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006)

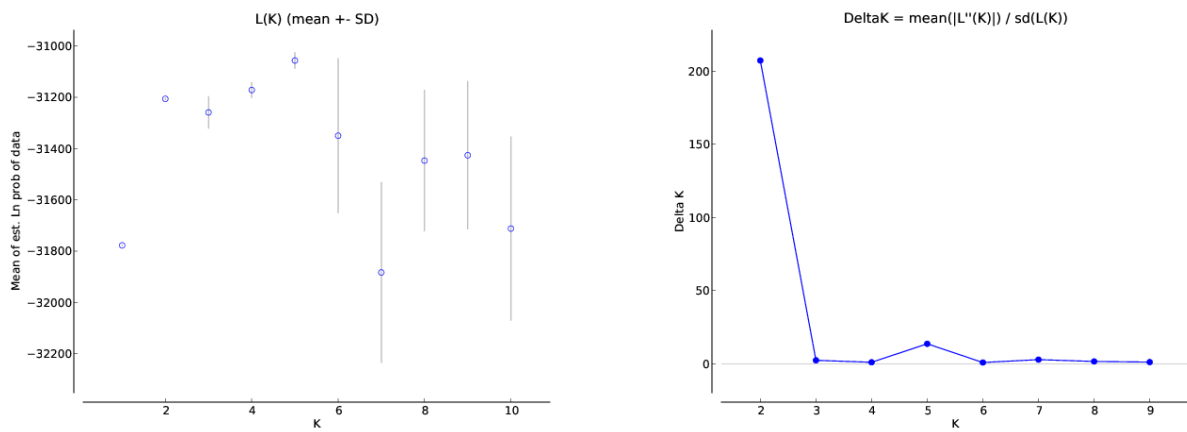
Tipul de marker genetic	SSRs		gSSRs		EST-SSRs	
	Aceeași	Diferită	Aceeași	Diferită	Aceeași	Diferită
Numărul de markeri genetici	22		11		11	
Populația (grupul genetic)	Aceeași	Diferită	Aceeași	Diferită	Aceeași	Diferită
<i>Q. pedunculiflora</i>	136	12	135	13	123	25
<i>Q. robur</i>	180	14	166	28	172	22
Nr. total de arbori	316	26	301	41	295	47
Procent	92%	8%	88%	12%	86%	14%

Rezultatele analizei Bayesiene efectuate cu programul STRUCTURE susțin ipoteza unei structuri genetice cu două *cluster*e - grupuri omogene din punct de vedere genetic (Fig. 2-9). Metoda bazată pe calculul  $\Delta K$  a indicat  $K = 2$  în toate cele trei cazuri: pentru întregul set de 22 SSRs și separat pentru fiecare categorie (gSSRs și EST-SSRs). Prin folosirea celei de-a doua metode, bazată pe  $L(K)$ , a reieșit că cel mai probabil număr de cluster e genetice este cinci ( $K = 5$ ) pentru setul total de markeri SSRs (Fig. 2-9 a) și  $K = 2$  atunci când datele s-au analizat separat pe categorii de markeri genetici (Fig. 2-9 b și c).

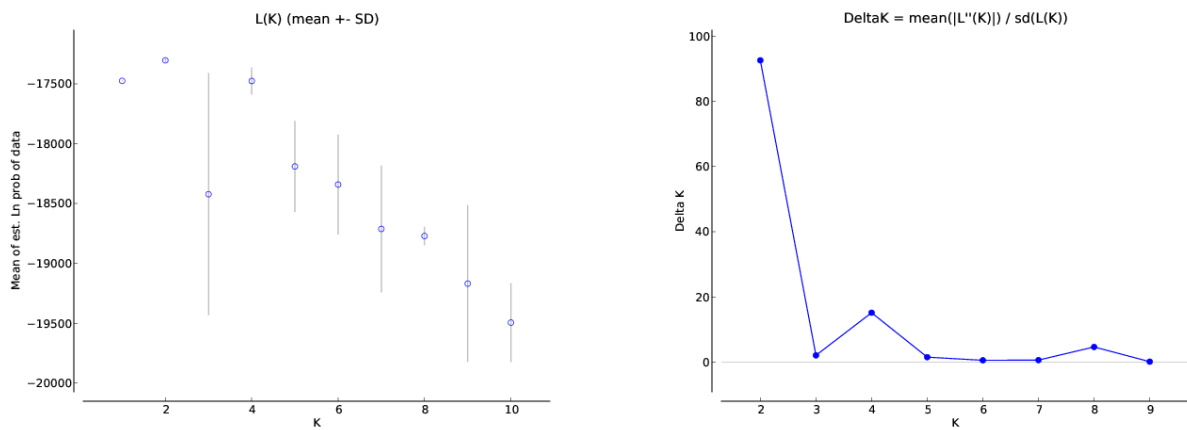
În cazul unei structuri genetice cu două cluster e genetice există o corespondență foarte bună între unul din cluster e (reprezentat de culoarea verde) și *Q. pedunculiflora*, pe de-o parte, și cel de-al doilea cluster (de culoare roșie) și *Q. robur*, pe de altă parte (Fig. 2.10). Pentru  $K = 3$ , puținele exemplare cu un coeficient ridicat de apartenență la cel de-al treilea cluster (de culoare albastră) aparțin, atât populațiilor de *Q. pedunculiflora*, cât și celor de *Q. robur*. Pentru  $K = 4$ , se individualizează un grup în cazul populațiilor de *Q. robur* (Pop. 1-4), în timp ce clusterul genetic de culoare verde rămâne bine reprezentat în cele trei populații de *Q. pedunculiflora* (Fig. 2-10).

Deși există o corespondență foarte bună între cele două clasificări independente, fenotipică (bazată pe morfologia frunzei) și genetică (bazată pe un set de 22 SSRs), se pot totuși observa câteva exemplare la care există un dezacord între fenotip și apartenența genetică (Fig. 2-11). Spre exemplu, trei exemplare de *Q. pedunculiflora* (indivizii nr. 10, 23 și 24) din populația 1 (Punghina) prezintă o valoare foarte mare a coeficientului (probabilității) de apartenență ( $Q$ ) la clusterul genetic corespunzător taxonului *Q. robur* (de culoare roșie). Prin contrast, toți arborii de *Q. robur* din populația Rupea-Dacia au o valoare de cel puțin 0.50 a coeficientului de apartenență ( $Q$ ) pentru clusterul de culoare roșie, caracteristic pentru specia *Q. robur*, media coeficientului  $Q$  pentru această populație fiind extrem de ridicată ( $Q = 0.96$ ).

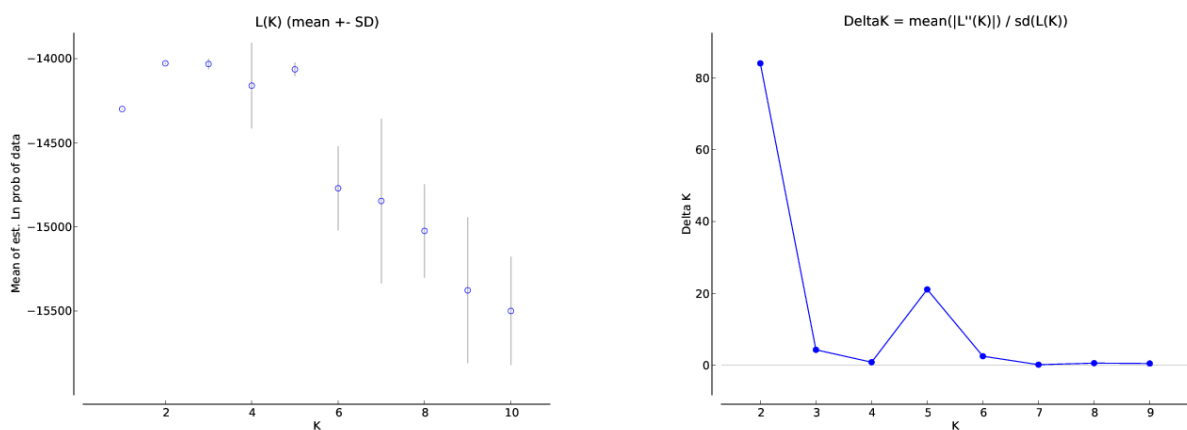
Valoarea medie a coeficientului de apartenență ( $Q$ ) la clusterul corespondent speciei este de 0,878 atunci când s-a folosit setul complet de 22 de markeri genetici de tip SSRs. Valoarea scade la 0,802 pentru setul EST-SSRs și respectiv la 0,749 pentru subsetul gSSRs. Subsetul EST-SSRs a determinat per total o separare mai bună a *Q. pedunculiflora* față de *Q. robur* (Fig. 2-12), deși diferențele față de subsetul gSSRs, în privința valorii lui  $Q$ , sunt nesemnificative ( $P > 0.05$ ). Markerii genetici de tip EST-SSRs, spre deosebire de cei gSSRs, au contribuit în mai mare măsură la diferențierea exemplarelor de *Q. robur* din cele patru populații eșantionate (Fig. 2-12 b și c).



a)

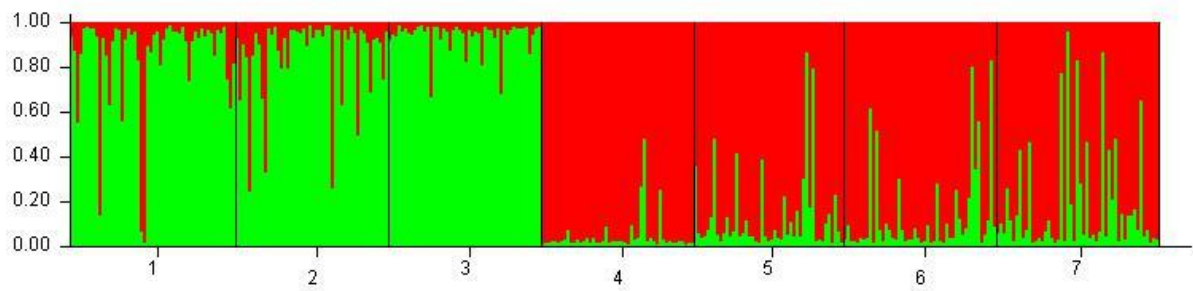
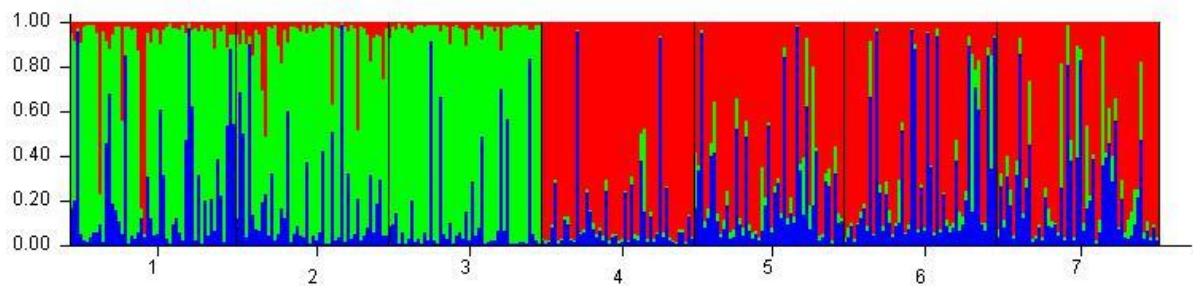
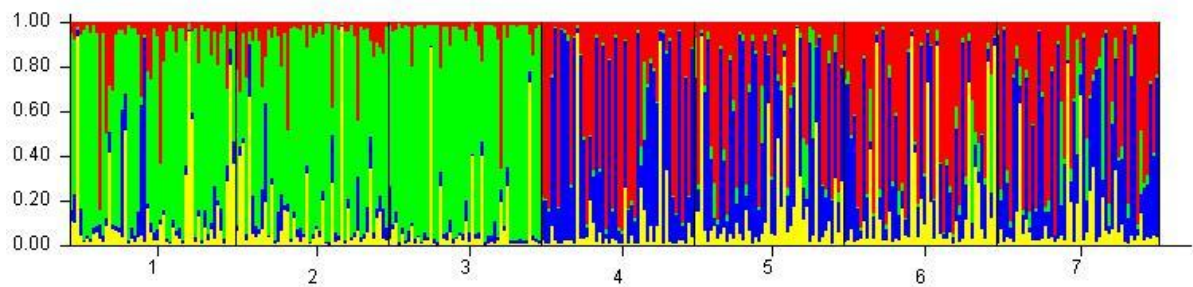


b)

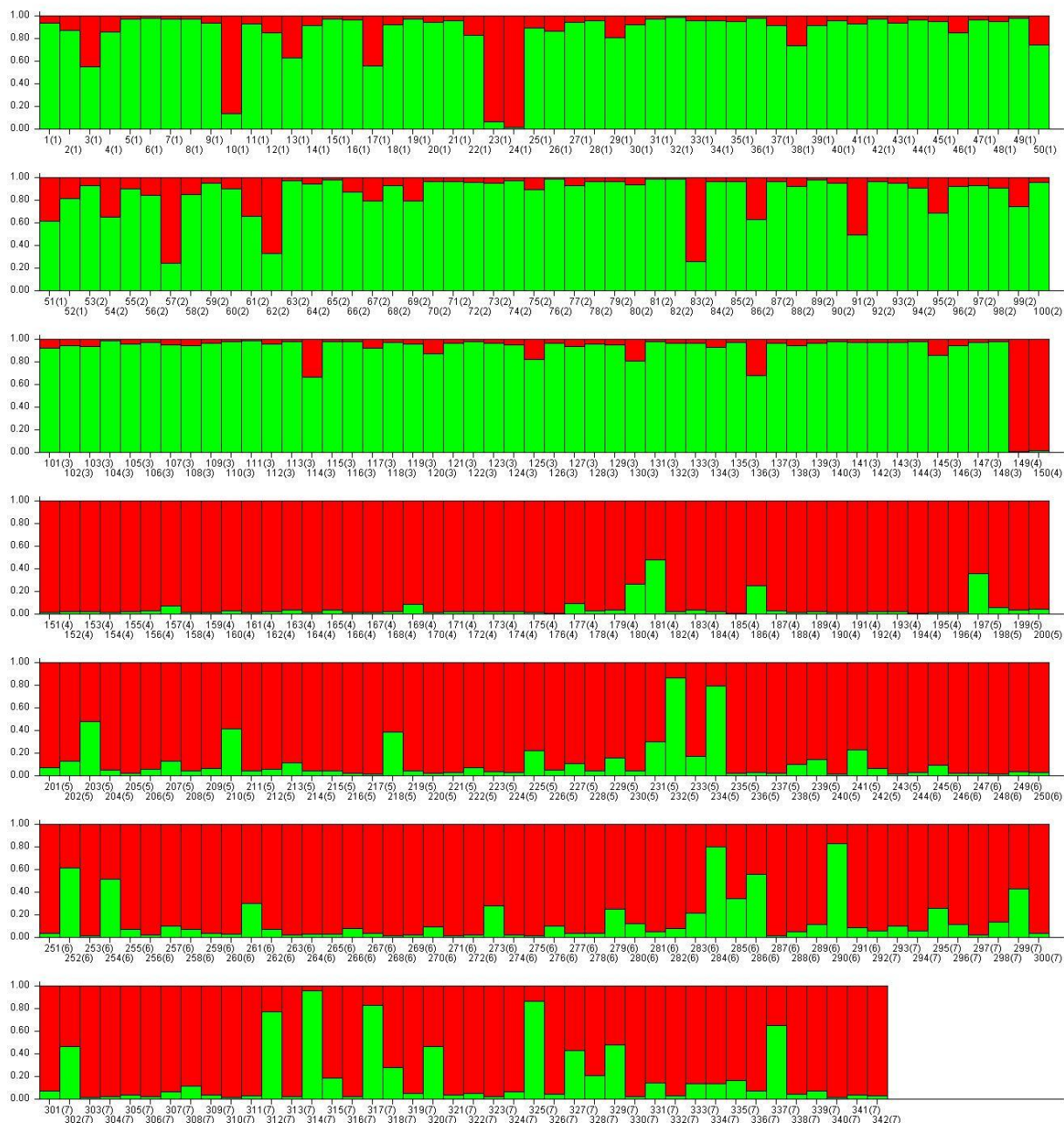


c)

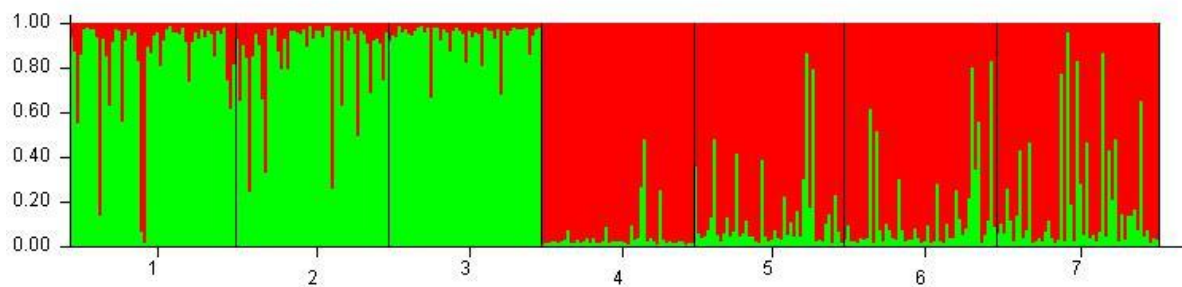
**Fig. 2-9** Determinarea numărului cel mai probabil de grupuri omogene din punct de vedere genetic ( $K$ ) prin calculul  $\ln \text{prob of data}$  (în stânga) și  $\Delta K$  (în dreapta). S-au folosit seturi de markeri genetici de tip: a) SSRs; b) gSSRs și c) EST-SSRs.

 $K = 2$  $K = 3$  $K = 4$ 

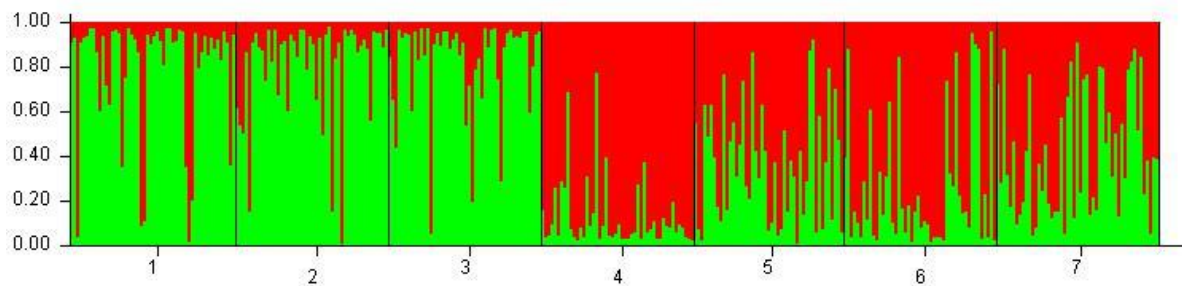
**Fig. 2-10** Apartenența indivizilor la 2, 3 sau 4 grupuri omogene din punct de vedere genetic ( $K$ ) identificate prin analiza Bayesiană. Fiecare individ este reprezentat de o linie verticală subțire care este partiționată în segmente de  $K$  culori. Mărimea unui segment de o anumită culoare este proporțională cu gradul de apartenență al individului la grupul (*cluster*-ul) aferent culorii respective. 1-3 – populații de *Q. pedunculiflora*; 4-7 – populații de *Q. robur*.



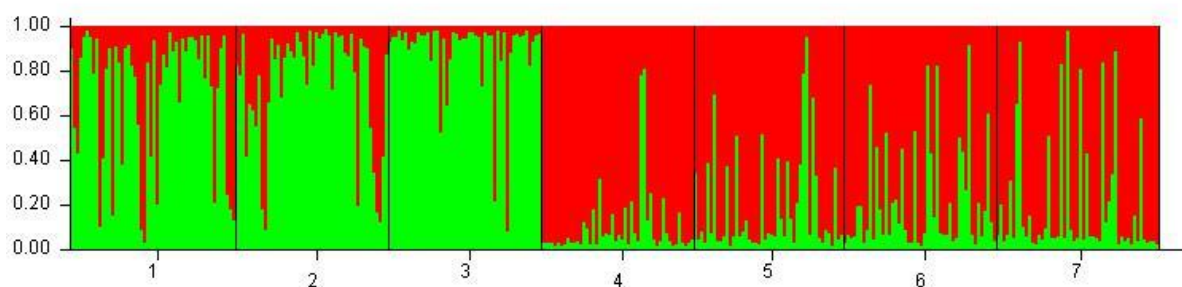
**Fig. 2-11** Histogramă obținută prin analiza Bayesiană pe baza genotipurilor multilocus pentru 22 SSRs. Fiecare bară verticală, formată dintr-un segment de culoare verde și unul de culoare roșie, reprezintă un individ. Mărimea segmentului de culoare verde este proporțională cu probabilitatea ( $Q$ ) asociată unui individ de a aparține grupului genetic 1 (*pedunculiflora*) iar cea a segmentului de culoare roșie cu probabilitatea de a aparține grupului genetic 2 (*robur*). Valorile de la 1 la 342 reprezintă numărul arborelui eșantionat; (1)-(3) sunt populații de *Q. pedunculiflora* iar (4)-(7) populații de *Q. robur*.



a)



b)



c)

**Fig. 2-12** Histogramă obținută prin analiza Bayesiană pe baza unui set de markeri genetici format din: a) 22 SSRs; b) 11 gSSRs; c) 11 EST-SSRs. Fiecare bară verticală, formată dintr-un segment de culoare verde și unul de culoare roșie, reprezintă un individ. Mărimea segmentului de culoare verde este proporțională cu probabilitatea ( $Q$ ) asociată unui individ de a aparține grupului genetic 1 ('*pedunculiflora*') iar cea a segmentului de culoare roșie cu probabilitatea de a aparține grupului genetic 2 ('*robur*'). 1-3 – populații de *Q. pedunculiflora*; 4-7 – populații de *Q. robur*.

## Discuții

### *Morfologia frunzei*

Analiza morfologiei frunzei în populații tipice de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* a reliefat existența unui singur descriptor, pubescența pe dosul frunzelor, cu putere mare de discriminare între cei doi taxoni. Alți trei descriptori ai frunzei (lungimea pețiolului, forma bazei frunzei și

raportul adâncimii lobului) au contribuit de asemenea la diferențierea morfologică între populațiile de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora*, confirmând astfel particularitățile morfologice ale *Q. pedunculiflora* menționate în literatură (SCHWARZ 1993; STĂNESCU *et al.* 1997). Trebuie însă menționat că în eșantionul analizat, deși acesta a inclus arborete reprezentative desemnate în majoritatea cazurilor ca resurse genetice forestiere, nu a fost observată varietatea *virescens* la stejarul brumăriu, care are frunzele maturate glabre și de culoare verzuie pe fața dorsală (ca la stejarul pedunculat), respectiv varietatea *puberula* la stejarul pedunculat, la care, pe fața dorsală, mai ales în lungul nervurii principale prezintă peri mici, fasciculați (similaritate cu stejarul brumăriu). Existența perilor fasciculați pe dosul frunzelor de *Q. pedunculiflora* constituie, fără îndoială, o adaptare la perioadele de uscăciune din timpul sezonului de vegetație. Pubescența este specifică și altor specii de cvercinee xerofite sau semixerofite (de ex. la *Q. pubescens*). Și alți descriptorii ai frunzelor indică asemănări cu *Q. pubescens*, o altă specie de stejar tipică pentru zona de silvostepă: pețiol mai lung ( $8.33 \pm 0.67$  mm) și sinuri mai adânci decât la *Q. robur*. Toate aceste similitudini în plan morfologic sugerează fie parcurgerea unui proces similar de adaptare la condițiile de vegetație din silvostepă, fie existența unui flux genic dinspre *Q. pubescens* spre populațiile marginale de *Q. robur*, și transferul în acest fel al unor adaptări care există la *Q. pubescens* (de ex. părozitatea frunzelor). Totuși, ipoteza formării taxonului *Q. pedunculiflora* prin hibridări introgresive între *Q. robur* și *Q. pubescens* nu este susținută la nivel genetic. Astfel, analiza genei *Dhn-3* la speciile de cvercinee din România (inclusiv *Q. pedunculiflora*) invalidează ipoteza hibridării. Alela cea mai frecventă la gena *Dhn-3* în populațiile de *Q. pubescens* (circa 75%) are o frecvență relativă foarte redusă (circa 4%) în populațiile de *Q. pedunculiflora*, chiar mai mică decât în populațiile de *Q. robur* (circa 10%) (CRĂCIUNESC *et al.* 2015). Dacă arborii de *Q. pedunculiflora* ar fi fost hibrizi între *Q. pubescens* și *Q. robur*, ei ar fi trebuit să aibă valori intermediare ale frecvenței alelelor la gena *Dhn-3*, care diferențiază de altfel foarte bine între speciile autohtone de cvercinee.

#### *Analiza genelor care codifică enzime*

O singură alelă (*Pgi-B-129*) a fost observată în toate populațiile pure de *Q. robur*, lipsind, totodată, din populațiile de *Q. pedunculiflora*, frecvența ei relativă fiind  $\geq 0.05$  în trei dintre populații. Absența acestei alele la *Q. pedunculiflora* s-ar putea explica prin apariția ei, ca urmare a unei mutații, într-o populație de *Q. robur* după separarea indivizilor de *Q. pedunculiflora*. Astfel, nu a existat suficient timp sau oportunitatea de răspândire a acestei alele prin flux genic la *Q. pedunculiflora*. Prezența altor alele specifice, cu frecvențe foarte reduse, și care apar numai în



unele dintre populațiile unui taxon, se datorează foarte probabil mărimii eșantionului folosit (numai 50 de arbori pe populație).

Nivelul de diferențiere genetică (2,8%) dintre *Q. pedunculiflora* și *Q. robur*, estimat pe baza setului de gene care codifică enzime, este mai redus decât cel estimat cu aceeași categorie de markeri genetici între *Q. robur* și *Q. petraea* (ZANETTO *et al.* 1994). Valori mai mari ale diferențierii între specii de cvercinee (*Q. robur*, *Q. petraea* și *Q. pubescens*), estimate pornind de la analiza de gene care codifică enzime, au fost raportate în diferite regiuni geografice ale Europei (BELLETTI *et al.* 2005; CURTU *et al.* 2007b; FINKELDEY 2001). Două din cele șapte gene, *Idh-B* și *Pgm-A*, au discriminat mai bine între *Q. robur* și *Q. pedunculiflora*, decât între populațiile conspecifice. Gena care codifică izocitrat dehidrogenaza (*Idh*) este una din puținele gene la care au fost detectate efecte ale selecției (GÖMÖRY *et al.* 2010 și referințele). Mai mult, genele *Idh-B* și *Pgm-A* au prezentat valori mari ale  $F_{ST}$  între speciile de cvercinee care cresc în Slovacia (GÖMÖRY și SCHMIDTOVA 2007) sau între specii asiatice de *Quercus* (POTENKO *et al.* 2007). Astfel de markeri genetici, care indică un nivel ridicat de flux genic în interiorul speciilor, dar un nivel redus de introgresie (flux genic interspecific), sunt foarte utili pentru delimitarea speciilor (PETIT și EXCOFFIER 2009).

Spre deosebire de alte specii de cvercinee (POTENKO *et al.* 2007; ZANETTO *et al.* 1994), *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* nu au putut fi separate în dendrograma UPGMA construită pe datele obținute din analiza setului de gene care codifică enzime. Populațiile s-au grupat foarte bine pe zone geografice și mai puțin după caracteristicile morfologice specifice fiecărui taxon. Totuși, în dendrogramă pot fi identificate grupuri formate dintr-un număr mic de populații ce aparțin unui singur taxon. Această grupare incompletă realizată pe baza unui set redus de gene, dar cu ajutorul căruia s-a reușit separarea altor taxoni (*Q. robur* vs. *Q. petraea*), susține ipoteza conform căreia *Q. pedunculiflora* este o unitate intraspecifică a *Q. robur* sau o specie incipientă mai bine adaptată la condițiile specifice silvostepii din sud-estul țării. La fel ca în cazul altor specii de cvercinee, fluxul genic între *Q. robur* și *Q. pedunculiflora*, cu precădere în zonele de interferență de areal (arboretele mixte), așa cum este cazul pădurii Letea din Delta Dunării, trebuie să fie destul de intens. Astfel, observații fenologice efectuate în doi ani consecutivi (2008 și 2009), într-un arboret mixt de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* din trupul de pădure Fundeanu, situat în sudul Moldovei, au reliefat suprapunerea fenofazei de înflorire la cei doi taxoni, permițând astfel, cel puțin teoretic, interfecundarea (CHESNOIU *et al.* 2009). În acest context, dacă interfecundarea se și produce, se poate trage concluzia că lipsa de izolare reproductivă poate contribui la erodarea statutului de entitate distinctă pentru *Q. pedunculiflora* (CURTU *et al.* 2009c). De altfel, Rushton (1993) face apel la rezultatele unor hibridări artificiale între *Q. robur*,

*Q. alba*, *Q. pubescens* și *Q. pedunculiflora*, comunicate de Jovanović *et al.* (1973), subliniind că, în timp ce hibridările interspecifice au avut o rată de succes scăzută (de aproximativ numai 1,5 %) prin comparație cu cele intraspecifice, încrucișările de tip *Q. robur* x *Q. pedunculiflora* au înregistrat o rată de reușită foarte mare (30,7 %), ceea ce susține ipoteza interfecundării în arborete mixte constituite din cei doi taxoni, ca urmare a suprapunerii perioadei de înflorire. Acest fapt poate reprezenta un impediment pe termen lung în asigurarea individualității genetice a *Q. pedunculiflora* față de *Q. robur*, subminând fie existența lor ca entități genetice distincte, fie speciația. Totuși, procesul de speciație nu ar exclude existența unui flux genic, pentru că selecția naturală ar acționa ca un filtru la genele cu relevanță pentru adaptare (de ex. la condițiile staționale din silvostepă), dar nu asupra întregului genom (HEY 2006).

#### *Analiza ADN-ului cloroplastic*

Este cunoscut faptul că diferențierea taxonilor înrudiți nu se produce tranșant la nivelul ADN-ului cloroplastic ca urmare a gradului înalt de conservare a haplotipurilor în speciație, dar și a unor posibile hibridări ce au avut loc după ultima glaciațiune (PETIT *et al.* 2004). Cele mai frecvente haplotipuri de ADN cloroplastic, dar și unul foarte rar, de origine prezumtiv caucaziană, se regăsesc atât la *Q. pedunculiflora*, cât și la *Q. robur*. Prezența acestor haplotipuri la ambii taxoni susține ipoteza existenței unui flux genic relativ recent între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur*, așa cum se presupune că a existat și între specii mult mai bine diferențiate din punct de vedere morfologic și ecologic (*Q. robur* și *Q. petraea*) (LEXER *et al.* 2006). Haplotipul 13, observat într-o singură populație de *Q. pedunculiflora* din sud-vestul României, a fost găsit anterior într-o populație de *Q. robur* din centrul țării (BORDÁCS *et al.* 2002). Ca urmare, haplotipurile observate pentru *Q. pedunculiflora* se regăsesc în totalitate la *Q. robur*, chiar dacă nu au fost detectate în acest studiu, ci în unele anterioare (BORDÁCS *et al.* 2002). Haplotipurile observate arată că strămoșii marii majorității a exemplarelor eșantionate în cadrul acestei cercetări provin din fostele refugii glaciare din Peninsula Balcanică și Italică (PETIT *et al.* 2002a) și într-o proporție mică (cazul exemplarelor de la Letea) probabil din zona Caucazului.

#### *Analiza SSRs*

Diferențele între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur* la nivelul SSRs se datorează în principal structurilor alelice diferite și în foarte mică măsură unor alele specifice unuia sau altuia din cei doi taxoni, alele care, de altfel, prezintă frecvențe foarte reduse. La fel ca la genele care codifică enzime, nu au fost constatate diferențe semnificative ( $P < 0.05$ ) între diversitatea genetică a *Q.*

*pedunculiflora* și cea a *Q. robur* la nivelul SSRs. Locusul cu cea mai mare putere de discriminare (de peste cinci ori mai mare decât media valorilor indicelui  $F_{ST}$ ) este PIE227, un marker trinucleotidic localizat în ADN-ul informațional (EST). Tot un marker de tip EST-SSR (FIR013) a fost identificat ca *outlier* – locus ce prezintă o valoare semnificativă a diferențierii față de un model neutru - între *Q. rubra* și *Q. elipsoidalis* în America de Nord (LIND și GAILING 2013). Interesant este că acest locus este situat în interiorul unei gene care codifică factori de transcripție ce intervin în reglajul fotoperiodic al creșterilor (CONSTANS-like gene). Specia *Q. ellipsoidalis*, la fel ca *Q. pedunculiflora*, este mai rezistentă la uscăciune decât specia-soră, *Q. rubra* și respectiv *Q. robur*. Atât locusul FIR013, cât și PIE227, prezintă două alele majore, ale căror frecvențe diferă între perechile de specii analizate.

Analiza varianței moleculare pentru ADN-ul nuclear confirmă modul de distribuție al procentelor de variație ce este caracteristic speciilor de arbori alogame și anemofile (WHITE *et al.* 2007). Astfel, majoritatea diferențelor genetice sunt între indivizii din interiorul populației (95%). Diferențele între populații sunt mai mici dacă se compară numai populațiile ce aparțin unui taxon (de ex. numai cele de *Q. robur*) decât în cazul comparației între populațiile ce aparțin unor taxoni diferiți (*Q. pedunculiflora* și *Q. robur*). Această coeziune genetică mai mare între populații ce aparțin unei grupe delimitate pe criterii morfologice susține ipoteza existenței a două unități taxonomice.

Din analiza dendrogramei UPGMA reiese existența unei similitudini genetice mai mari între populația de *Q. robur* situată în podișul Transilvaniei (Rupea, Brașov) și populațiile de *Q. robur* eșantionate la sud de Munții Carpați, decât între populațiile de *Q. robur*, pe de-o parte, și populațiile de *Q. pedunculiflora*, pe de altă parte, din zona de câmpie forestieră a Olteniei și Munteniei. Acest fapt indică un flux genic mai intens între populațiile de *Q. robur*, chiar dacă acestea sunt separate de o barieră geografică, reprezentată de Carpații Meridionali, comparativ cu fluxul genic dintre populații de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* din sudul țării, care sunt despărțite de numai câteva zeci de kilometri de teren plan. Transportul polenului în cazul speciilor anemofile, și în particular al stejarilor, poate avea loc pe distanțe foarte mari (DOW și ASHLEY 1998). Cele șapte populații analizate au format două grupuri în funcție de aspectul fenotipic (caracteristicile morfologice) al indivizilor componenți, și nu în funcție de distanța geografică dintre ele. Acest rezultat obținut pe baza celor 22 de markeri ADN constituie un argument pentru existența unei entități genetice distincte, specifice stejarului brumăriu (*Q. pedunculiflora*). În mod similar, pe baza a 20 gSSRs s-a obținut suportul statistic necesar pentru separarea la nivel molecular între *Q. robur* și *Q. petraea* (MUIR *et al.* 2000). Existența unei entități genetice distincte pentru *Q. pedunculiflora*, dar foarte apropiată de *Q. robur*, este

susținută și de rezultatele testului de apartenență bazat pe frecvențele alelelor (92% din arbori au fost atribuiți în mod corect, dacă se consideră ca referință clasificarea morfologică).

Cel mai puternic argument în favoarea existenței a două entități genetice care să corespundă încadrării pe criterii morfologice este furnizat de analiza Bayesiană (PRITCHARD *et al.* 2000). În acest tip de analiză au fost luate în considerare numai date genetice (genotipuri multilocus), fără a se utiliza niciun fel de informații privind apartenența indivizilor la un taxon sau la o anumită populație (locație geografică). Cea mai uzitată metodă pentru determinarea numărului de grupe omogene din punct de vedere genetic (cluster genetic) (EVANNO *et al.* 2005) a reliefat faptul că structura care explică cel mai bine datele observate este cea compusă din două entități. Marea majoritate a arborilor au fost atribuiți corect la clusterul specific unui taxon. Existența unor indivizi atribuiți în mod greșit, la care nu există o corespondență între fenotip și cluster-ul genetic specific acelui fenotip, a fost menționată în numeroase studii care au urmărit delimitarea unor specii strâns înrudite sau identificarea exemplarelor hibride (CRAFT *et al.* 2002; LEPAIS *et al.* 2009; VALBUENA-CARABANA *et al.* 2005). Neconcordanța poate fi explicată prin puterea limitată de discriminare a setului de markeri genetici în cazul acestor exemplare sau de faptul că acești indivizi sunt hibrizi introgresivi între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur*. Atunci când speciile sunt foarte apropiate din punct de vedere genetic și se analizează un număr limitat de regiuni de ADN, chiar și hibrizi de primă generație ( $F_1$ ) pot avea valori ale coeficientului de apartenență ( $Q$ ) apropiate de 0,10 sau de 0,90, valori prag folosite în multe cercetări recente, stabilite mai mult sau mai puțin arbitrar, pentru a distinge între specii pure, pe de o parte, și hibrizi, pe de altă parte (GUICHOUX *et al.* 2011). Spre deosebire de prezentul studiu, în investigații efectuate în Europa cu seturi mult mai mici de markeri genetici nucleari s-a reușit delimitarea genetică a altor taxonilor de stejari (e.g. *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. pyrenaica*), constatându-se, de asemenea, și o corespondență foarte bună cu încadrarea taxonomică realizată pe criterii morfologice (CURTU *et al.* 2007a; LEPAIS *et al.* 2009; NEOPHYTOU *et al.* 2011; NEOPHYTOU *et al.* 2010).

#### *Analiza comparativă gSSRs vs. EST-SSRs*

Nivelul de diversitate genetică estimat cu EST-SSRs, pentru același set de populații, este mai redus decât cel calculat pe baza gSSRs, confirmându-se astfel rezultate obținute pentru alte specii (DURAND *et al.* 2010; HU *et al.* 2011; POSTOLACHE *et al.* 2014). Totuși, deși sunt mai puțin variabile, EST-SSRs contribuie mai mult la diferențierea între *Q. pedunculiflora* și *Q. robur*, tendință reliefată atât de AMOVA, cât și de indicele de fixare  $F_{ST}$ . Analiza a 389 de markeri genetici de diverse tipuri în perechi de populații de *Q. robur* și *Q. petraea*, eșantionate în mai multe zone din Europa, a arătat că regiunile care codifică (*coding regions*) prezintă un grad

de diferențiere mai ridicat decât cele care nu codifică informația necesară sintezei proteinelor (SCOTTI-SAINTAGNE *et al.* 2004). Acest fapt arată că analiza secvențelor informaționale, exprimate în proteine, și care sunt mult mai probabil să fie supuse selecției în condiții particulare de mediu, este de preferat atunci când se urmărește surprinderea unor diferențe adaptative. Majoritatea markerilor de tip gSSRs au fost cartajați pe grupele de linkage (SCOTTI-SAINTAGNE *et al.* 2004) și se presupune că fac parte din regiuni care nu sunt transcrise. Ca urmare, gSSRs nu sunt supuse selecției direcționale, fapt care explică și polimorfismul lor mai ridicat. Atât testul de apartenență genetică bazat pe frecvențele alelelor (PAETKAU *et al.* 1995), cât și analiza Bayesiană realizată cu programul STRUCTURE, indică performanțe similare ale celor două categorii de SSRs. Se compensează astfel nivelul mai ridicat de polimorfism specific gSSRs cu gradul mai redus de diversitate reliefat de EST-SSRs. Totuși, numărul arborilor de *Q. robur* atribuiți corect a fost mai mare atunci când s-au folosit EST-SSRs, indiferent de modul de clasificare bazat pe frecvențele alelelor sau pe analiza Bayesiană.

## Concluzii

Cercetările efectuate au reușit în premieră diferențierea genetică a stejarului brumăriu (*Q. pedunculiflora*) de stejarul pedunculat (*Q. robur*). Identificarea diferențelor la nivel de ADN a fost posibilă prin analiza unui număr mare de SSRs localizate atât în interiorul, cât și în afara genelor. Marea majoritate a exemplarelor eșantionate în șapte populații din România au putut fi clasificate în concordanță cu încadrarea morfologică. Populațiile eșantionate în perechi, fiecare pereche fiind formată dintr-o populație de *Q. pedunculiflora* și una de *Q. robur* din aceeași regiune geografică, s-au grupat în funcție de aspectul fenotipic și nu de distanța geografică dintre ele, ceea ce susține ipoteza a două entități genetice specifice. Delimitarea pe baze genetice a stejarului brumăriu față de specia cea mai apropiată morfologic - stejarul pedunculat - s-a dovedit mult mai dificilă decât diferențierea, cu ajutorul markerilor genetici, a altor specii de cvercinee europene sau nord-americane. Nivelul mai redus de diferențiere genetică între cei doi taxoni, comparativ cu alte perechi de specii din genul *Quercus*, sugerează că separarea stejarului brumăriu, ca urmare a adaptării la condițiile de silvostepă, este un proces în derulare sau de dată relativ recentă, astfel încât nu a existat timpul necesar pentru consolidarea unor bariere reproductive. Această concluzie este susținută și de observarea a numeroase exemplare intermediare genetic și de unele neconcordanțe între clasificarea fenotipică, bazată în principal pe părozitatea de pe dosul frunzelor, și cea genetică în zone de interferență de areal, așa cum este pădurea mixtă de stejar brumăriu și stejar pedunculat de pe Grindul Letea.

## 2.2 Diferențierea genetică între gârniță (*Q. frainetto* Ten.) și stejarul pufos (*Q. pubescens* Willd.)

### Introducere

Evaluarea diferențierii genetice între specii strâns înrudite contribuie la înțelegerea proceselor evolutive care conduc la divergența între specii. Datorită complexității sale, genul *Quercus* este considerat un model pentru studiul divergenței între populații, delimitării speciilor și a fenomenului de hibridare naturală (e.g. CURTU *et al.* 2009a; GAILING *et al.* 2007; PEÑALOZA-RAMÍREZ *et al.* 2010; ZENG *et al.* 2010). În Europa, cele mai multe studii s-au concentrat pe diferențierea genetică și identificarea unor regiuni genomice care discriminează între cele mai răspândite specii: *Q. robur* și *Q. petraea* (JENSEN *et al.* 2009; MUIR și SCHLÖTTERER 2005; NEOPHYTOU *et al.* 2010; SCOTTI-SAINTAGNE *et al.* 2004). Există însă puține date despre diferențele genetice între două specii importante din punct de vedere ecologic, dar și economic, din secția *Dascia* Kotschy, subgenul *Lepidobalanus*: *Q. frainetto* and *Q. pubescens* (ȘOFLETEA și CURTU 2007). Cele două specii ating pe teritoriul României limita nordică a arealului. *Q. frainetto* este o specie mezoxerofită care suportă soluri dintre cele mai compacte, în timp ce *Q. pubescens* este mai bine adaptată condițiilor de secetă și uscăciune, găsindu-se frecvent în stațiuni de silvostepă și în zona de dealuri, pe expoziții însorite și soluri rendzinice, ca de exemplu în zona centrală a Transilvaniei (STĂNESCU *et al.* 1997).

Un număr mic de studii oferă informații privind diversitatea genetică a speciilor *Q. frainetto* și *Q. pubescens* în România. Astfel, valorile diversității la nivelul ADN-ului nuclear au fost inferioare altor specii de cvercinee prezente în pădurea mixtă de stejari de la Bejan (CURTU *et al.* 2007b). Haplotipurile de ADN cloroplastic observate la cele două specii sunt specifice zonei de nord a Peninsulei Balcanice, găsindu-se și la speciile de cvercinee mai frecvent întâlnite în zonă: *Q. robur* și *Q. petraea* (CURTU *et al.* 2007a; PETIT *et al.* 2002b). Ambele specii formează un grup în dendrograma construită pentru cinci specii de stejar răspândite în peninsula Italică (FORTINI *et al.* 2009). Aceste cercetări s-au bazat însă pe un număr foarte redus de exemplare (chiar un singur exemplar pe populație în peninsula Italică) și s-a eșantionat adesea în arborete mixte de cvercinee, în care se pot găsi numeroși hibrizi.

Recent a fost posibilă dezvoltarea unor markeri genici (expressed sequence tags - EST) de tip repetitiv (SSRs), situați în interiorul unor gene, a căror expresie a fost analizată în diferite condiții experimentale la stejarul pedunculat și la gorun - *Q. robur/Q. petraea* library - (DURAND

*et al.* 2010). Spre deosebire de gSSRs, EST-SSRs au avantajul localizării în porțiuni ale genomului care codifică informația și deci reflectă deosebiri existente la nivel de genă. Scopul cercetărilor a fost estimarea diferențierii genetice între cele două specii autohtone din secția *Dascia*, utilizând atât markeri gSSRs, cât și EST-SSRs, dezvoltati recent la gorun și stejar pedunculat, și care nu au mai fost testați până în prezent pe alte specii (cazul EST-SSRs). S-a analizat dacă informația genotipică obținută dintr-un set de șapte markeri moleculari este suficientă pentru separarea celor două specii atât la nivel populațional, cât și la nivel individual.

## Material și metode

### *Strategia de eșantionare*

Două populații tipice, localizate în regiuni ecologice diferite, au fost selectate atât pentru *Q. pubescens*, cât și pentru *Q. frainetto*: Măcin-Tulcea (45°13'N, 28°14'E) și Săcălaia-Cluj (46°57'N, 23°56'E) pentru *Q. pubescens*; Seaca Optășani-Olt (44°43'N, 24°28'E) și Lugoj-Timiș (45°43'N, 21°59'E) pentru *Q. frainetto* (CURTU *et al.* 2011a). În anul 2010 s-au recoltat probe biologice din 125 de exemplare adulte, după cum urmează: 62 de exemplare de *Q. pubescens* (32 la Măcin-Tulcea și 30 la Săcălaia-Cluj) și 63 de exemplare de *Q. frainetto* (31 la Seaca Optășani-Olt și 32 la Săcălaia-Cluj). Coordonatele spațiale ale fiecărui exemplar au fost înregistrate cu ajutorul unui receptor GPS. S-au eșantionat numai exemplare care au prezentat caracterele tipice de recunoaștere (STĂNESCU *et al.* 1997).

### *Analize genetice*

ADN-ul total a fost extras din muguri cu ajutorul Qiagen DNeasy96 Plant Kit, urmând pașii protocolului standard de lucru, cu excepția folosirii azotului lichid pentru mărunțirea materialului biologic. ADN-ul a fost păstrat la -60°C până la momentul analizelor de laborator. Cinci gSSRs (KAMPFER *et al.* 1998; STEINKELLNER *et al.* 1997) și două EST-SSRs (DURAND *et al.* 2010) au fost amplificate cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț (PCR). Ambele tipuri de markeri au fost dezvoltate pornind de la *Q. robur/Q. petraea libraries*. Mai multe informații despre perechile de primeri, unitatea de repetare și lungimea alelelor sunt precizate în Tabelul 2-13. Primerul înainte a fost marcat cu un colorant fluorescent Beckman (D2, D3 și D4). Markerii au fost grupați în două reacții de tip *multiplexing*: în prima reacție au fost grupate cele cinci gSSRs iar în cea de-a doua cele două EST-SSRs. Reacțiile s-au desfășurat într-un volum de 20 μl conținând aproximativ 10 ng ADN *template*; 1x *Promega colorless PCR buffer*; 2 mM of MgCl<sub>2</sub>; 0.45 mM din fiecare dNTP (*Fermentas*); concentrațiile primerilor sunt date în Tabelul 2-13; 1.15 U *Taq DNA polymerase (Promega)*. Amplificarea s-a efectuat cu *Corbett Thermal Cycler*.

Programul a constat din: 3 minute denaturare la 94 °C urmate de 31 de cicluri de câte 50 s denaturare la 94 °C, 40 s *annealing* la 52 °C pentru gSSRs (57 °C în cazul EST-SSRs), 1 min 20 s elongare la 70 °C și un pas final de elongare la 70 °C pentru 12 min. Produsele PCR au fost rulate pe *Beckman Coulter Genetic Analyser* folosind metoda Frag-3 și *Size Standard 400*. Semnalele au fost apoi prelucrate cu *Fragment Analysis Software*, utilizând parametri standard și corecția PA ver1.

**Tabelul 2-13** Caracteristicile celor șapte markeri moleculari analizați

Tipul de marker genetic	Locus	Mărimea unității de repetare	Grupul de linkage (LG)	Colorant <i>Beckman</i>	Concentrația primerului (μM)	Mărimea alelei (bp)
Genomic SSRs (gSSRs)	QrZAG11	di	10	D3	0.34	242-289
	QrZAG39	di	5	D2	0.28	105-169
	QrZAG96	di	10	D3	0.25	140-180
	QpZAG110	di	8	D4	0.18	205-243
	QrZAG112	di	12	D4	0.09	82-112
EST-SSRs	GOT004	di	2	D4	0.20	266-306
	PIE040	tri	-	D3	0.33	171-190

#### *Analiza statistică a datelor*

Erorile de genotipare datorate alelelor nule și evaluării semnalelor repetitive (*stutter peaks*) au fost verificate cu software-ul MICRO-CHECKER 2.2.0.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.* 2004). Cu programul GenAIEx version 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006) s-au calculat, pentru fiecare locus și specie, următorii indici: numărul de alele, numărul de alele specifice, frecvențele alelelor, heterozigoția observată și așteptată (diversitatea genică), distanțele genetice (*unbiased Nei*). Bogăția alelică (EL MOUSADIK și PETIT 1996; PETIT *et al.* 1998), un parametru independent de mărimea eșantionului, a fost calculat cu programul FSTAT version 2.9.3.2 (GOUDET 1995). Cel mai mic număr de indivizi (n) pe locus a fost la markerul QrZAG39 (43). Diferențele între specii s-au testat cu ajutorul testului *t* (Student). Dendrograma UPGMA (*unweighted pair group method arithmetic average*), bazată pe distanțele genetice *unbiased Nei*, a fost construită cu programul MEGA versiunea 4 (TAMURA *et al.* 2007).



Partiționarea varianței moleculare în componente (AMOVA) s-a realizat cu programul ARLEQUIN ver 3.5.1.2 (EXCOFFIER *et al.* 2005). Valorile  $F_{ST}$  au fost estimate pentru fiecare locus și pentru întreg setul de markeri genetici. Semnificația valorilor  $F_{ST}$  s-a testat prin permutarea genotipurilor între populații și specii. Au fost efectuate 10.000 de permutări. Testul de apartenență genetică bazat pe frecvențele alelelor (PAETKAU *et al.* 1995) și care s-a implementat în programul GenA1Ex v. 6.4 a fost folosit pentru clasificarea indivizilor pe specii. Un individ a fost încadrat la specia pentru care a prezentat cea mai mare valoare a *log likelihood*. Metoda de grupare bazată pe analiza Bayesiană și implementată în programul STRUCTURE version 2.3.3 (PRITCHARD *et al.* 2000) a fost utilizată pentru determinarea structurii genetice. S-au folosit două variante de lucru. Prima variantă a constat din așa-numita *blind procedure*, care nu a luat în considerare informații privind clasificarea morfologică și localizarea geografică a indivizilor eșantionați. Cea de-a doua variantă a presupus includerea în model a localizării geografice a indivizilor eșantionați (modelul *LocPrior*). Au fost realizate 20 de rulări independente pentru fiecare valoare  $K$ , numărul de grupuri genetice omogene, care a variat de la 1 la 5. În ambele modele s-a utilizat opțiunea *correlated allele frequency* (FALUSH *et al.* 2003). Fiecare rulare a constat din 50 000 burn-in steps urmați de 1 000 000 de iterații. Numărul de grupuri genetice omogene ( $K$ ), a fost estimat atât cu ajutorul parametrului  $\Delta K$ , care se bazează pe rata schimbării ‘log probability of data’ ( $L(K)$ ) între valori succesive ale lui  $K$  (EVANNO *et al.* 2005), cât și prin metoda tradițională bazată pe valoarea maximă a lui  $L(K)$ . Calculele au fost efectuate cu programul [STRUCTURE HARVESTER](#) (EARL 2011).

## Rezultate și discuții

Un nivel ridicat de polimorfism pentru ambele specii a fost estimat cu ajutorul celor șapte markeri moleculari de tip gSSRs și EST-SSRs (Tab. 2-14). La doi loci dinucleotidici, QrZAG112 și QpZAG110, a fost observată o reducere accentuată a variației în cazul speciei *Q. frainetto*. Chiar dacă cele mai frecvente alele coincid la ambele specii, există și numeroase alele specifice (i.e. alele care se găsesc în fiecare din cele două populații ale unei specii, dar lipsesc de la cealaltă specie), cele mai multe cu frecvențe foarte reduse ( $p_i < 0.05$ ). Multe din aceste alele rare apar foarte probabil ca fiind specifice unei specii datorită mărimii eșantionului și polimorfismului ridicat ce caracterizează SSRs (LITT și LUTY 1989). Numai șapte alele specifice, cinci pentru *Q. pubescens* și două pentru *Q. frainetto*, au avut o frecvență mai mare ( $p_i > 0.05$ ). Alela 92bp (Fig. 2-12a) la locusul QrZAG112 (frecvența=0.17) și alela 245bp la QrZAG11 (frecvența =0.10) sunt printre cele cinci alele specifice pentru *Q. pubescens*. Alele specifice

pentru *Q. frainetto* au fost detectate în regiunile EST: alela 184bp la locusul PIE040 (frecvența=0.10) și alela 304bp (frecvența =0.06) la GOT004.

Prezența alelelor nule (i.e. neamplificate) a fost semnalată în două regiuni, QrZAG39 și GOT004, conform programului Micro-Checker. Locusul QrZAG39 este menționat și la *Q. robur* și *Q. petraea* ca având alele nule (NEOPHYTOU *et al.* 2010). De asemenea, numărul mare de alele detectate la locusul GOT004 (Tab. 2-14) a căror lungime diferă numai cu o pereche de baze (bp), deși unitatea de repetare este dinucleotidică (TG)<sub>n</sub>, indică existența unor mutații în regiunile flanc ale regiunii de ADN repetitiv.

**Tabelul 2-14** Indici ai diversității genetice pentru *Q. pubescens* (PUB) și *Q. frainetto* (FRA)

Locus	N <sub>a</sub>		A		H <sub>o</sub>		H <sub>e</sub>	
	PUB	FRA	PUB	FRA	PUB	FRA	PUB	FRA
QrZAG11	18	10	17.1	9.0	0.755	0.545	0.844	0.610
QrZAG39	21	21	20.1	21.0	0.796	0.744	0.929	0.922
QrZAG96	20	17	19.6	16.2	0.880	0.855	0.929	0.903
QpZAG110	15	12	14.4	11.3	0.788	0.474	0.853	0.462
QrZAG112	11	5	10.7	4.6	0.810	0.194	0.819	0.181
GOT004	24	25	23.8	23.4	0.844	0.857	0.937	0.940
PIE040	10	12	9.9	10.9	0.739	0.732	0.701	0.686
Media	17.0	14.6	16.5	13.8	0.802	0.629	0.859	0.672

N<sub>a</sub> – numărul de alele, A – bogăția alelică conform tehnicii *rarefaction* (n=43 indivizi), H<sub>o</sub> – heterozigoția observată, H<sub>e</sub> – heterozigoția așteptată.

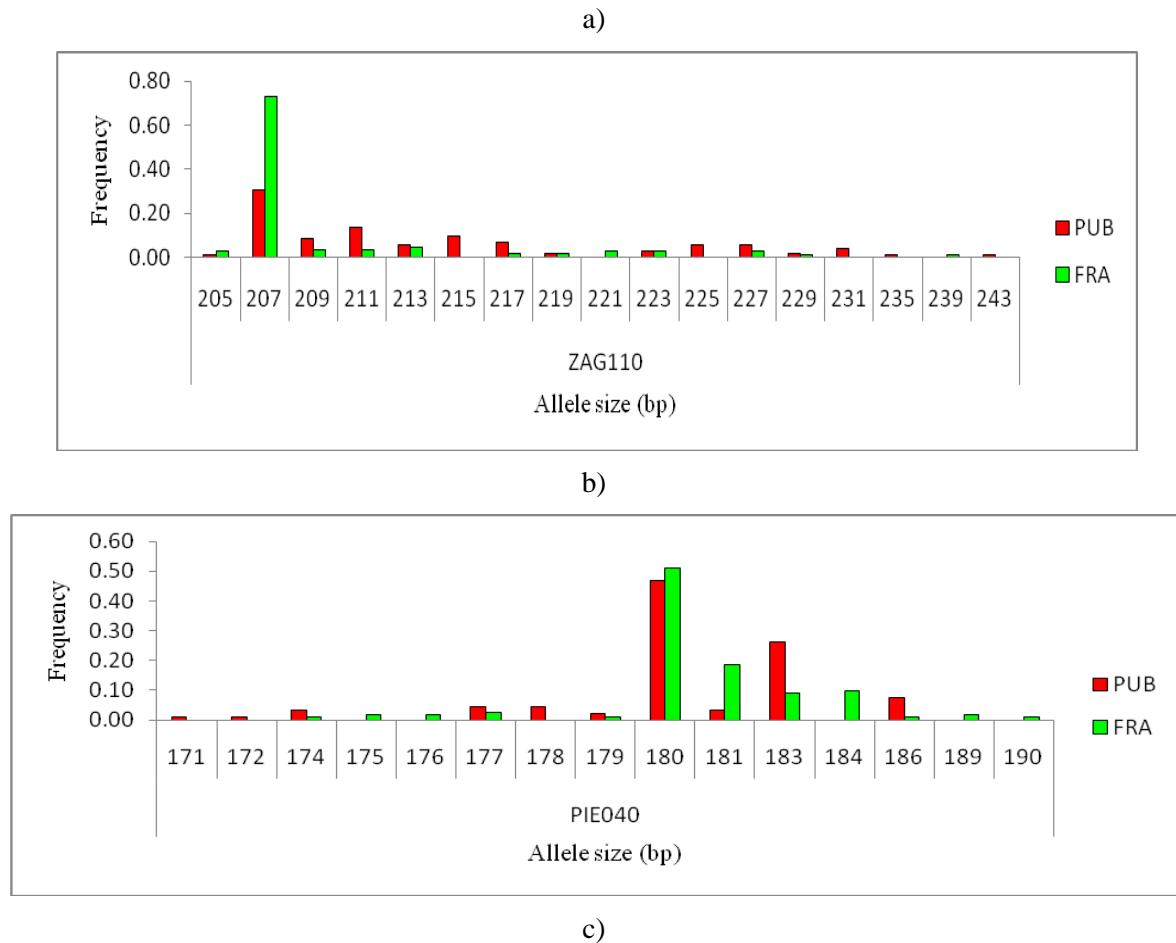
Valorile diversității genetice au fost mai mari la *Q. pubescens* decât la *Q. frainetto* (Tab. 2-14). O bogăție alelică mai mare la *Q. pubescens* comparativ cu *Q. frainetto* ar putea fi explicată prin caracteristica acestei specii de a se hibrida frecvent cu alte specii strâns înrudite de cvercinee autohtone (*Q. petraea*, *Q. robur*). Într-adevăr, în complexul de cvercinee din pădurea Bejan-Deva s-au observat mai mulți hibrizi între *Q. pubescens* și celelalte specii prezente în zonă decât între *Q. frainetto* și alte trei specii (CURTU *et al.* 2007a). Mai mult, unele combinații hibride în care participă specia *Q. frainetto*, ca de exemplu *Q. frainetto* x *Q. robur*, au fost extrem de rare în pădurea de amestec de cvercinee de la Bejan. Întrucât ambele specii, *Q. pubescens* și *Q.*

*frainetto*, au avut un procent de reprezentare similar în pădurea Bejan, diferențele privind ratele de hibridare nu sunt influențate de abundența lor relativă, cum este cazul într-un arboret mixt de cvercinee din Franța (LEPAIS *et al.* 2009). Mai mult, *Q. pubescens* se hibridează intensiv cu *Q. petraea* în alte zone de areal (e.g. în Caucaz sau în Peninsula Italică, MENITSKY 2005; SALVINI *et al.* 2008).

Doi dintre cei șapte loci analizați, ambii de tip gSSRs, au prezentat valori foarte mari pentru indicele  $F_{ST}$  (Tab. 2-15). Locusul QrZAG112 (Fig. 2-12a), care diferențiază cel mai bine între cele două specii, a avut o putere mare de discriminare și între *Q. petraea* și *Q. robur* (SCOTTI-SAINTEAGNE *et al.* 2004). Situația este însă diferită pentru alt locus de tip *outlier* între *Q. petraea* și *Q. robur*, QrZAG96, care prezintă o valoare extrem de scăzută a lui  $F_{ST}$  în prezentul studiu (Tab. 2-15). Dintre cei doi loci EST-SSRs, PIE004 diferențiază cel mai bine între *Q. robur* și *Q. petraea*. Acești loci cu valori mari ale indicelui  $F_{ST}$  sunt situați foarte probabil în regiuni genomice supuse selecției (LEXER *et al.* 2006; NEOPHYTOU *et al.* 2010; SCOTTI-SAINTEAGNE *et al.* 2004). Per total, nivelul de diferențiere genetică între *Q. pubescens* și *Q. frainetto* a fost ridicat și semnificativ ( $F_{ST}=0.067$ ;  $P<0.05$ ). Diferențe semnificative între *Q. frainetto* și *Q. pubescens* ( $P<0.05$ ) au fost găsite și în Italia, pe baza unui set de cinci gSSRs, dar pe un eșantion foarte redus (FORTINI *et al.* 2009).

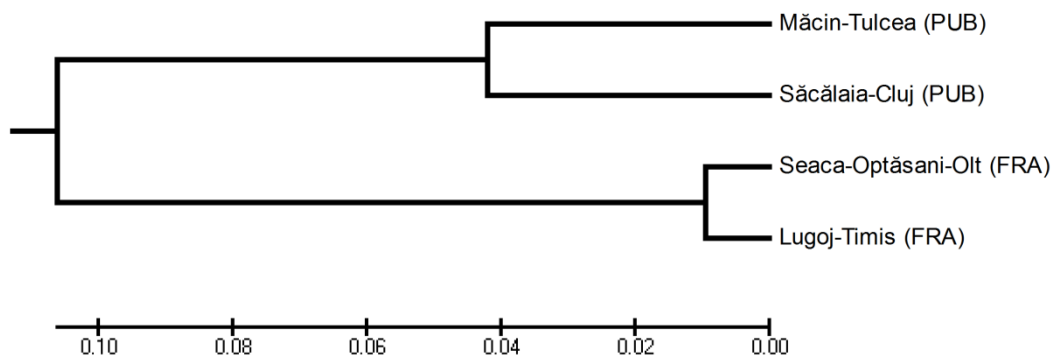
**Tabelul 2-15** Valorile indicelui de diferențiere  $F_{ST}$  între *Q. pubescens* și *Q. frainetto*

Locus	$F_{ST}$	P (10.000 replicații)
QrZAG112	0.290	0.00
QpZAG110	0.130	0.00
QrZAG11	0.049	0.00
PIE040	0.041	0.00
GOT004	0.010	0.01
QrZAG96	0.009	0.02
QrZAG39	0.002	0.43
7 loci	0.067	0.00

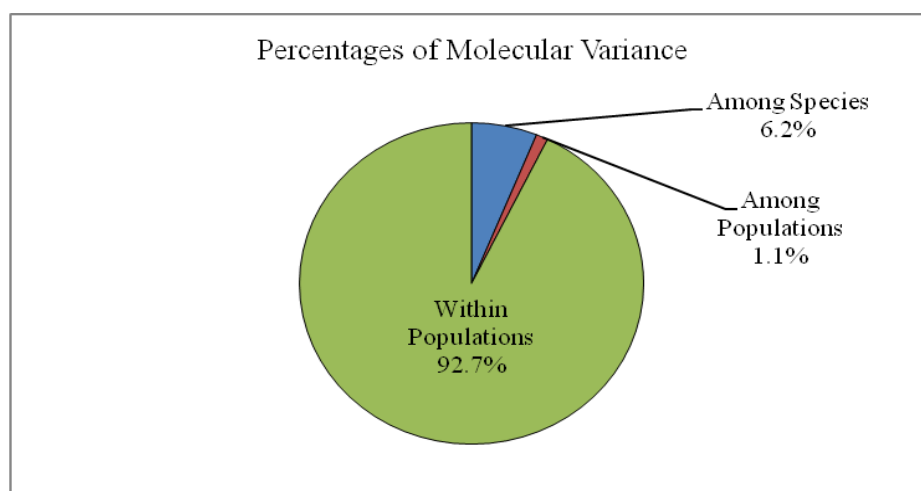


**Fig. 2-12** Structura alelică la locii cu cele mai mari valori ale indicelui  $F_{ST}$ : a) QrZAG112, b) QpZAG110, c) PIE040. Abrevieri: PUB – *Q. pubescens*, FRA – *Q. frainetto*, bp – perechi de baze.

Cele patru populații se grupează în funcție de specie și nu de originea geografică (Fig. 2-13). Distanța genetică între populațiile de *Q. frainetto* este mult mai mică decât între populațiile de *Q. pubescens*, ceea ce este în concordanță cu distanțele geografice. Analiza Varianței Moleculare arată că variația genetică între *Q. pubescens* și *Q. frainetto* este de aproximativ șase ori mai mare decât variația dintre populații în interiorul speciilor (Fig. 2-14).

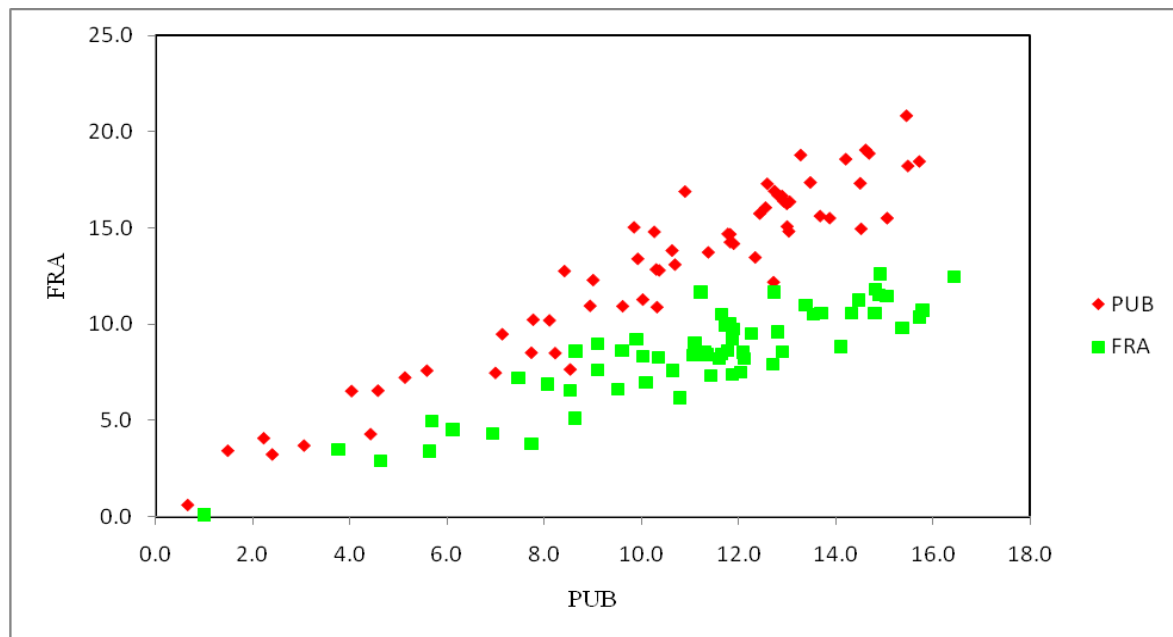


**Fig. 2-13** Dendrograma UPGMA bazată pe distanțele genetice *unbiased Nei* între populații de *Q. pubescens* (PUB) și *Q. frainetto* (FRA)

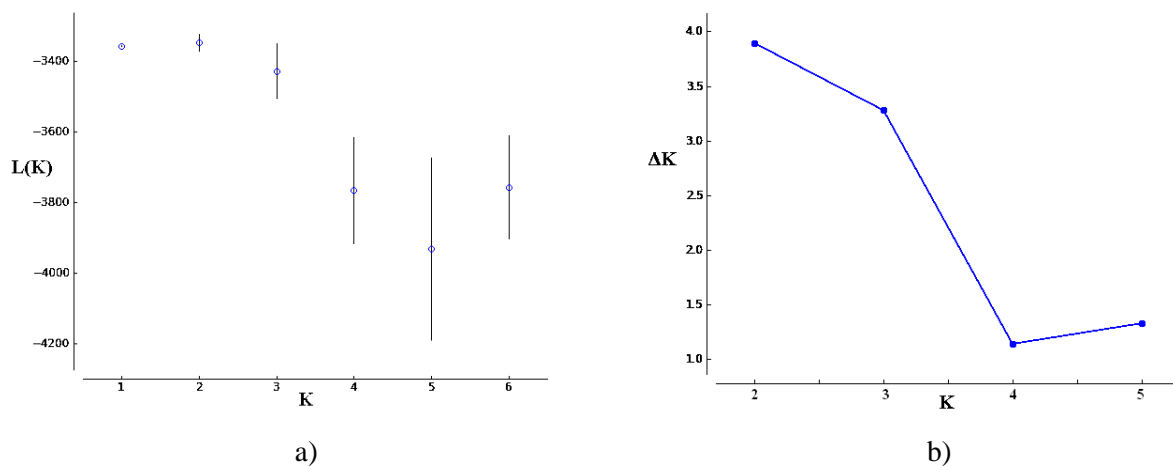


**Fig. 2-14** Rezultatele analizei moleculare a varianței (AMOVA)

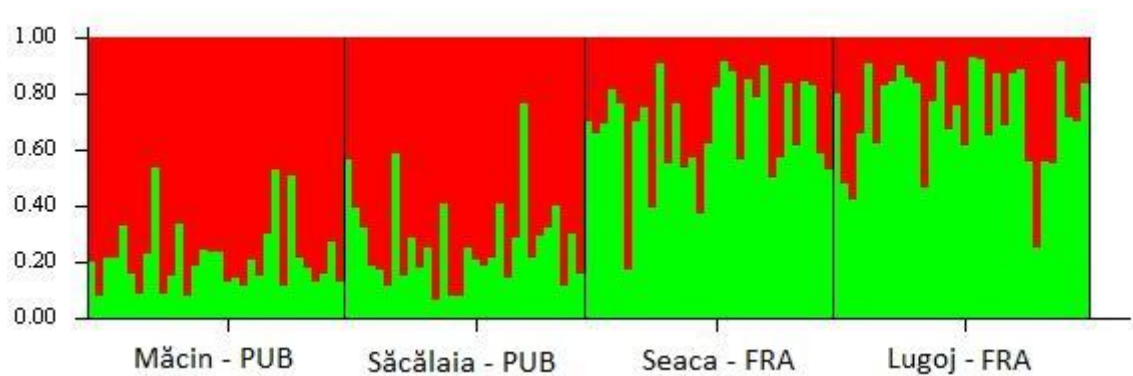
Rezultatele testului de apartenență genetică, bazat pe frecvențele alelelor și implementat în programul GenAlEx ver. 6.4., confirmă încadrarea taxonomică în 96% din cazuri (Fig. 2-15). Numai cinci indivizi, patru de *Q. pubescens* și unul de *Q. frainetto*, nu au fost clasificați corect pe baza genotipurilor multilocus. Analiza Bayesiană a confirmat existența unei structuri cu două grupuri genetice omogene (clustere genetice), valoarea maximă pentru  $\Delta K$  fiind pentru  $K=2$  (Fig. 2-16). Fiecare specie a fost reprezentată de un singur cluster. Coeficientul de apartenență ( $Q$ ), care corespunde probabilității unui individ de a aparține la un cluster genetic, a fost utilizat pentru determinarea statutului taxonomic (Fig. 2-17). Atunci când s-au luat în calcul strict datele moleculare, 90% dintre indivizi au avut cea mai mare valoare a coeficientului ( $Q > 0.50$ ) pentru grupul genetic care corespunde fenotipului lor (Fig. 2-17a). Procentajul de atribuire corectă atinge valoarea de 100% dacă în model se ia în considerare și localizarea geografică a indivizilor (Fig. 2-17b).



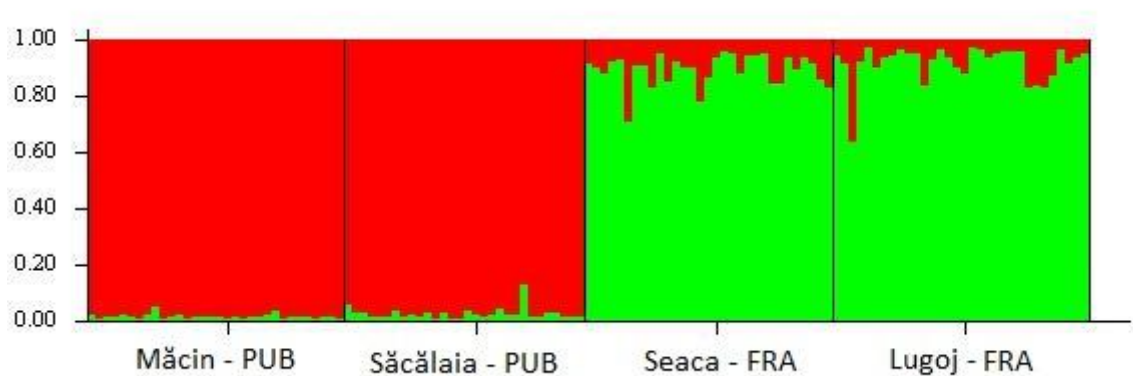
**Fig. 2-15** Clasificarea genetică a arborilor de *Q. pubescens* (PUB) și *Q. frainetto* (FRA) cu ajutorul procedurii bazat pe frecvențele alelelor, implementat în software-ul GenAIEx ver. 6.4



**Fig. 2-16** Determinarea numărului cel mai probabil de clustere genetice ( $K=2$ ) prin procedeul bazat pe: a) valoarea medie  $L(K)$  ( $\pm SD$ ); b) valoarea  $\Delta K$  calculată ca  $\Delta K = m|L''(K)|/s[L(K)]$ .



a)



b)

**Fig. 2-17** Atribuirea exemplarelor eșantionate la unul din cele două cluster specifică fiecărei specii: a) nu s-a utilizat niciunfel de informație privind fenotipul sau localizarea geografică, b) s-a utilizat modelul *LocPrior*. Fiecare bară verticală, formată dintr-un segment de culoare roșie și unul de culoare verde, reprezintă un individ. Mărimea segmentului de culoare roșie este proporțională cu probabilitatea ( $Q$ ) asociată unui individ de a aparține grupului genetic 1 ('*pubescens*') iar cea a segmentului de culoare verde cu probabilitatea de a aparține grupului genetic 2 ('*frainetto*'). Cele patru populații de *Q. pubescens* (PUB) și *Q. frainetto* (FRA) sunt separate de o linie neagră.

Dintre indivizii atribuiți greșit (10%) folosind procedura *blind*, niciunul nu a avut o valoare a lui  $Q$  mai mare de 0.85 pentru clusterul corespunzător celeilalte specii. Cei mai mulți indivizi au avut o valoare a lui  $Q$  care a variat între 0.50 și 0.60, o proporție specifică de regulă exemplarelor hibride, deși au fost eșantionate numai exemplare tipice în patru arborete pure de *Q. frainetto* și *Q. pubescens*. Neconcordanța semnalată pentru cei 13 indivizi poate fi explicată prin faptul că datele moleculare nu sunt suficient de informative sau exemplare sunt hibridi (forme introgressive). Absența unor exemplare de *Q. frainetto* din regiunea geografică în care se găsesc populațiile de *Q. pubescens* de la Săcălaia-Cluj și Măcin-Tulcea vin în sprijinul primei ipoteze.

Mai mult, speciile înrudite care s-au diferențiat relativ recent prezintă încă multe variante alelice comune (engl. *ancestral polymorphism*), fapt care poate influența clasificarea pe baze genetice (MUIR și SCHLÖTTERER 2005).

Pe de altă parte, suprapunerea de areal între *Q. frainetto* și *Q. pubescens* creează posibilitatea hibridării acestora (ȘOFLETEA și CURTU 2007). Gradul de amestec genetic (*degree of admixture*) a fost mai mare pentru populațiile de *Q. frainetto* decât pentru cele de *Q. pubescens* (0.30 versus 0.25), ceea ce sugerează o introgresie mai mare în cadrul speciei *Q. frainetto*. Studii recente aduc dovezi în sprijinul hibridării între exemplare situate la distanțe mari, prin dispersia pe spații largi a polenului (LEPAIS *et al.* 2009). Astfel, cele două populații de *Q. pubescens* din studiul de față ar fi numai aparent izolate de alte specii de cvercinee, inclusiv de *Q. frainetto*. Aceeași ipoteză a fost luată în considerare pentru a explica prezența unor hibridi cu *Q. pyrenaica* și *Q. pubescens* într-un arboret mixt de *Q. robur* și *Q. petraea* din Franța, deși cele mai apropiate populații de *Q. pyrenaica* și *Q. pubescens* sunt localizate la zeci de kilometri depărtare.

## Concluzii

Cele două specii, *Q. pubescens* și *Q. frainetto*, pot fi separate la nivel populațional pe baza analizei unui număr redus de regiuni genomice, care conțin repetări de secvențe simple de ADN. O concordanță deplină între clasificarea genetică și cea morfologică la nivel de individ este posibilă numai dacă în modelul folosit pentru analiza Bayesiană se ia în considerare locația geografică. În absența acestei informații, cu ajutorul a numai șapte markeri moleculari, se poate determina specia cu o probabilitate foarte mare.



## 2.3 Distribuția spațială a diversității genetice într-o pădure de amestec de cvercinee

### Introducere

Cunoașterea modului în care sunt distribuite variantele genetice în spațiu, i.e. structurii genético-spațiale (SGS), este deosebit de utilă în acțiunea de conservare și management a resurselor genetice. Gruparea spațială a indivizilor înrudiți din populație este rezultanta interacțiunii între numeroși factori genetici și demografici (EPPERSON 1992; HAMPE *et al.* 2010; KALISZ *et al.* 2001; VEKEMANS și HARDY 2004). Astfel, intensitatea SGS este puternic influențată de capacitatea de diseminare specifică unei specii, i.e. SGS sunt mai bine reprezentate atunci când distanțele de polenizare și de diseminare sunt mai mici (CAVERS *et al.* 2005). Parametrii demografici, ca de exemplu densitatea populației sau distribuția spațială a indivizilor, sunt de asemenea determinanți pentru SGS. Intensitatea SGS se așteaptă să crească în populații mai puțin dense, chiar dacă distanțele mai mari de diseminare în populații cu desime scăzută pot compensa consecințele derivei genetice (BORN *et al.* 2008; VEKEMANS și HARDY 2004). O desime ridicată, cum este cazul în arborete mixte, poate limita dispersia polenului și semințelor în spațiu (HARDY 2009). Reducerea mărimii populației în timp, prin eliminare naturală, de la stadiul juvenil la cel adult, poate conduce la o scădere a intensității SGS în timp (CHUNG *et al.* 2003). Gradul de agregare spațială a indivizilor înrudiți poate reflecta impactul unor intervenții silviculturale (COTTRELL *et al.* 2003; PAFFETTI *et al.* 2012; RAJENDRA 2011) sau particularități ale sistemului de reproducere (HOEBEE *et al.* 2006; KALISZ *et al.* 2001; LUNA *et al.* 2005). Interacțiunea complexă a factorilor care influențează distribuția genético-spațială poate avea rezultate relativ neașteptate, ca de exemplu absența SGS într-o pădure virgină de fag sau prezența SGS într-un arboret echien de fag de origine artificială (PIOTTI *et al.* 2013). Fenomenul de hibridare introgresivă poate, de asemenea, avea o influență asupra SGS din arborete datorită unui exces de încrucișări între indivizi învecinați care aparțin unor specii diferite și agregării spațiale a hibridilor (VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007).

Cvercineele (genul *Quercus*, familia Fagaceae) reprezintă una din grupele cele mai răspândite de specii lemnoase din pădurile zonei temperate și mediteraneene. Sunt specii cu longevitate ridicată, unisexual-monoice, alogame, anemogame și cu diseminare gravitațională, o proporție redusă din fructe (ghinde) fiind dispersată de către animale (e.g. păsări). Cele mai multe specii de cvercinee nu produc ghinde anual, periodicitatea fructificațiilor putând ajunge în anumite cazuri până la 10 ani (STĂNESCU *et al.* 1997). Sunt specii importante atât din punct de vedere economic,

cât și ecologic, fiind bine cunoscute pentru propensiunea lor spre hibridare (BURGER 1975; RUSHTON 1993). Un număr redus de studii a abordat problematica SGS în populații de stejar și factorii de natură genetică și ecologică care influențează aceste structuri (BACILIERI *et al.* 1994; BERG și HAMRICK 1995; HAMPE *et al.* 2010; STREIFF *et al.* 1998; VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007). Intensitatea SGS, cuantificată cu ajutorul parametrului *Sp*, este mai redusă decât la multe alte specii de plante (HAMPE *et al.* 2010; VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007; VEKEMANS și HARDY 2004). Diferențe în privința SGS între cele două cele mai răspândite specii din Europa, *Q. robur* și *Q. petraea*, au fost observate în arborete mixte. Specia *Q. robur* a prezentat SGS mai slabe comparativ cu *Q. petraea*, fapt care poate fi explicat de o mai bună dispersie a ghindelor de *Q. robur* (COTTRELL *et al.* 2003; JENSEN *et al.* 2003; STREIFF *et al.* 1998). Influența fenomenului de hibridare naturală asupra SGS la *Q. petraea* și *Q. pyrenaica* a fost abordată o singură dată, în arborete mixte de cvercinee din Spania (VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007). O componentă interspecifică a SGS a fost găsită în arboretul cu cea mai mare rată de hibridare. Totuși, până în momentul de față, nu au fost efectuate investigații privind efectul densității și fluxului genic interspecific asupra SGS în arborete constituite din mai mult de două specii cvercinee care se hibridează natural.

Scopul cercetărilor a fost caracterizarea SGS într-o pădure de amestec de cvercinee prin combinarea datelor corespunzătoare genotipurilor multilocus cu cele spațiale. Cercetările își propun să răspundă la următoarele întrebări:

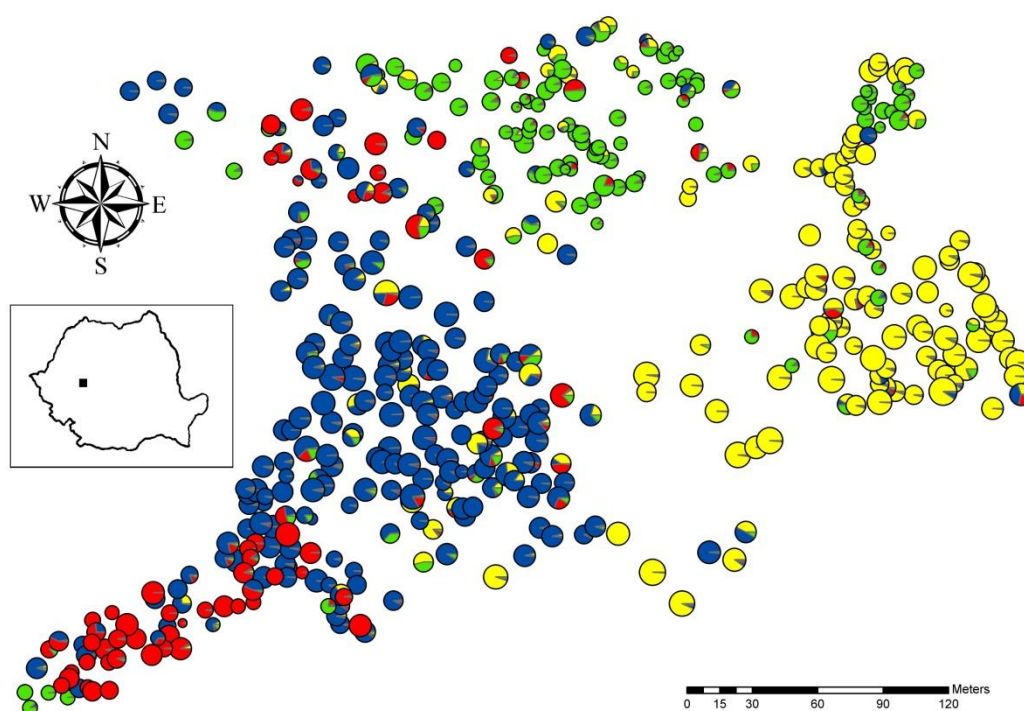
(i) există o distribuție randomizată a genotipurilor într-o pădure de amestec cu patru specii de cvercinee? S-a testat ipoteza absenței SGS prin efectuarea unei autocorelații spațiale atât la nivel de specie, cât și la nivel de arboret. Intensitatea SGS ar trebui să fie mai mare o dată cu scăderea numărului de exemplare conspecifice pe unitatea de suprafață, cu toate că prezența unor arbori, aparținând altor specii, ar putea juca rolul unor bariere fizice în calea fluxului genic.

(ii) în ce măsură sunt influențate SGS de fenomenul de hibridare naturală? Pentru a răspunde la această întrebare, exemplarele eșantionate au fost clasificate din punct de vedere genetic în specii pure (engl. *purebreds*) și hibridi. Prin cuantificarea SGS pentru fiecare specie *sensu lato* și *sensu stricto* (numai exemplare pure din punct de vedere genetic), s-a testat dacă exemplarele hibride se găsesc în vecinătatea părinților. Dacă exemplare hibride ar fi distribuite randomizat în arboret, nu ar trebui să fie o influență asupra SGS, după înlăturarea lor din analiză. Pentru a determina dacă hibridarea se realizează între exemplare învecinate care aparțin unor specii diferite, au fost realizate corelograme bazate numai pe comparații între exemplare din două specii diferite (comparațiile între exemplare din aceeași specie au fost excluse).

## Material și metode

### Localizarea cercetărilor și eșantionajul

Cercetările s-au efectuat în pădurea Bejan situată lângă Deva (45°51' N, 22°53' E), declarată Rezervație Științifică în anul 1936 datorită bogăției de specii de cvercinee și hibrizi între acestea (Fig. 2-18). Locația a fost aleasă deoarece aici se întâlnesc mai multe specii autohtone de cvercinee: *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. frainetto* (toate din subgenul *Lepidobalanus*) și *Q. cerris*. Alte specii de foioase care se găsesc în proporții reduse în pădurea Bejan sunt: *Tilia cordata*, *Acer campestre*, *A. platanoides*, *A. tataricum*, *Carpinus betulus*, *Fraxinus excelsior*, *Pyrus pyraeaster*, *Sorbus torminalis*, *S. domestica* și *Malus sylvestris*. Pe o suprafață de aproximativ 8,6 ha din zona centrală a pădurii Bejan au fost identificate 483 de exemplare de stejar, toate aparținând subgenului *Lepidobalanus*. Exemplarele au fost numerotate și cartate cu un aparat Field-Map. Exemplarele de *Q. cerris*, foarte răspândite în pădurea Bejan, nu au fost analizate genetic întrucât nu se hibridează cu speciile din subgenul *Lepidobalanus*. La toate exemplarele s-a măsurat diametrul la înălțimea pieptului (DBH).



**Fig. 2-18** Distribuția spațială a arborilor eșantionați în pădurea Bejan (CURTU *et al.* 2015). Fiecare exemplar este reprezentat de un cerc a cărui mărime este proporțională cu DBH. Gradul de apartenență la clusterul genetic corespunzător unei specii este dat de ponderea unei culori, după cum urmează: *Q. robur* (galben), *Q. pubescens* (verde), *Q. petraea* (albastru) și *Q. frainetto* (roșu).

O primă clasificare pe specii s-a efectuat în teren în special pe baza caracterelor frunzelor (STĂNESCU *et al.* 1997). O analiză detaliată a morfologiei frunzei efectuată pe o parte din eșantion (269 exemplare) a arătat existența a numai 16 (circa 6%) exemplare cu morfologie intermediară între speciile de cvercinee (CURTU *et al.* 2007a). În acest studiu, exemplarele cu morfologie intermediară au fost încadrate la specia cea mai apropiată din punct de vedere fenotipic. Astfel, în eșantion au fost identificate: 190 de exemplare de *Q. petraea*, 118 de *Q. robur*, 113 de *Q. pubescens* și 62 de *Q. frainetto* (Tab. 2-16).

**Tabelul 2-16** Mărimea eșantionului (N) pentru fiecare specie, desimea și indicii genetici de bază estimați pentru 10 SSRs în pădurea Bejan

Specia	Populația	Latitudine N	Longi- tudine E	N	Nr. de arbori / ha	N <sub>a</sub>	H <sub>e</sub>	F
<i>Q. robur</i>				118	13.72	19.5	0.787	0.047
<i>Q. pubescens</i>	Bejan	45°51'	22°53'	113	13.14	18.2	0.854	-0.005
<i>Q. petraea</i>				190	22.09	19.8	0.786	0.037
<i>Q. frainetto</i>				62	7.21	12.2	0.714	-0.029
Total				483				

N<sub>a</sub> – numărul mediu de alele per locus, H<sub>e</sub> – diversitatea genică, F – indicele de fixare.

### Genotiparea

ADN-ul a fost extras din muguri cu kiturile Qiagen DNeasy96 și Plant Mini în conformitate cu instrucțiunile producătorului, cu excepția folosirii azotului lichid pentru mărunțirea materialului biologic. Pentru un număr redus de probe eșantionate în pădurea Bejan s-a folosit metoda *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB). În vederea evidențierii diferențelor genetice s-au utilizat 10 SSRs: QrZAG112, QrZAG96, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG7, QrZAG87 (KAMPFER *et al.* 1998), QpZAG110, QpZAG9 (STEINKELLNER *et al.* 1997); PIE215 și PIE223 (DURAND *et al.* 2010). Acest set de markeri genetici a fost selectat pornind de la cele mai recente studii privind diversitatea genetică a cvercineelor europene (GUICHOUX *et al.* 2011; LEPAIS *et al.* 2009; NEOPHYTOU *et al.* 2011). Au fost testați și alți markeri (e.g. QrZAG39 și QrZAG5b) dar acești au fost eliminați din analiză datorită prezenței unor alele nule sau pentru că fenotipul lor nu putea

fi determinat cu certitudine. Reacțiile de polimerizare în lanț (PCR) au fost efectuate cu un aparat *Corbett thermal cycler*. Primerul înainte a fost marcat cu o culoare fluorescentă de tip Beckman: D2, D3 sau D4. Perechile de primeri au fost combinate în trei reacții de tip *multiplexing*. Primul set a constat din patru markeri, felul colorantului și concentrația primerilor ( $\mu\text{M}$ ) fiind date în paranteză: QrZAG112 (D4, 0.10), QrZAG96 (D3, 0.30), QrZAG11 (D3, 0.20) și QpZAG110 (D4, 0.40). Al doilea set de markeri a fost format din: QrZAG20 (D3, 0.28), QrZAG7 (D4, 0.35) și QrZAG87 (D2, 0.40). Ultimul set a cuprins: PIE215 (D4, 0.50), PIE223 (D3, 0.30) și QpZAG9 (D2, 0.35). Reacțiile s-au realizat într-un volum de 10  $\mu\text{l}$  care a inclus circa 10 ng de ADN template, 1x *Promega colourless PCR buffer*, 2 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 0.45 mM din fiecare dNTP (Fermentas), 0.2 U *Taq* DNA polymerase (*Promega*) și perechile de primeri în concentrațiile descrise mai sus. Programul PCR a fost următorul: 3 min denaturare la 94 °C urmate de 31 de cicluri de 50 s denaturare la 94 °C, 40 s *annealing* la 52 °C, 1 min 20 s elongarea la 70 °C și un pas final de extensie la 70 °C cu o durată de 12 min. Produsele rezultate în urma reacției au fost rulate pe *GenomeLab GeXP Genetic Analyser*. S-a utilizat metoda Frag-3 și size standard 400. Semnalele au fost în final prelucrate cu *Fragment Analysis Software*, folosind parametrii implicați și PA ver1 *dye correction*.

Într-o primă etapă, cele 10 SSRs au fost utilizate pe un grup de opt populații tipice (externe), eșantionate în mai multe regiuni ecologice din România, câte două pentru fiecare din cele patru specii de stejar prezente în pădurea Bejan (Tab. 2-17). Datele genotipice au fost verificate cu programul MICRO-CHECKER 2.2.0.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.* 2004). A fost semnalată prezența alelelor nule cu frecvențe reduse (sub 8%) la trei loci (QrZAG11, PIE223 și QrZAG96) în una sau maxim două populații externe. Simulări recente au indicat că alelele nule cu frecvențe reduse, cum este cazul celor trei markeri menționați anterior, nu afectează rezultatul global al testului de apartenență genetică (CARLSSON 2008) sau SGS (PIOTTI *et al.* 2013). În final, același set de 10 SSRs a fost utilizat pentru genotiparea tuturor exemplarelor eșantionate în pădurea Bejan. Parametrii genetici de bază au fost calculați cu GenAIEx software version 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006).

**Tabelul 2-17** Lista populațiilor externe analizate pentru fiecare specie de cvercinee

Specia	Populația	Latitudine	Longitudine	N	N <sub>a</sub>	H <sub>e</sub>	F
		N	E				
<i>Q. robur</i>	Podul Iloaiei	47°03'	27°13'	41	15.2	0.807	0.014
	Prejmer	45°44'	25°44'	48	12.7	0.773	0.011
<i>Q. pubescens</i>	Macin	45°13'	28°14'	43	13.4	0.841	0.027
	Sacalaia	46°57'	23°56'	42	13.1	0.842	0.024
<i>Q. petraea</i>	Cristian	45°38'	25°33'	48	15.0	0.789	0.003
	Ronisoara	47°51'	24°07'	36	13.6	0.784	-0.009
<i>Q. frainetto</i>	Slatina	44°43'	24°28'	38	10.3	0.693	0.034
	Lugoj	45°43'	21°59'	50	10.2	0.672	0.008
Total				346			

N – mărimea eșantionului, N<sub>a</sub> – numărul mediu de alele per locus, H<sub>e</sub> – diversitatea genică, F – indicele de fixare.

#### *Determinarea speciilor pure și a hibrizilor*

Metoda Bayesiană de grupare disponibilă în STRUCTURE software ver. 2.3.3 (PRITCHARD *et al.* 2000) a fost utilizată pentru atribuirea indivizilor la unul din clusterelor genetice omogene identificate de program. Simulările au constat din 100.000 de iterații urmate de o perioadă de *burn-in* de 50.000 de pași pentru valori ale lui *K* (numărul de clusterelor) de la unu la zece, cu zece repetiții pentru fiecare valoare a lui *K*. Analiza s-a efectuat folosind modelul *admixture* și frecvențele corelate ale alelelor. Nu s-au luat în considerare niciun fel de informații privind locația geografică a populațiilor sau apartenența la o anumită specie. Programul identifică pentru fiecare individ procentul din genom ce aparține fiecărui cluster.

Programul a fost rulat în primă fază pentru setul de opt populații externe pure (346 indivizi). Numărul de clusterelor genetice a fost estimat prin cele două metode standard cu ajutorul STRUCTURE HARVESTER (EARL 2011). În a doua fază s-a rulat programul, utilizând aceeași parametri, pentru grupul format din exemplarele eșantionate atât în pădurea Bejan, cât și în populațiile externe (829 indivizi). În cazul celui mai probabil număr de clusterelor (*K*=4) s-au calculat mediile coeficientului de apartenență (*q*) pentru 10 rulări. Clasificarea indivizilor în categoria speciilor pure sau a hibrizilor a urmat procedura descrisă în Franța (LEPAIS *et al.* 2009).

Un exemplar a fost considerat ca aparținând unei specii pure (engl. *purebred*) atunci când valoarea cea mai mare a lui  $q$  a fost peste 0.90 și ca hibrid când valoarea lui  $q$  a fost sub această limită. Dacă valoarea lui  $q$  a fost mai mică de 0.90 pentru un cluster genetic, dar mai mică de 0.10 pentru fiecare din cele trei clusteruri rămase, exemplarul a fost clasificat tot în categoria speciilor pure. Exemplarele la care valoarea  $q$  a variat între 0.10 și 0.90 pentru trei sau chiar patru clusteruri au fost considerate ca fiind hibride între clusterurile pentru care au prezentat cele mai mari valori ale lui  $q$ , indiferent de valoarea lui  $q$  pentru cel de-al treilea sau al patrulea cluster.

#### *Analiza structurilor genético-spațiale în pădurea Bejan*

Pentru evidențierea legăturii dintre distribuția spațială a exemplarelor din pădurea Bejan și gradul lor de înrudire a fost calculat un coeficient de corelație  $r$  (SMOUSE și PEAKALL 1999) cu programul GenAlEx 6.5 (PEAKALL și SMOUSE 2006). Acest coeficient a fost calculat atât pentru întregul eșantion (care cuprinde stejarii din toate speciile), cât și pentru fiecare specie în parte. Mărimea intervalelor de distanță a fost stabilită la 25 m, ținându-se cont de recomandarea ca numărul minim de perechi să fie de 100 pentru fiecare clasă (HARDY și VEKEMANS 2002) și de faptul că numărul de indivizi eșantionați diferă între specii. Distanța spațială maximă între indivizii unei specii a variat între 315.8 m pentru *Q. robur* și 500.2 m pentru *Q. pubescens*. Analizele s-au efectuat pentru 10 clase de 25 m, între 0 și 250 m. Limita inferioară și superioară a intervalelor de încredere s-a calculat prin permutarea locației geografice a indivizilor (*random shuffling* - 1,000 times). Intervalele de încredere (95%) pentru valoarea medie a coeficientului de corelație  $r$  s-au estimat prin procedeul *bootstrapping pairwise comparisons* în fiecare interval de distanță (1.000 repetări). Testul neparametric de eterogenitate a lui SMOUSE *et al.* (2008) a fost folosit pentru compararea autocorelogramelor între specii, cu și fără hibridi. Numărul de reeșantionări *bootstrap* a fost 999.

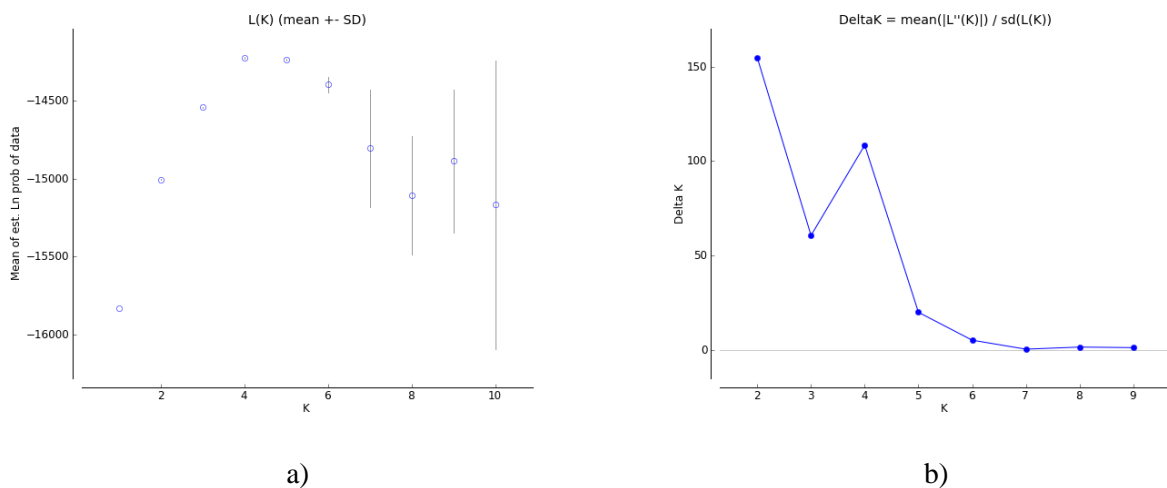
Corelogramele pentru perechi interspecifice au fost calculate utilizând *Nason's kinship coefficient*,  $F_{ij}$  (LOISELLE *et al.* 1995), un parametru foarte folosit pentru estimarea gradului de înrudire în cazul markerilor codominanți (HARDY și VEKEMANS 2002). S-a folosit de asemenea parametrul  $Sp = -b_F/(1-F_1)$ , în care  $F_1$  este coeficientul de înrudire mediu între toate perechile de indivizi din prima clasă de distanță iar  $b_F$  (b-log) este panta regresiei înrudirii față de logaritmul distanței (VEKEMANS și HARDY 2004). Testarea semnificației pantei analizei regresiei a fost realizată după 10.000 de permutări. Intervalele de încredere pentru parametrul  $Sp$  au fost calculate după VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007. Toate calculele au fost făcute cu SPAGeDi

1.2 software (HARDY și VEKEMANS 2002). Coeficienții de corelație s-au calculat cu STATISTICA v.8 software (STATSOFT 2008).

## Rezultate

### *Clasificarea speciilor pure și a hibrizilor*

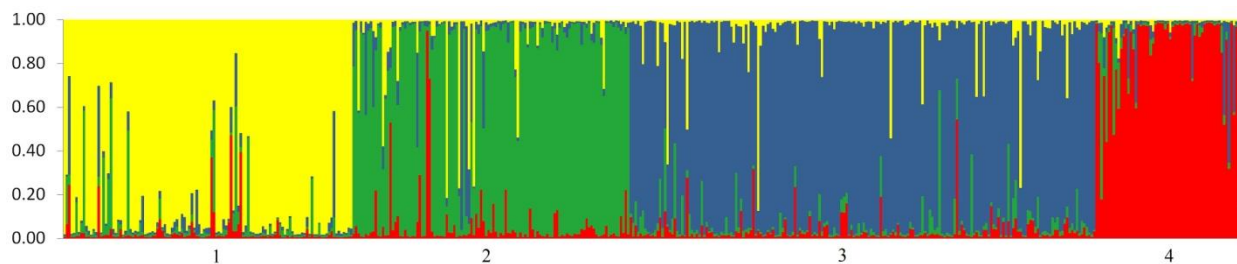
Numărul de clustere genetice pentru eșantionul de opt populații tipice, câte două pentru fiecare specie, care corespunde valorii maxime a probabilității posterioare, a fost de patru (Fig. 2-19a). A doua metodă, bazată pe valoarea lui  $\Delta K$ , a indicat ca cel mai probabil  $K = 2$ , și un suport statistic mai redus pentru  $K = 4$  (Fig. 2-19b).



**Fig. 2-19** Numărul de clustere genetice ( $K$ ) rezultat din analiza Bayesiană implementată în programul STRUCTURE: a) media și abaterea standard *log probability of data* pentru 10 rulări; b) rata de schimbare a *log probability of data*  $L(K)$  între valori succesive ale lui  $K$ , măsurată ca  $\Delta K$ .

Modelul folosit pentru setul de populații tipice a fost apoi extins la toți arborii eșantionați, inclusiv cei 483 de arbori din pădurea Bejan. Pentru  $K = 4$  a fost observată o corespondență foarte bună între clusterelor genetice identificate în programul STRUCTURE și clasificarea morfologică a celor patru specii (Fig. 2-20).





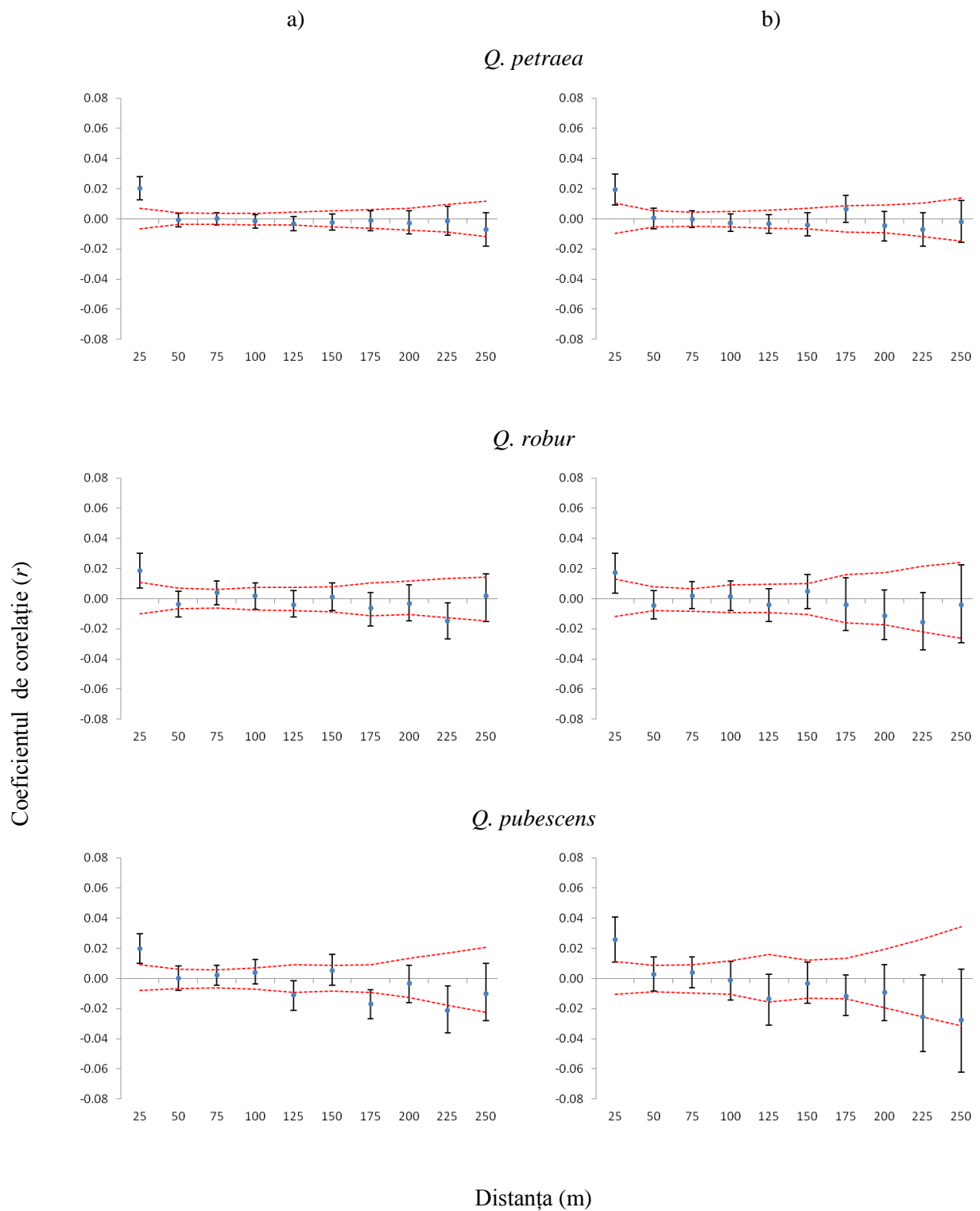
**Fig. 2-20** Structura genetică cu patru clustere ( $K = 4$ ) pentru pădurea Bejan, obținută pe baza a 10 SSRs. Fiecare individ este reprezentat de o linie verticală subțire care este partiționată în segmente de  $K$  culori. Mărimea unui segment de o anumită culoare este proporțională cu gradul de apartenență al individului la clusterul aferent culorii respective. Populațiile sunt separate printr-o linie subțire de culoare neagră. 1 – arbori de *Q. robur*, 2 - *Q. pubescens*, 3 - *Q. petraea* și 4 - *Q. frainetto*.

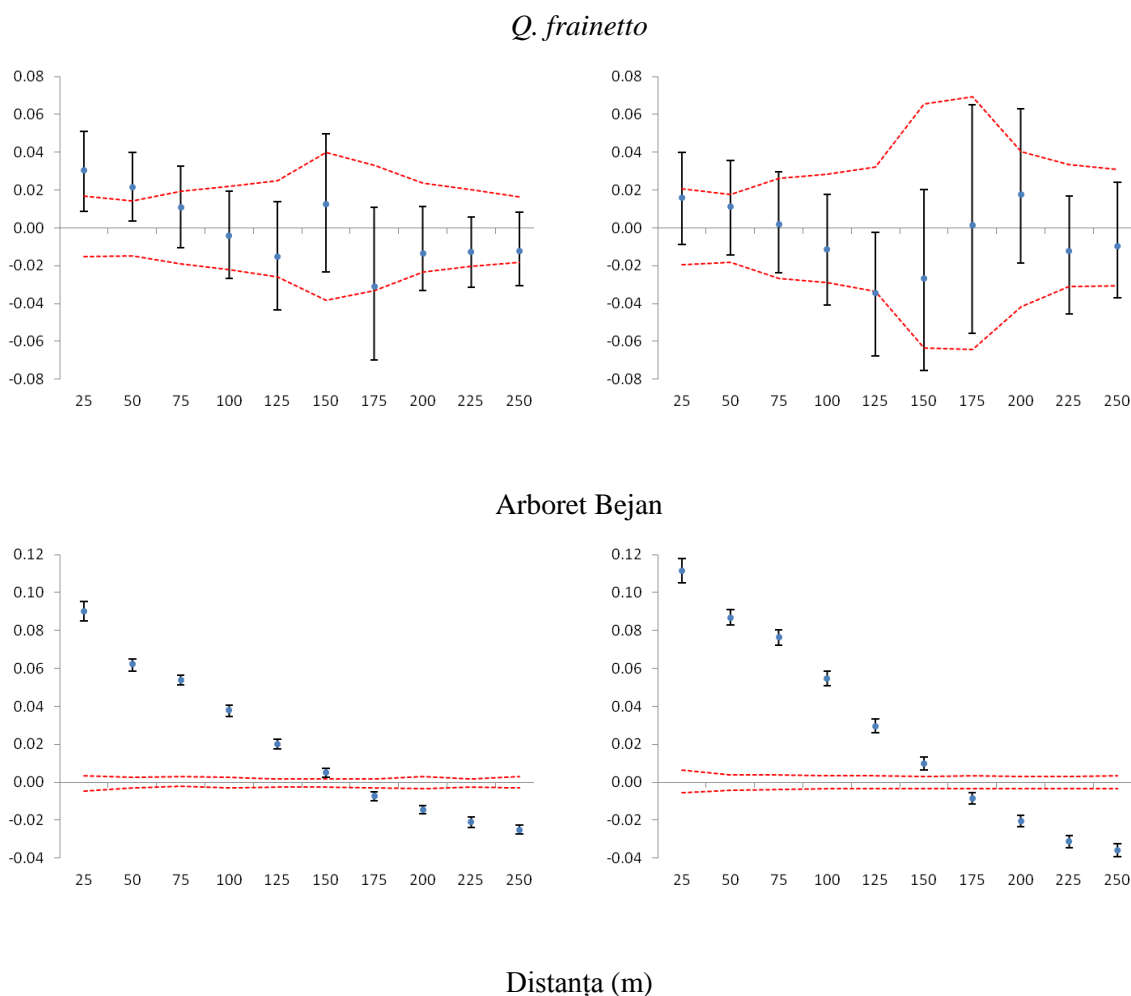
Ponderea hibrizilor identificați în pădurea Bejan a fost ridicată (23.6%) și a variat de la o specie la alta. Astfel, cel mai mare procent de hibrizi a fost observat printre indivizii încadrați morfologic la *Q. pubescens* (30.1%) și respectiv *Q. frainetto* (25.6%). Specia cea mai pură din punct de vedere genetic a fost *Q. robur*, la care numai 16.1% dintre indivizi au o origine prezumtiv hibridă (Fig. 2-20). Cea mai mare rată de hibridare a fost observată între *Q. pubescens* și *Q. frainetto* (12.0%), în timp ce cea mai redusă a fost între *Q. robur* și *Q. frainetto* (1.7%).

#### *Structuri genetica-spațiale intraspecificice*

Valori ale coeficientului de corelație  $r$  situate în afara intervalelor de încredere de 95% (evidențiate prin linie punctată roșie) au fost observate pentru toate cele patru specii prezente în pădurea Bejan (Fig. 2-21).

În prima clasă de distanțe (0-25 m), exemplarele de stejar din pădurea Bejan sunt mult mai apropiate din punct de vedere genetic (înrudite) decât s-ar aștepta într-o distribuție spațială randomizată, indiferent de specie. Corelația între matricea distanțelor spațiale și matricea distanțelor genetice a fost directă și semnificativă pentru primele două clase de distanțe (până la 50 m) numai în cazul speciei *Q. frainetto*, specia cea mai puțin răspândită în pădurea Bejan. Distribuțiile ce caracterizează SGS prezintă cea mai mare valoare a lui  $r$  pentru prima clasă de distanțe, după care descresc mai mult sau mai puțin constant pentru restul claselor de distanțe (Fig. 2-21a). Rezultatele testului de eterogenitate, prin care s-au comparat SGS între perechi de specii, pentru fiecare clasă de distanțe și per total, sunt nesemnificative ( $P < 0.05$ ).





**Fig. 2-21** Autocorelograme pentru fiecare specie și întregul arboret din suprafața de probă instalată în pădurea Bejan, cu luarea în considerare: (a) a tuturor arborilor (b) numai a speciilor pure (fără hibrizi). Cu roșu sunt reprezentate intervalele de încredere pentru probabilitatea de 95%. Liniile negre din jurul valorii coeficientului  $r$  reprezintă intervalele de încredere pentru 95%, generate prin *bootstrapping*.

Distribuțiile prezintă aceeași formă dacă sunt luate în considerare numai speciile pure (Fig. 2-21b). Totuși, SGS nu a mai fost semnificativă ( $P < 0.05$ ) pentru *Q. frainetto*, ceea ce se poate explica prin mărimea mică a eșantionului o dată ce hibrizii au fost eliminați din analiză. Testul statistic pentru eterogenitate între perechi de specii a indicat diferențe nesemnificative ( $P < 0.05$ ), la fel ca în cazul anterior.

Valoarea parametrului  $Sp$  a fost mai mare ( $P < 0.05$ ) pentru *Q. frainetto* decât pentru *Q. robur* și *Q. petraea*, speciile cu cele mai mici valori (Tab. 2-18). Valorile parametrului  $b_F$  diferă în mod semnificativ față de zero ( $P < 0.05$ ) la toate cele patru specii de cvercinee. După eliminarea exemplarelor hibride din analiză, valorile parametrului  $Sp$  nu au mai fost semnificativ diferite ( $P > 0.05$ ) între specii. Cele mai răspândite specii din suprafața de probă din pădurea Bejan, *Q.*

*petraea* și *Q. robur*, au avut valori similare pentru parametrul  $Sp$ , cu sau fără includerea exemplarelor hibride. Îndepărtarea exemplarelor hibride a condus la o creștere a valorii parametrului  $Sp$  numai la *Q. pubescens*. Trebuie menționat că această specie a prezentat cea mai mare proporție de hibrizi (30.01%) dintre cele patru specii prezente în pădurea Bejan.

Densitatea speciei a fost invers proporțională cu parametrul  $Sp$ , deși corelațiile au fost ne semnificative în ambele cazuri: cu includerea hibrizilor ( $r = -0.79$ ,  $P=0.20$ ) și respectiv fără luarea în considerare a hibrizilor ( $r = -0.87$ ,  $P=0.13$ ).

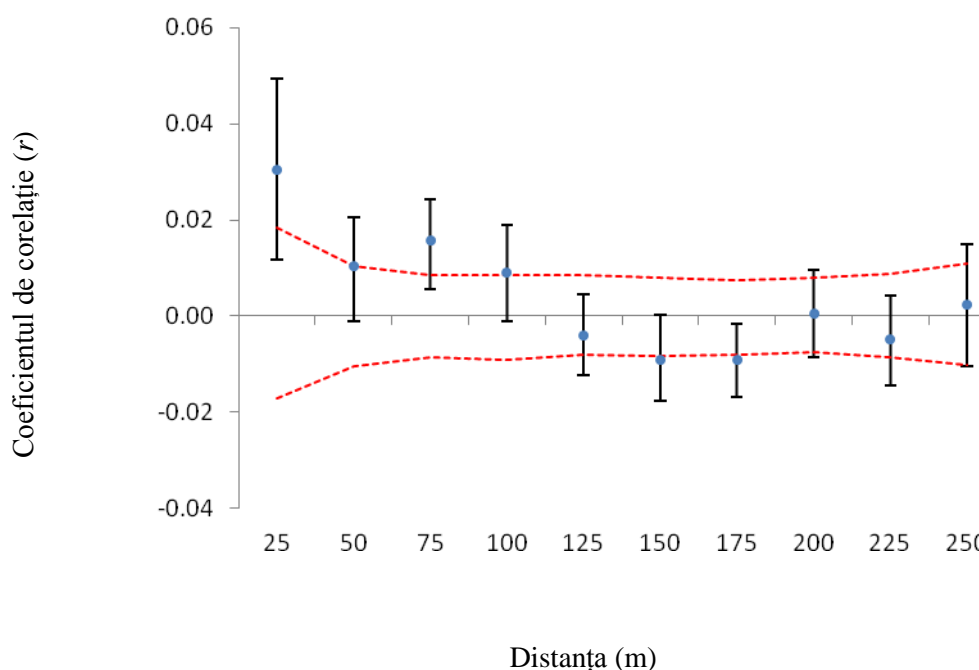
**Tabelul 2-18** Parametrii structurii genético-spațiale pentru fiecare specie, întregul arboret și hibrizi

Specia	$F_1$	$b_F$ ( $b\text{-log}$ ) ( $\pm$ SE)	$Sp$ (95% CI)
<i>Sensu lato</i> (inclusiv hibrizii)			
<i>Q. petraea</i>	0.0114***	-0.0032 $\pm$ 0.0006***	0.0033 (0.0019-0.0045)
<i>Q. robur</i>	0.0103**	-0.0035 $\pm$ 0.0014***	0.0035 (0.0007-0.0063)
<i>Q. pubescens</i>	0.0099***	-0.0041 $\pm$ 0.0014***	0.0042 (0.0014-0.0069)
<i>Q. frainetto</i>	0.0146**	-0.0096 $\pm$ 0.0017***	0.0098 (0.0064-0.0131)
Total arboret – 483 indivizi	0.0511***	-0.0286 $\pm$ 0.0083***	0.0301 (0.0129-0.0471)
<i>Sensu stricto</i> (specii pure)			
<i>Q. petraea</i>	0.0110***	-0.0032 $\pm$ 0.0009***	0.0033 (0.0015-0.0052)
<i>Q. robur</i>	0.0097**	-0.0034 $\pm$ 0.0014**	0.0034 (0.0006-0.0063)
<i>Q. pubescens</i>	0.0123***	-0.0051 $\pm$ 0.0015***	0.0051 (0.0020-0.0083)
<i>Q. frainetto</i>	0.0074	-0.0053 $\pm$ 0.0017*	0.0053 (0.0020-0.0087)
Total arboret – 369 indivizi	0.0637***	-0.0375 $\pm$ 0.0102***	0.0400 (0.0182-0.0613)
Toți hibrizii			
Hibrizi – 114 indivizi	0.0172***	-0.0069 $\pm$ 0.0029***	0.0069 (0.0011-0.0127)

$F_1$  este coeficientul de înrudire mediu între indivizii din prima clasă de distanțe (0-25 m);  $b_F$  ( $b\text{-log}$ ) - panta regresiei coeficientului de înrudire  $F_{ij}$  calculată pentru toate perechile de indivizi;  $Sp$  - intensitatea structurii genético-spațiale; SE - eroarea standard; 95% CI - intervalele de încredere pentru 95%. Nivelul de semnificație: \* $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$ .

### Structura genético-spațială pentru întreg arboretul

Intensitatea SGS a fost mult mai mare pentru întregul arboret decât pentru fiecare specie în parte (Fig. 2-21). O dată cu excluderea exemplarelor hibride, SGS a devenit și mai pronunțată (Fig. 2-21b). Testul de eterogenitate a SGS pentru întregul arboret, cu și fără hibridi, a indicat diferențe semnificative ( $P < 0.01$ ). O creștere semnificativă a intensității SGS după eliminarea hibridilor este indicată și de parametrul  $S_p$  ( $S_p = 0.0301$  pentru 483 de arbori, specii pure și hibridi, comparativ cu  $S_p = 0.0400$ , fără hibridi) (Tab. 2-18). O corelație semnificativă între gradul de înrudire și distanța spațială a fost observată pentru prima clasă de distanțe și în cazul exemplarelor hibride (Fig. 2-22).

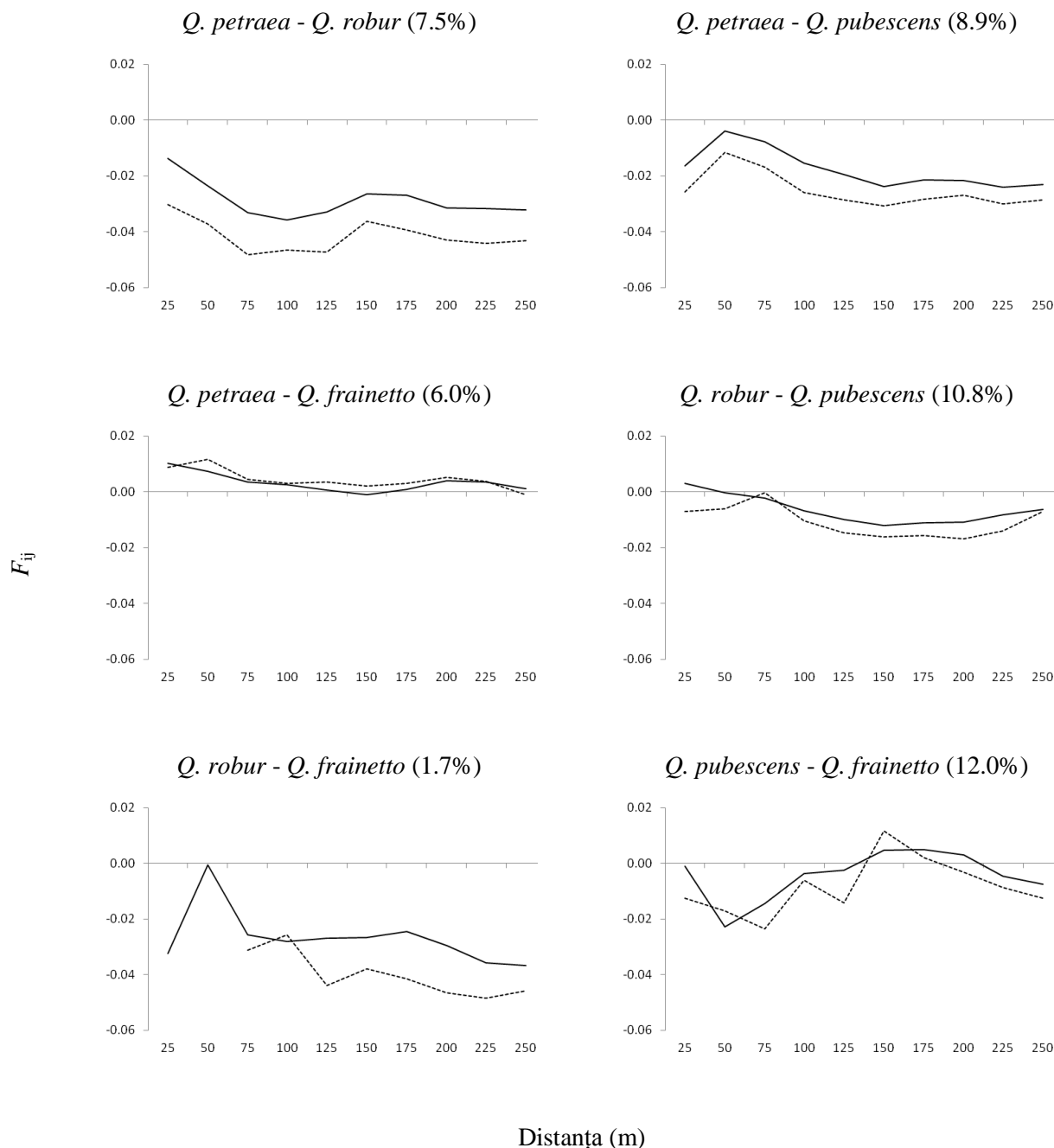


**Fig. 2-22** Autocorelogramă pentru exemplarele hibride din suprafața de probă instalată în pădurea Bejan. Cu roșu sunt reprezentate intervalele de încredere pentru probabilitatea de 95%. Liniile negre din jurul valorii coeficientului  $r$  reprezintă intervalele de încredere pentru 95%, generate prin *bootstrapping*.

### Structura genético-spațială interspecifică

Prin restrângerea analizei SGS la perechi de indivizi din specii diferite, valoarea coeficientului de înrudire ( $F_{ij}$ ) a devenit negativă în majoritatea cazurilor (Fig. 2-23). Valori pozitive ale coeficientului de înrudire ( $F_{ij}$ ) în clasele de distanțe mici au fost observate pentru două perechi,

*Q. petraea* - *Q. frainetto* și *Q. robur* - *Q. pubescens* (Fig. 2-23), în timp ce valoarea lui  $b_F$ , care nu depinde de intervalul de distanțe nu diferă semnificativ față de zero:  $-0.0022^{NS}$  și  $-0.0029^{NS}$ . O valoare foarte mică pentru  $b_F$  a fost obținută pentru asocierea *Q. pubescens*-*Q. frainetto* ( $-0.0003^{NS}$ ), la care perechile formate dintr-un exemplar de *Q. pubescens* și unul de *Q. frainetto* sunt mai apropiate genetic în clasele de distanțe mari (de la 150 la 200 m) decât în cele mai mici (Fig. 2-23).



**Fig. 2-23** Autocorelograme interspecifice, cu luarea în considerare a tuturor arborilor (linie continuă) sau numai a speciilor pure (linie punctată). Pe axa x sunt clase de distanțe de 25 m. Pe axa y este Nason kinship coefficient ( $F_{ij}$ ) conform LOISELLE *et al.* (1995). Rata de hibridare este dată în paranteză.

Valoarea coeficientului de corelație dintre rata de hibridare între două specii, precizată în Fig. 2-23, și parametrul  $Sp$  a fost negativă și semnificativă din punct de vedere statistic ( $r=-0.85$ ,  $P<0.05$ ). Valori mai scăzute ale coeficientului de înrudire au fost obținute în clasele de distanțe mici în trei din cele cinci cazuri, atunci când exemplarele hibride nu au mai fost incluse în analiză (Fig. 2-23). Comparațiile între exemplare din clase de distanțe mici pentru perechea *Q. frainetto-Q. robur* nu s-au mai luat în considerare datorită numărului mic de exemplare. Valoarea lui  $b_F$  a fost întotdeauna mai mică fără hibridi.

## Discuții

### *Structura genotipo-spațială intraspecifică*

Pentru toate cele patru specii de cvercinee din pădurea Bejan a fost observată o structură genotipo-spațială (SGS) până la o distanță de 25-50 m. Intensitatea SGS este redusă, dar semnificativă din punct de vedere statistic. Existența SGS la scară mică pentru fiecare specie poate fi explicată printr-o dispersie limitată a semințelor și polenului (SORK *et al.* 2002; STREIFF *et al.* 1998; VEKEMANS și HARDY 2004). Încrucișările au loc, de regulă, între arborii învecinați care sunt astfel mult mai bine reprezentați în generația următoare (HAMPE *et al.* 2010). Intensitatea slabă a SGS poate fi pusă în legătură cu vârsta mare a exemplarelor de stejar din pădurea Bejan (peste 120 de ani). La această vârstă, structurile de familie sunt slăbite datorită fenomenului de eliminare naturală, așa cum este cazul într-un arboret de *Q. petraea* în care nu s-a intervenit cu lucrări silvotehnice (JENSEN *et al.* 2003) sau în arborete de *Fagus sylvatica* (DOUNAVI *et al.* 2010).

Valori similare pentru intensitatea SGS (parametrul  $Sp$ ) au fost raportate în arborete formate din exemplare adulte ce aparțin la una sau două specii de cvercinee:  $Sp = 0.005$  într-un arboret de *Q. robur* din Franța (HAMPE *et al.* 2010);  $Sp = 0.0029$  pentru *Q. robur* și  $0.0082$  pentru *Q. petraea* (STREIFF *et al.* 1998, calculat în Vekemans and Hardy 2004);  $Sp = 0.0033$  și  $0.0132$  pentru *Q. petraea*, în funcție de arboretul analizat din Spania (VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007). La Bejan, cea mai mare valoare a parametrului  $Sp$  a fost obținută pentru cea mai puțin răspândită specie - *Q. frainetto*. Această valoare diferă semnificativ față de cea calculată pentru cele mai răspândite specii, *Q. petraea* și *Q. robur*. Diferența poate fi explicată prin distanțe mai reduse de diseminare pentru *Q. frainetto*. O analiză de paternitate efectuată la Bejan a indicat că cel mai redus flux de polen este pentru *Q. frainetto*: numai 18–24% dintre grăunciorii de polen care au fertilizat ovule de *Q. frainetto* și-au avut originea în afara suprafeței de cercetare, în timp ce

arborii mamă de *Q. petraea* au primit în medie cel puțin 59% din polen din afara suprafeței de cercetare (CURTU *et al.* 2009a). Intensitatea SGS a fost similară pentru *Q. robur* și *Q. petraea* în pădurea Bejan, cu toate că este larg acceptată opinia potrivit căreia ghindele de *Q. robur* sunt transportate pe distanțe mai mari, fiind preferate de păsări (PETIT *et al.* 2004). Într-adevăr, SGS la scară mică au fost mai intense la *Q. petraea* decât la *Q. robur* într-o pădure în care cele două specii au proporții similare (STREIFF *et al.* 1998). De aceea, alți factori trebuie să explice valorile aproape identice pentru *Q. robur* și *Q. petraea* în pădurea Bejan, chiar dacă coeficientul de înrudire a fost mai mare în prima clasă de distanțe ( $F_1$ ) la *Q. petraea* decât la *Q. robur* (Tab. 2-18). Cercetări anterioare sugerează că intensitatea SGS, descrisă de parametrul  $Sp$ , este corelată cu numărul de exemplare adulte pe unitatea de suprafață (densitatea populației). Astfel, parametrul  $Sp$  are valori mai mari în populațiile de densitate mai scăzută decât în populațiile de densitate mai ridicată (VEKEMANS și HARDY 2004). Totuși, în cazul speciilor de cvercinee de la Bejan nu a fost găsită o corelație între densitatea speciei și intensitatea SGS. Aceeași intensitate a SGS pentru *Q. robur* și *Q. petraea*, deși prima specie prezintă o densitate mai redusă la Bejan și deci ar fi trebuit să aibă o valoare  $Sp$  mai ridicată, poate fi explicată de distanțele mai mari de dispersie a polenului și semințelor în cazul speciei *Q. robur* (LAGACHE *et al.* 2013; PETIT *et al.* 2004), care ar contribui la o diminuare a intensității SGS față de *Q. petraea*.

#### *Structura genetico-spațială la nivel de arboret*

La nivelul întregii suprafețe de cercetare (8,6 ha), indiferent de specie, s-a observat o SGS foarte puternică și semnificativă din punct de vedere statistic. Valorile parametrului  $Sp$  au fost de 3-9 ori mai ridicate la nivel de arboret decât la fiecare din cele patru specii separat. Distribuția spațială a speciilor în suprafața de cercetare a influențat considerabil SGS (Fig. 2-18). Astfel, fiecare din cele patru specii este predominantă în zona de arboret în care condițiile staționale corespund cel mai bine exigențelor ei ecologice. Cei mai mulți arbori de *Q. robur* se găsesc în zona cu soluri profunde situată de-a lungul unei mici văi, în partea de est a suprafeței de cercetare (Fig. 2-18). *Q. pubescens* se găsește în partea superioară a unui versant cu expoziție sudică, pe un sol superficial. Specia *Q. petraea* este localizată pe un sol bine drenat și aerat, în timp ce *Q. frainetto* se găsește în zona cu un sol mai compact, bogat în argilă (STANCIU 1997).

#### *Influența fenomenului de hibridare naturală asupra structurii genetico-spațiale*

Fenomenul de hibridare naturală a fost descris ca fiind un alt factor care influențează SGS în arborete de stejar (VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007). În cazul pădurii Bejan, înlăturarea



exemplarelor hibride din analiza spațială a distribuției genotipurilor a avut un efect minor la *Q. robur* și *Q. petraea*. Cele două specii au prezentat cel mai mic număr de hibridi dintre speciile de stejar din suprafața de cercetare. Valorile aproape identice ale parametrului *Sp*, cu sau fără includerea hibridilor, sugerează că hibridii au contribuit în mică măsură la formarea SGS în cazul celor două specii. Mai mult, hibridii la formarea cărora au contribuit speciile *Q. robur* și *Q. petraea* nu s-au grupat în arboret împreună cu exemplare pure genetice ce aparțin fiecăruia dintre cele două specii. O situație complet diferită se întâlnește la *Q. pubescens*, specia cu cel mai mare număr de hibridi detectați printre exemplarele clasificate pe criterii morfologice ca aparținând speciei respective. Fenomenul de hibridare naturală a afectat SGS în sensul diminuării intensității acesteia.

La nivel interspecific, rezultatele indică o corelație inversă între rata de hibridare specii și intensitatea SGS, cuantificată prin parametrul *Sp*. Astfel, cu cât este mai intens fluxul genic între două specii, cu atât este mai slabă SGS interspecifică. Rata de hibridare este însă dependentă de particularitățile speciei și de condițiile staționale (LAGACHE *et al.* 2013; SEEHAUSEN *et al.* 2008). Valori pozitive ale coeficientului de înrudire în prima clasă de distanțe au fost observate pentru perechile de specii al căror areal se interpătrunde în pădurea Bejan: *Q. petraea* - *Q. frainetto* și *Q. robur* - *Q. pubescens*. Prezența unei componente intra- și interspecifice a SGS a fost determinată într-un arboret format din *Q. petraea* și *Q. pyrenaica* din Spania. Componenta interspecifică a lipsit într-un alt arboret de amestec, în care și fenomenul de hibridare naturală între *Q. petraea* și *Q. pyrenaica* a avut o incidență mult mai scăzută decât în primul arboret (VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007). La Bejan, excluderea exemplarelor hibride din analizele spațiale a condus la o scădere a valorii coeficientului de înrudire în prima clasă de distanțe (0–25 m) în trei dintre cele cinci cazuri (comparații între perechi de specii), fapt care sugerează că hibridarea se realizează între arbori învecinați din specii diferite. Acest rezultat confirmă observațiile efectuate într-un arboret format din *Q. petraea* și *Q. pyrenaica* în Spania (VALBUENA-CARABANA *et al.* 2007).

#### *Implicații pentru conservare și management*

Existența SGS la fiecare dintre cele patru specii de cvercinee susține ipoteza originii naturale a amestecului unic de specii și hibridi din pădurea Bejan. Prezența SGS într-un arboret de *Q. petraea* din Danemarca a fost considerată o dovadă a caracterului natural al porțiunii de pădure în care s-a realizat eșantionajul (JENSEN *et al.* 2003). Cele mai puternice SGS au fost observate în păduri virgine de *Pinus strobus* din Canada (MARQUARDT *et al.* 2007). Totuși, PIOTTI *et al.* (2013) nu a găsit o SGS într-un arboret de fag de 250-300 ani situat într-o pădure virgină din

Austria. În același studiu, o SGS de intensitate slabă, dar semnificativă din punct de vedere statistic, a fost observată într-o plantație de fag, sugerând că numai prezența SGS nu înseamnă neapărat că arboretul provine din regenerare naturală. Originea naturală a pădurii Bejan este susținută și de identificarea unor haplotipuri de ADN cloroplastic ce aparțin liniei filogenetice B și care sunt specifice sudului Transilvaniei (CURTU *et al.* 2007b; PETIT *et al.* 2002a).

Restricțiile impuse după declararea pădurii Bejan ca Rezervație Științifică în anul 1936 au contribuit cu siguranță la prezervarea SGS pentru speciile de cvercinee. Chiar dacă s-au mai realizat intervenții silvotehnice de intensitate redusă (de ex. tăieri de igienă) în ultimele decenii (STANCIU 1997), acestea nu au reușit să elimine complet SGS. Recent, s-a arătat că intervențiile silvotehnice mai intensive, spre exemplu tratamentele cu regenerare sub masiv, au avut o influență slabă sau neglijabilă asupra SGS în arborete de fag din aceeași regiune ecologică (PIOTTI *et al.* 2013). SGS au fost observate în arborete virgine (engl. *primary growth stands*) de *Pinus strobus*, dar nu în arborete în care s-au efectuat tăieri (engl. *second growth stands*) din America de Nord (MARQUARDT și EPPERSON 2004). Se poate concluziona că existența unei similitudini între distanțele genetice și cele spațiale în interiorul arboretelor (*i.e.* SGS) ne poate oferi informații utile privind istoricul unei păduri, și ca urmare ajuta în elaborarea unor strategii de conservare și de gestionare durabilă a acesteia.

## 2.4 Diversitatea speciilor autohtone de cvercinee la locusul *Dhn3*

### Introducere

Dehidrinele sunt un grup de proteine produse de plante în condiții de stres hidric (INGRAM și BARTELS 1996). Familia de gene care codifică dehidrinele a fost studiată la mai multe specii de plante, printre care și unele de arbori (KOSOVÁ *et al.* 2007). Recent s-a reușit izolarea și caracterizarea unei gene care codifică un tip de dehidrină (*Dhn3*) la *Q. petraea*. Un nivel foarte redus de variație a fost observat la gena *Dhn3* în populații de *Q. petraea* situate de-a lungul unui profil altitudinal în Munții Pirinei (VORNAM *et al.* 2011). Între speciile autohtone de cvercinee există deosebiri considerabile în privința cerințelor acestora față de factorii climatici și edafici (STĂNESCU *et al.* 1997). Scopul cercetărilor a fost evidențierea diferențelor la nivelul unei gene cu relevanță pentru adaptare, *Dhn3*, între specii de cvercinee importante pentru silvicultura din România.

### Material și metode

#### *Eșantionajul*

Au fost selectate câte două populații tipice pentru cinci specii autohtone de cvercinee: *Q. frainetto*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* (Tab. 2-19). În fiecare populație s-au ales câte 50 de arbori maturi situați la o distanță de minim 50 m unul față de celălalt. În analiză au fost incluse și 483 de exemplare de stejar răspândite pe o suprafață de 8,6 ha în Rezervația Științifică Bejan-Deva, care aparțin primelor patru specii (CURTU *et al.* 2015).

#### *Analize genetice*

ADN-ul a fost extras din muguri și frunze cu *Qiagen DNeasy96* și *Plant Mini Kit* după un protocol de laborator modificat de TOADER *et al.* (2009). Markerul *Dhn3* a fost amplificat cu perechea de primeri: *forward* 5' - TCC ATC ACT CCC TTC TTC TGA - 3' și *reverse* 5' - TGT CGC ATT ACC AAA ACC AG - 3'. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) s-a realizat cu *Corbett* thermocycler. Programul a constat din: (1) denaturare la 95°C pentru 3 minute; (2) 30 de cicluri cu denaturare la 95°C pentru 40s, hibridare la 55°C pentru 1 minut și un pas de elongare la 72°C pentru 2 min.; (3) elongare finală la 72°C pentru 15 min. Diferențele între produsele PCR s-au determinat prin electroforeză orizontală pe gel de agaroză de concentrație 1,5%.

Colorarea s-a făcut cu *GelRed* (Biotium). Timpul de rulare a fost de 10 min la 50 V și urmate de 100 min la 90 V (CRĂCIUNESC *et al.* 2015).

**Tabelul 2-19** Localizarea geografică a populațiilor eșantionate (CRĂCIUNESC *et al.* 2015)

Specia	Abreviere	Populația	Latitudine	Longitudine	Altitudine (m)
			N	E	
<i>Q. frainetto</i>	LU-Fra	Lugoj	45°43'	21°59'	210
	SO-Fra	Seaca Optășani	44°43'	24°28'	310
<i>Q. petraea</i>	CR-Pet	Cristian	45°38'	25°33'	730
	RO-Pet	Ronișoara	47°54'	23°58'	480
<i>Q. pubescens</i>	SA-Pub	Săcălaia	46°57'	23°56'	450
	MA-Pub	Măcin	45°13'	28°14'	320
<i>Q. robur</i>	PR-Rob	Prejmer	45°44'	25°44'	510
	RE-Rob	Reșca	44°10'	24°25'	80
<i>Q. pedunculiflora</i>	BC-Ped	Braniștea Catârilor	43°53'	24°14'	110
	PU-Ped	Punghina	44°15'	22°50'	110
	BE-Fra				
Pădurea Bejan	BE-Pet	Bejan	45°51'	22°53'	280
	BE-Pub				
	BE-Rob				

#### *Analiza statistică a datelor*

Pentru fiecare populație și specie s-au calculat parametrii de bază ai diversității genetice cu programul GenAlEx 6.5 (PEAKALL și SMOUSE 2006). Pentru că mărimea eșantionului a variat între populații, s-a calculat bogăția alelică ( $A_r$ ) – un parametru independent de mărimea eșantionului (EL MOUSADIK și PETIT 1996; PETIT *et al.* 1998). Pentru calcule s-a folosit programul FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 1995), mărimea minimă a unui eșantion fiind de 41 de

arbori în populația Ronișoara-Maramureș. Tot cu același program au fost testate diferențele între specii în privința parametrilor genetici (1000 de permutări). Dendrograma de tip UPGMA s-a construit pe baza distanțelor genetice *unbiased Nei* cu ajutorul programelor POPULATIONS 1.2.32 (LANGELLA 2000) și MEGA 6 (TAMURA *et al.* 2007). S-au efectuat 1000 de replicații.

### Rezultate și discuții

În eșantionul total format din 967 de stejari au fost identificate trei alele la locusul *Dhm3* (Tab.2-20). Cele două alele mai frecvente se găsesc în fiecare populație și au o frecvență cumulată de 97%. Cea de-a treia alelă este foarte rară (frecvența=0.03), găsindu-se totuși la fiecare din cele cinci specii de cvercinee. Într-un studiu efectuat în populații de *Q. petraea* din Munții Pirinei au fost observate numai două alele (VORNAM *et al.* 2011), care corespund foarte probabil cu cele două alele majore detectate în prezentul studiu. Bogăția alelică, un parametru care nu depinde de mărimea eșantionului, a prezentat valori similare pentru toate cele cinci specii. Numărul efectiv de alele, ca de altfel și diversitatea genică, prezintă valori mai mici pentru *Q. frainetto*, *Q. robur* și *Q. pedunculiflora*, speciile care prezintă preponderent una sau alta dintre alele. Valoarea maximă pentru cei doi parametri este la *Q. petraea*, datorită polimorfismului balansat existent la locusul *Dhm3*.

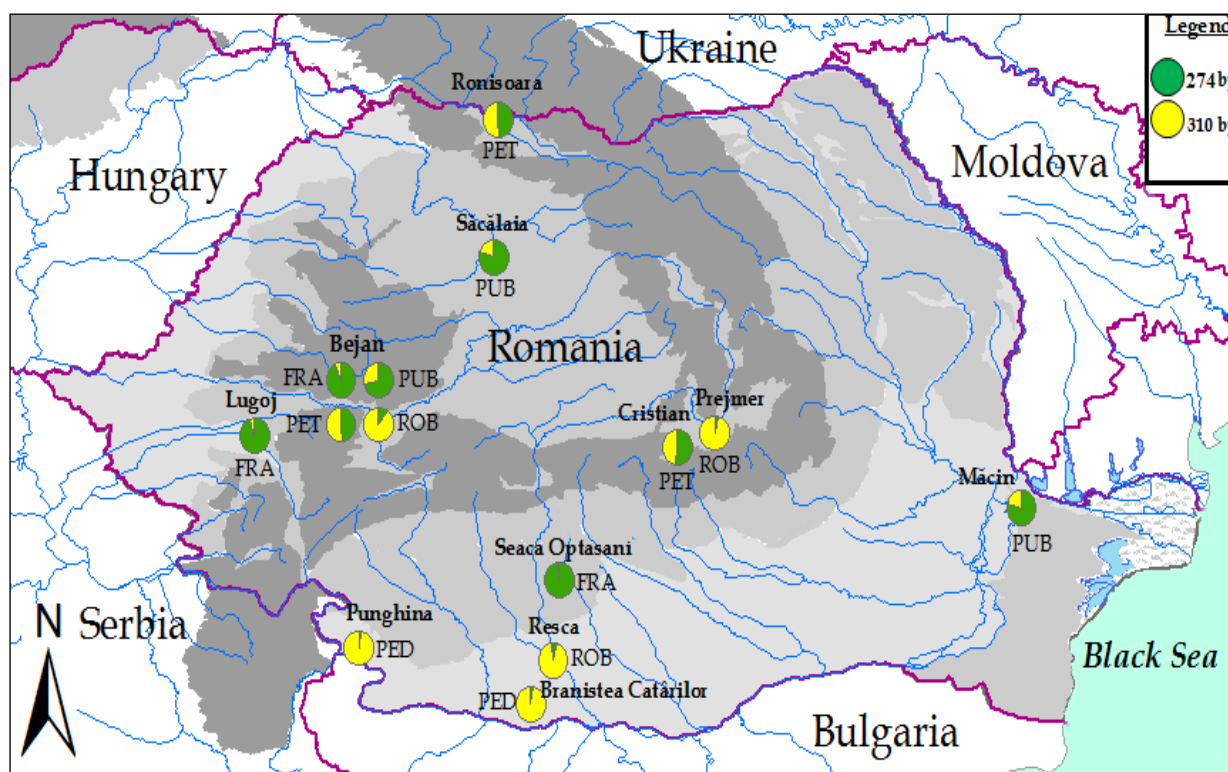
**Tabelul 2-20** Diversitatea genetică la *Dhm3* pentru fiecare specie

Specia	N	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	A <sub>r</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>
<i>Q. frainetto</i>	171	3	1.10	2.26	0.09	-0.05
<i>Q. petraea</i>	265	3	2.01	2.14	0.50	0.12
<i>Q. pubescens</i>	211	3	1.60	2.12	0.37	0.06
<i>Q. robur</i>	216	3	1.18	2.28	0.15	0.04
<i>Q. pedunculiflora</i>	104	3	1.06	2.35	0.06	0.15

N – mărimea eșantionului; N<sub>a</sub> – numărul mediu de alele pe locus; N<sub>e</sub> – numărul efectiv de alele; A<sub>r</sub> – bogăția alelică; H<sub>e</sub> – heterozigoția așteptată (diversitatea genică); F<sub>IS</sub> – deficitul de heterozigoți.

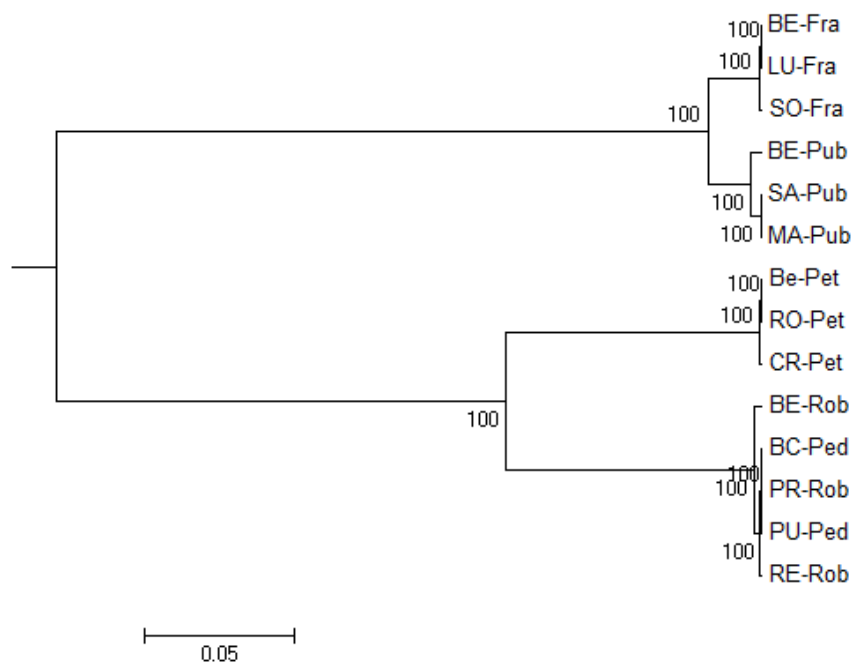
Deși numărul de alele observate pentru fiecare specie este identic, există diferențe foarte mari între specii în ceea ce privește structura alelică. Astfel, alela 272bp este aproape fixată la *Q. frainetto*, în timp ce cea de-a doua alelă 310bp este aproape fixată la *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* (Fig. 2-24). Interesantă este similitudinea genetică între populațiile aceleiași

specii ( $P < 0.05$ ), chiar dacă acestea se găsesc în regiuni ecologice diferite și la distanțe geografice mari una față de cealaltă. Chiar și în arboretul mixt din pădurea Bejan, în care au loc hibridări între toate speciile existente (CURTU *et al.* 2007a; CURTU *et al.* 2009a), structura alelică pe specii rămâne similară cu cea din populațiile tipice, în care, cel puțin teoretic, incidența fenomenului de hibridare naturală trebuie să fie mai restrânsă (GAILING și CURTU 2014).



**Fig. 2-24** Frecvențele celor două alele majore identificate la gena *Dhn3*. FRA – *Q. frainetto*, PED – *Q. pedunculiflora*, PET – *Q. petraea*, PUB – *Q. pubescens*, ROB – *Q. robur* (CRĂCIUNESC *et al.* 2015).

Dendrograma construită pe baza distanțelor genetice *unbiased Nei* indică o separare clară, cu un puternic suport statistic (valori bootstrap=100) pentru patru din cele cinci specii de cvercinee (Fig. 2-25). Se reușește astfel, cu ajutorul unui singur locus-marker, să se separe cele patru specii de cvercinee autohtone. Gruparea speciei *Q. frainetto* împreună cu *Q. pubescens* într-o ramură a dendrogramei este în deplină concordanță cu rezultatele anterioare bazate pe gene care codifică enzime și SSRs (CURTU *et al.* 2007b), precum și cu încadrarea taxonomică a celor două specii (ambele fac parte din secția *Dascia*).



**Fig. 2-25** Dendrograma UPGMA bazată pe distanțele *unbiased Nei* între populații de cvercinee. Numerele din dreapta nodurilor reprezintă valori *bootstrap*. FRA – *Q. frainetto*, PED – *Q. pedunculiflora*, PET – *Q. petraea*, PUB – *Q. pubescens*, ROB – *Q. robur*.

Populațiile de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* nu pot fi însă diferențiate pe baza locusului *Dhn3* (Fig. 2-25). Cea mai aparte din întregul subgrup este populația de *Q. robur* din pădurea Bejan, care include foarte probabil forme introgressive, rezultate prin flux genic interspecific, dar care din punct de vedere morfologic nu se deosebesc de alte exemplare de *Q. robur*. Spre exemplu, hibridarea între *Q. robur* și *Q. petraea* este de multe ori asimetrică, i.e. mai mulți hibrizi rezultă din încrucișări de tip *Q. robur* (genitor matern) x *Q. petraea* (genitor patern) decât viceversa (AAS 1991). Hibrizii rezultați sunt mult mai apropiați ca aspect de fenotipul genitorului matern.

În concluzie, locusul *Dhn3* se dovedește extrem de util pentru diferențierea majorității speciilor autohtone de cvercinee, dând rezultate comparabile cu analizele care presupun folosirea unui întreg set de markeri de tipul izoenzimelor sau SSRs. Mai mult, locusul *Dhn3* prezintă avantajul localizării în interiorul unei gene cu relevanță pentru adaptarea la condițiile de mediu.

## 2.5 Diversitatea genetică a taxonului *Q. virgiliana* Ten. în raport cu *Q. pubescens* Willd.

### Introducere

Existența unei a doua specii în secția Dascia, Seria Lanuginosae, *Q. virgiliana* - stejar italian, alături de stejarul pufos (*Q. pubescens*) este un subiect de controversă printre botaniști și silvicultori (ENESCU *et al.* 2013). Menționarea prezenței taxonului *Q. virgiliana* într-o anumită zonă geografică s-a făcut, de cele mai multe ori, pe baza unor simple observații asupra morfologiei frunzelor și fructelor (ghindelor), fără a avea la bază analize morfometrice detaliate și prelucrări statistice adecvate. Spectrul de variație al caracterelor de recunoaștere pentru *Q. virgiliana* și *Q. pubescens* se suprapune în mare măsură, ceea ce face dificilă separarea celor doi taxoni (DONIȚĂ *et al.* 2004; STĂNESCU *et al.* 1997). Recent, s-au eșantionat exemplare în marea majoritate a zonelor geografice în care este menționată în literatură prezența taxonului *Q. virgiliana* în România. S-au luat în considerare numeroase variabile măsurabile și observabile ale frunzei și fructului. Analizele statistice au arătat că descriptorul cu puterea cea mai mare de discriminare a taxonului *Q. virgiliana* față de *Q. pubescens* este lungimea pedunculului cupei (ENESCU *et al.* 2013). În paralel cu analizele privind morfologia frunzei și fructului a fost testată ipoteza conform căreia *Q. virgiliana* și *Q. pubescens* reprezintă două entități genetice distincte.

### Material și metode

Analizele genetice s-au efectuat pe un eșantion format din 96 de stejari, din care majoritatea (70) au fost exemplare tipice de *Q. pubescens* și 26 de *Q. virgiliana*. Separarea celor două grupe s-a făcut, în principal, pe baza lungimii pedunculului cupei. Eșantionul a cuprins majoritatea exemplarelor tipice de *Q. virgiliana* identificate în țara noastră (ENESCU *et al.* 2013). ADN-ul a fost extras din muguri cu *Qiagen DNeasy 96 Plant Kit* după un protocol de laborator modificat de TOADER *et al.* (2009). S-au utilizat șapte SSRs grupate în două seturi. Primul set a fost format din *ssrQpZAG112* (D4, 0.20), *ssrQpZAG96* (D3, 0.80), *ssrQpZAG11* (D3, 0.60) și *ssrQpZAG110* (D4, 0.90) iar setul al doilea din *ssrQpZAG87* (D3, 0.55), *ssrQpZAG20* (D3, 0.80) și *ssrQpZAG7* (D4,0.65). Tipul de culoare fluorescentă și concentrația primerilor sunt precizate în paranteză. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) s-a efectuat cu *Eppendorf Master Cycler* într-un volum de 10 μl, conținând 1 μl ADN (1:40), 2 μl 5x PCR Buffer, 0.90 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 μl dNTPs (2mM) și 0.10 μl Promega *Taq* DNA polymerase (5 U/μl). Programul PCR a fost după cum urmează: 3 min denaturare la 94 °C urmate de 30 de cicluri de 45 s



denaturare la 94 °C, hibridare pentru 35 s la 51 °C, 1 min 50 s elongare la 69 °C și o extensie finală la 69 °C pentru 15 min. Produsele PCR au fost rulate pe *Beckman Coulter Genetic Analyser*, folosind metoda Frag-3 și *Size Standard 400*. Pentru determinarea lungimii fragmentelor s-a folosit *Fragment Analysis Software* cu *default parameters* și *PA ver. 1 dye correction*. Parametrii genetici au fost calculați cu programul *GenALEx*, version 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006). Bogăția alelică s-a calculat cu programul *FSTAT* version 2.9.3.2 (GOUDET 2001).

Clasificarea indivizilor pe baze genetice s-a realizat cu două metode: (1) bazată pe frecvențele relative ale alelelor, implementată în *GenALEx* version 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006); (2) analiza Bayesiană din programul *STRUCTURE* version 2.3.3 (PRITCHARD *et al.* 2000). Modelul folosit în analiza Bayesiană a luat în considerare numai datele genotipice (engl. *blind procedure*). S-au realizat cinci rulări independente pentru parametrul *K*, numărul de clustere genetice, a cărui valoare a variat între 1 și 10. Faza inițială a constat din 100.000 de pași, fiind urmată de 200.000 de iterații. Numărul de clustere a fost estimat cu ajutorul valorii  $\Delta K$  (EVANNO *et al.* 2005) și a programului *STRUCTURE HARVESTER* (EARL 2011). În analizele efectuate cu programul *STRUCTURE* s-a utilizat un set suplimentar de date genotipice obținut pentru opt populații tipice, câte două pentru *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* și, respectiv, *Q. frainetto* (CURTU *et al.* 2015).

## Rezultate și discuții

Valorile diversității genetice pentru *Q. virgiliana* și *Q. pubescens* au fost similare, cu excepția numărului de alele (Tab. 2-21). În special, în cazul regiunilor de ADN extrem de variabile, cum sunt cele cu secvențe repetitive (SSRs) utilizate, numărul de alele este strâns legat de mărimea eșantionului. În cazul de față au fost analizați de circa trei ori mai mulți arbori tipici de *Q. pubescens* decât de *Q. virgiliana*, fapt care explică numărul mai mare de alele pentru specia *Q. pubescens*. De aceea, s-a recurs la un parametru care este independent de mărimea eșantionului, bogăția alelică, caz în care valorile pentru cei doi taxoni devin apropiate (14,8 pentru *Q. pubescens* vs. 13,9 pentru *Q. virgiliana*).

Indicele de diferențiere  $F_{ST}$  între cei doi taxoni, calculat ca medie pentru cei șapte loci, a avut o valoare foarte mică ( $0,012 \pm 0,003$ ). Cea mai mare valoare a indicelui  $F_{ST}$  s-a înregistrat la locusul QpZAG20. Nivelul redus de diferențiere genetică este similar celui de diferențiere morfologică. Din analiza comparativă a altor specii de cvercinee, cu ajutorul unor seturi similare de SSRs, au

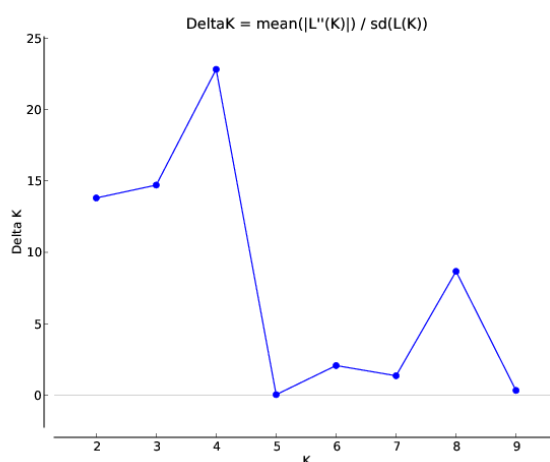
rezultat valori mult mai mari ale indicelui  $F_{ST}$  decât cele obținute între *Q. virgiliana* și *Q. pubescens*.

**Tabelul 2-21** Diversitatea genetică estimată pe baza a șapte SSRs la *Q. virgiliana* și *Q. pubescens*

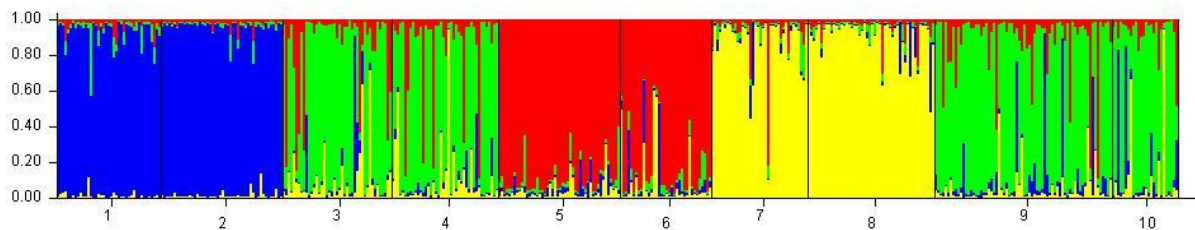
Specia		N	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	F
<i>Q. virgiliana</i>	Media	24.7	14.0	8.2	0.768	0.832	0.069
	SE	0.3	1.6	1.7	0.048	0.041	0.058
<i>Q. pubescens</i>	Media	68.4	20.7	9.0	0.837	0.862	0.028
	SE	0.9	2.8	1.6	0.021	0.026	0.019

N – mărimea eșantionului;  $N_a$  – numărul mediu de alele pe locus;  $N_e$  – numărul efectiv de alele;  $H_e$  – heterozigoția așteptată (diversitatea genică); F – deficitul de heterozigoți; SE – eroarea standard.

Rezultatele testului de apartenență implementat în *GenAlEx* arată că numai 61% din exemplarele analizate aparțin clusterului corespunzător unuia sau altuia dintre taxoni. Mai mult de jumătate din exemplarele de *Q. virgiliana* sunt considerate *Q. pubescens*. Cel mai probabil număr de clustere genetice, indicat de valoarea parametrului  $\Delta K$ , este de patru, chiar dacă în analiza Bayesiană au fost incluse cinci prezumtive specii de cvercinee (Fig. 2-26). Cele 96 de exemplare de *Q. virgiliana* și *Q. pubescens* aparțin în marea lor majoritate clusterului specific celor două populații tipice de *Q. pubescens*, de la Săcălaia și din Munții Măcinului (Fig. 2-27). Rularea modelului numai pentru cei 96 de arbori de *Q. virgiliana* și *Q. pubescens* nu a indicat prezența unei structuri genetice ( $K=1$ ).



**Fig. 2-26** Determinarea numărului cel mai probabil de grupuri omogene din punct de vedere genetic ( $K$ ) prin calculul valorii  $\Delta K$



**Fig. 2-27** Apartenența indivizilor la patru cluster (K) identificate prin analiza Bayesiană. Fiecare individ este reprezentat de o linie verticală subțire, care este partiționată în segmente de K culori. Mărimea unui segment de o anumită culoare este proporțională cu gradul de apartenență al individului la clusterul aferent culorii respective. 1-2 – populații de *Q. robur*; 3-4 – populații de *Q. pubescens*; 5-6 – populații de *Q. petraea*; 7-8 – populații de *Q. frainetto*; 9 – exemplare tipice de *Q. pubescens*; 10 – exemplare tipice de *Q. virgiliana*.

Pe baza genotipurilor multilocus rezultate din analiza a șapte SSRs hipervariabile, suficiente pentru separarea a patru specii de cvercinee autohtone (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. frainetto* și *Q. pubescens*), nu s-a reușit identificarea unui al cincilea cluster specific pentru *Q. virgiliana*. Comparativ cu alte specii de cvercinee, *Q. pubescens* rămâne cea mai "impură" specie din punct de vedere genetic (Fig. 2-27). Astfel, procentul de apartenență al exemplarelor tipice de *Q. pubescens* la propriul cluster este de regulă mai mic decât în cazul celorlalte specii analizate (CURTU *et al.* 2007a; CURTU *et al.* 2011a). Și în cazul de față, procentul de apartenență (0,69 și 0,71) la propriul cluster (de culoare verde în Fig. 2-27) pentru populațiile tipice de *Q. pubescens* de la Săcălaia și Măcin a fost mai mic decât în cazul exemplarelor tipice de *Q. pubescens* și chiar de *Q. virgiliana* (0,75 și 0,73). Marea majoritate a indivizilor de *Q. virgiliana* nu apar ca fiind hibridi între alte specii autohtone de cvercinee, infirmându-se astfel ipoteza conform căreia acest taxon ar avea o origine hibridogenă (KLEINSCHMIT 1993). Pentru  $K=5$ , gradul de apartenență al exemplarelor de *Q. virgiliana* la clusterul specific populațiilor de *Q. pubescens* este chiar mai mare decât cel al celor 70 de exemplare tipice de *Q. pubescens*.

Spre deosebire de taxonul *Q. pedunculiflora*, al cărui statut (specie sau unitate intraspecifică) este pus, de asemenea, sub semnul întrebării (CURTU *et al.* 2009c), și pentru care se poate delimita o arie clară de răspândire, în sud-estul României, *Q. virgiliana* a fost semnalat sporadic în diverse zone din țară, și, întotdeauna, împreună cu exemplare tipice de *Q. pubescens* (ENESCU *et al.* 2013). Separarea morfologică între *Q. virgiliana* și *Q. pubescens* s-a putut face, în principal, numai prin stabilirea unui criteriu arbitrar în privința lungimii pedunculului fructifer. Au fost, de asemenea, identificate numeroase forme intermediare între cei doi taxoni.

## Concluzii

Datele genetice obținute, pe baza analizei a șapte SSRs foarte variabile, pentru un colectiv de arbori tipici de *Q. virgiliana* și *Q. pubescens* nu au permis identificarea unei entități genetice specifice exemplarelor catalogate pe criterii morfologice ca fiind de *Q. virgiliana*. Exemplarele de *Q. virgiliana* au fost încadrate în același grup genetic cu cele de *Q. pubescens*, chiar dacă în analiză au fost incluse populații tipice pentru celelalte specii autohtone de cvercinee. Nu au fost observate diferențe semnificative între cei doi taxoni în privința diversității genetice iar deosebirile genetice sunt mult mai mici decât între alte specii autohtone din genul *Quercus*. Rezultatele obținute sugerează că *Q. virgiliana* este mai degrabă o varietate (formă) a speciei *Q. pubescens* decât o specie de sine stătătoare.

## 2.6 Diversitatea ADN-ului cloroplastic la gorunul (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) și stejarul pedunculat (*Q. robur* L.) din regiunea Moldovei

### Introducere

Analiza diversității la nivelul ADN-ului cloroplastic (ADNcp) ne poate oferi informații deosebit de valoroase privind evenimente care au afectat populațiile sau speciile în decursul evoluției, cum ar fi variații puternice ale mărimii (efectivului), migrații sau colonizării (ENNOS *et al.* 1999), dar și fenomene de hibridare și introgresiune (RIESEBERG și SOLTIS 1991). Observarea unei structurări geografice a diversității la nivelul ADNcp, precum și a unui nivel ridicat de diferențiere între populații, indică, pentru multe specii de angiosperme, o dispersie limitată a semințelor, dar și existența unor refugii glaciare, în care populațiile au fost izolate un timp îndelungat, și a unor rute de migrare postglaciare (DUMOLIN-LAPEGUE *et al.* 1997; PETIT *et al.* 2003). Cel mai mare studiu privind variația ADNcp și distribuția geografică a acesteia a fost realizat pentru speciile de stejari albi europeni. În total au fost analizate peste 2.600 de populații din aproape întreaga Europă (PETIT *et al.* 2002b). În acest studiu au fost incluse și câteva populații din România (BORDÁCS *et al.* 2002), fără însă ca densitatea lor să permită evidențierea unei structuri la scară mică a diversității stejarilor autohtoni la nivelul ADNcp. Scopul cercetărilor a fost caracterizarea diversității ADNcp la speciile de cvercinee din regiunea Moldovei, o zonă relativ puțin studiată în cercetările anterioare.

## Material și metode

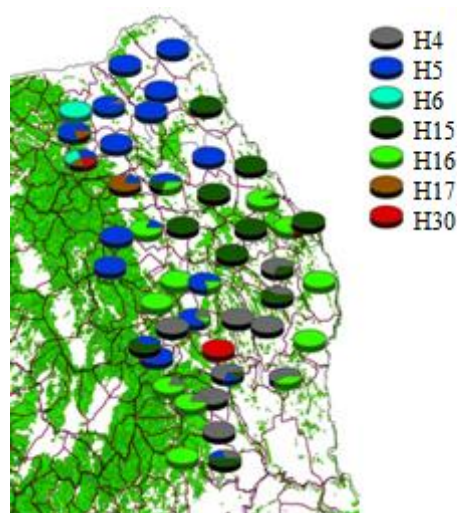
Cercetările au vizat numai cele mai răspândite specii de cvercinee din zona Moldovei, gorunul (*Q. petraea*) și stejarul pedunculat (*Q. robur*), întrucât exemplare din alte specii sunt prezente numai sporadic în regiune (ȘOFLETEA și CURTU 2007). Au fost eșantionate 35 de populații naturale de *Q. petraea* și 26 de *Q. robur*, situate în toate zonele de areal ale celor două specii din Moldova (MOLDOVAN *et al.* 2010). S-a recoltat material biologic, constând din muguri sau frunze, din cinci arbori pe populație, situați la o distanță de minim 100 m unul față de celălalt. ADN-ul a fost extras cu *Dneasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) sau *ZR Plant/Seed DNA Kit* (Zymo Research, U.S.A.) folosind un protocol de lucru descris în TOADER *et al.* 2009. Au fost amplificate patru regiuni ale ADNcp: *trnD-trnT* (DT), *psaA-trnS* (AS), *trnC-trnD* (CD) și *trnT-trnF* (TF). Programul PCR a constat din: 4 min denaturare la 94°C urmată de 30 de cicluri a câte trei pași fiecare [50 s denaturare la 94 °C, 50 s (1 min pentru AS), hibridare la 58 °C (pentru AS, CD și TF) sau 56 °C (pentru DT) și 2 min (pentru DT și TF) sau 4 min (pentru AS și CD), elongare la 72 °C]. Elongarea finală a fost la 72 °C pentru 10 min. Două fragmente amplificate (AS și TF) au fost tăiate cu enzima *Hinf I* (TABERLET *et al.* 1991) iar celelalte două fragmente (CD și DT) cu enzima *Taq I* (DEMESURE *et al.* 1995). Fragmentele rezultate au fost separate pe geluri de poliacrilamidă (concentrație 8%) și 0,75 mm grosime. Electroforeza verticală s-a desfășurat după cum urmează: 40 min la 100 V, urmate de 10 min la 300 V și 3h 20 min (AS și CD), 2h și 40 min (DT), 1h și 40 min (TF) la 500 V. Colorarea fragmentelor de ADN s-a făcut cu *Syber Gold* iar vizualizarea cu sistemul de ultraviolete (GelDoc-It, UVP Imaging System). Haplotipurile au fost denumite în conformitate cu nomenclatura folosită la nivel european (PETIT *et al.* 2002a). Frecvențele și indicii diversității genetice s-au calculat cu programele HAPLODIV și HAPLONST (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software>). Pentru reprezentarea spațială a haplotipurilor s-a folosit programul ARCWIEW 9.2. (MOLDOVAN *et al.* 2010).

## Rezultate și discuții

În total au fost identificate 22 de variante de ADNcp, care au fost grupate în șapte haplotipuri *sensu lato* (Fig. 2-28) descrise în cercetări anterioare (PETIT *et al.* 2002b). Patru haplotipuri de ADN cloroplastic aparțin liniei filogenetice A (H4, H5, H6 și H30) și trei haplotipuri liniei E (H15, H16 și H17), toate având ca origine prezumtivă Peninsula Balcanică (PETIT *et al.* 2002a). Rezultatele indică lipsa unui transfer de materiale de reproducere pe distanțe mari, realizat de om, ca de exemplu din zona de vest a Europei în regiunea luată în studiu, spre deosebire de

cazuri contrare, în care, cu ajutorul ADNcp, au fost detectate în Europa de Vest, haplotipuri din zona Balcanilor (GAILING *et al.* 2007).

Cel mai frecvent haplotip din sudul Moldovei (H4) a fost identificat anterior, cu o frecvență mai ridicată, în populații localizate în sudul și estul țării (BORDÁCS *et al.* 2002). Originea cea mai probabilă a acestui haplotip (H4) este estul Peninsulei Balcanice, de-a lungul coastei Mării Negre (BORDÁCS *et al.* 2002). Două haplotipuri identificate anterior în sudul țării (H15 și H16) sunt localizate cu precădere în zona centrală a Moldovei. Un alt haplotip (H5) este dominant în nordul Moldovei. Acest haplotip (H5) este foarte frecvent în Banat și Transilvania (POPESCU și POSTOLACHE 2009). Migrarea stejarilor în postglaciar, pornind din populații de stejar din Transilvania, prin trecătorile din nordul Carpaților Orientali, poate fi o explicație pentru prezența masivă a acestui haplotip (H5) în nordul Moldovei. Tot în nordul Moldovei a fost observat un alt haplotip (H6) specific regiunii intracarpatică (BORDÁCS *et al.* 2002). Acest fapt susține ipoteza unor rute de migrare postglaciară a stejarilor din Transilvania înspre Nordul Moldovei. O altă explicație a prezenței reduse, în numai două populații de stejar din nordul Moldovei, a unui haplotip foarte frecvent în zona de vest a țării (H6) poate fi transferul artificial de materiale forestiere de reproducere din trecut. Bucovina, la fel ca și Transilvania, au fost administrate după aceleași reguli și principii silvice, care au permis, la sfârșitul sec. XIX și începutul sec. XX, folosirea de materiale de reproducere aduse din alte zone ale Austro-Ungariei (STĂNESCU *et al.* 1997).



**Fig. 2-28** Haplotipurile de ADN cloroplatic observate în regiunea Moldovei (MOLDOVAN *et al.* 2010)

Cele șapte haplotipuri de ADNcp se regăsesc la ambele specii, *Q. petraea* și *Q. robur*, fapt care susține, atât originea populațiilor actuale din refugii glaciare în care erau prezente ambele specii, cât și hibridări repetate în timpul evoluției postglaciare (PETIT *et al.* 2004). Diferențierea genetică

între populațiile de *Q. petraea* este mai mare decât cea între populațiile de *Q. robur*, deși diferențele rămân nesemnificative din punct de vedere statistic (Tab. 2-22). Această tendință este confirmată în analize comparative *Q. petraea* vs. *Q. robur* pentru diferite zone geografice ale Europei, diferențele fiind semnificative ( $P < 0.01$ ) în cinci din cele șase cazuri luate în considerare (PETIT *et al.* 2002b; PETIT *et al.* 2004). O diferențiere mai scăzută între populațiile de *Q. robur*, comparativ cu cele de *Q. petraea*, la nivelul ADNcp, indică o dispersie mai bună a ghindelor de *Q. robur*, având în vedere că ADNcp se transmite la stejari pe linie maternă. Gaița (*Garullus glandarius*), poate cel mai important vector de diseminare pe distanțe mari (până la 8 km față de arborele mamă), are o preferință pentru ghindele de *Q. robur*, în dauna celor de *Q. petraea* (DUCOUSSO *et al.* 1993; PETIT *et al.* 2004).

**Tabelul 2-22** Diversitatea genetică la nivelul ADN-ului cloroplastic în regiunea Moldovei

Specia	Nr. de populații	Nr. de haplotipuri	$h_s$	$h_T$	$G_{ST}$
<i>Q. robur</i>	26	7	0.196 ( $\pm 0.059$ )	0.800 ( $\pm 0.025$ )	0.754 ( $\pm 0.074$ )
<i>Q. petraea</i>	35	7	0.156 ( $\pm 0.045$ )	0.787 ( $\pm 0.025$ )	0.802 ( $\pm 0.056$ )
Total	61	7	0.174 ( $\pm 0.036$ )	0.785 ( $\pm 0.017$ )	0.779 ( $\pm 0.045$ )

$h_s$  – diversitatea în interiorul populațiilor;  $h_T$  – diversitatea totală;  $G_{ST}$  – indicele de diferențiere genetică. În paranteză este eroarea standard.

Diversitatea genetică totală a fost mai mare în zona sudică a Moldovei ( $h_T=0.764$ ) decât în partea de nord ( $h_T=0.682$ ). Reducerea diversității genetice de la sud către nord, din zona refugiilor glaciare către zona recent colonizată, este caracteristică pentru multe specii europene de arbori (FARCAS *et al.* 2006; PETIT *et al.* 2003).

## Concluzii

Pe un teritoriu relativ restrâns au fost identificate nu mai puțin de șapte haplotipuri de ADN cloroplastic *sesu lato* și 22 *sensu stricto*, toate aparținând unor linii filogenetice specifice Peninsulei Balcanice. Cele șapte haplotipuri de ADN se regăsesc atât la *Q. robur*, cât și la *Q. petraea*, diferențele genetice între populațiile speciei *Q. robur* fiind mai mari decât la *Q. petraea*, fapt ce poate fi explicat de dispersia mai bună a ghindelor de *Q. robur*. Haplotipurile sunt structurate spațial, în fiecare parte a zonei luată în studiu domină un alt haplotip, ceea ce face ca datele obținute să fie utile pentru un sistem de control al proveniențelor pentru stejarii autohoni.

## 2. Diversitatea genetică la specii de conifere

### 2.1 Diversitatea genetică în populații de molid [*Picea abies* (L.) Karst.] din România

#### Introducere

Magnitudinea și distribuția spațială a diversității genetice reflectă răspunsul speciei la acțiunea factorilor evolutivi, oferind, totodată, atât o imagine asupra istoricului speciei, cât și asupra posibilităților de evoluție în viitor (WHITE *et al.* 2007). Diversitatea genetică este considerată un element determinant al abilităților adaptative ale populațiilor (GREGORIUS 1991; HATTEMER și GREGORIUS 1990). Capacitatea de adaptare a speciei edificatoare de ecosistem (*keystone species*) joacă un rol esențial în menținerea diversității întregii comunități de organisme asociate (KIMMINS 2004).

Molidul [*Picea abies* L. (Karst.)] este cea mai răspândită specie de conifere din România, constituind un întreg etaj de vegetație în Munții Carpați - etajul boreal sau al pădurilor de molid. Datorită importanței economice, arealul molidului a fost mult extins prin culturi artificiale, începând cu mijlocul secolului al XIX-lea (STĂNESCU *et al.* 1997). Pentru plantații s-au folosit, cel mai adesea, materiale forestiere de reproducere de origine necunoscută, cel mai probabil aduse din Austria și Germania, care au contribuit la contaminarea fondului de gene autohton, specific molidului carpatic (ȘOFLETEA 2005). În prezent, molidul continuă să rămână cea mai utilizată specie în plantațiile din zona montană, având un rol important în acțiunea de stocare a carbonului (DUTCĂ *et al.* 2010).

Chiar dacă în prezent diversitatea genetică este estimată preponderent cu ajutorul markerilor ADN, markerii genetici de tipul aloenzimelor (sau izoenzimelor) prezintă avantajul relevării variației existente la nivelul unor gene cu rol important în metabolism (BERGMANN și HATTEMER 1998). Costurile reduse de laborator, cantitatea mică de material vegetal necesar și procedeul relativ simplu prin care sunt vizualizate constituie alte avantaje ale aloenzimelor. Mai mult, aloenzimele prezintă un nivel relativ ridicat de polimorfism în populațiile de arbori (HAMRICK *et al.* 1992), fiind folosite recent, spre exemplu, pentru evidențierea diminuării diversității genetice în populații de gorun (*Q. petraea*) situate la limita altitudinală inferioară de răspândire (BOROVICS și MÁTYÁS 2013), descrierea distribuției geografice a variației genetice (LUO *et al.* 2005), delimitarea taxonilor (VICARIO *et al.* 1995), evaluarea impactului lucrărilor silviculturale și ameliorării arborilor asupra diversității genetice (HOSIUS 1993; HUSSENDÖRFER 1996).



Diversitatea genetică a molidului european în două mari zone de răspândire, Europa centrală și cea septentrională, a fost intensiv studiată cu ajutorul aloenzimelor (GEBUREK 1999; GIANNINI *et al.* 1991; KRUTOVSKII și BERGMANN 1995; LAGERCRANTZ și RYMAN 1990; MÜLLER-STARCK 1995). Există însă foarte puține informații privind diversitatea molidului din zona carpatică, o regiune în care molidul a supraviețuit în timpul ultimei perioade glaciare și din care ulterior, o dată cu încălzirea climei, a migrat către nord și vest (POP 1954). Un prim test cu aloenzime s-a efectuat de-a lungul unui profil altitudinal în Masivul Postăvarul (STĂNESCU și ȘOFLETEA 1992). Recent au fost relevată structura genetică a molidului în arborete din Bucovina (TEODOSIU 2011) și la proveniențe de molid în culturi comparative (TEODOSIU 2009).

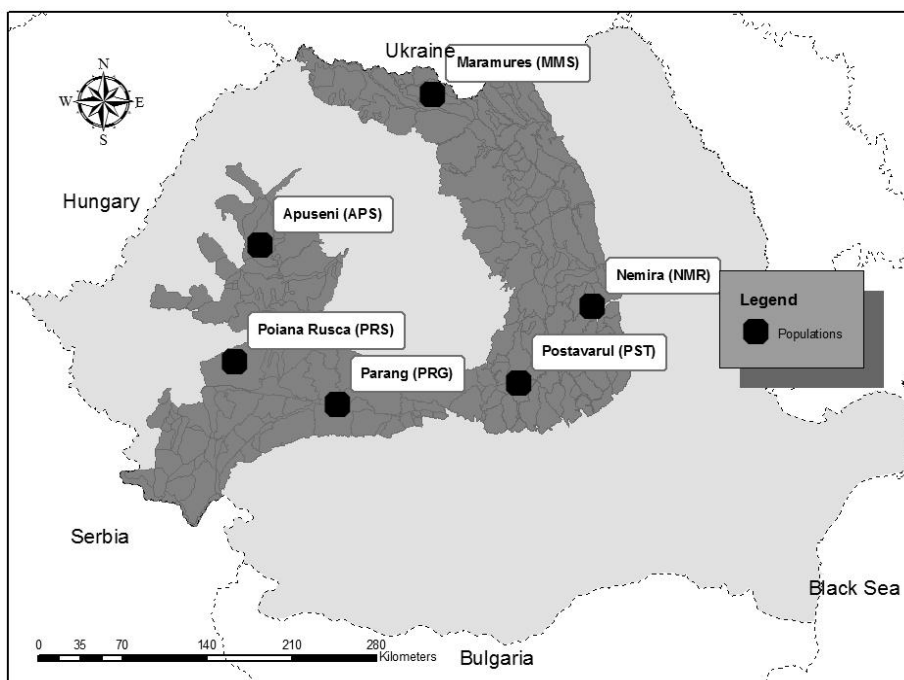
Cercetările au urmărit, în premieră, caracterizarea diversității genetice a molidului, cu ajutorul aloenzimelor, în populații din întregul lanț carpatic din România. S-a testat, de asemenea, dacă există diferențe genetice între molidișurile de mare altitudine și cele de joasă altitudine. S-au evaluat comparativ biotipurile de molid de turbărie, molid columnar (*P. a. var. columnaris*) și molid piramidal (*P. a. var. pyramidalis*).

## Material și metode

### *Localizarea cercetărilor*

În total au fost eșantionate șase populații distribuite relativ uniform în arealul natural al molidului din țara noastră (Fig. 2-1). Populația din Munții Apuseni a constat din trei subpopulații: molid de turbărie, molid cu coroană îngustă (*Picea abies* var. *columnaris*) și molid cu coroană piramidală (*Picea abies* var. *pyramidalis*). În alte trei locații (Maramureș, Postăvar și Parâng) au fost eșantionate câte două subpopulații - de mare altitudine și, respectiv, mică altitudine (Tab. 2-1).

Numărul de arbori pe populație a fost de minim 50 iar pe subpopulație de minim 30 (cazul molidului columnar). În total au fost luate probe din 695 de arbori, situați la o distanță de minim 30-50 m unul față de celălalt, pentru a diminua riscul de alegere a unor exemplare înrudite. Din fiecare arbore s-au recoltat lujeri care au fost păstrați la temperatură scăzută (-60°C) până la momentul analizei în laborator (CURTU *et al.* 2009b; RADU *et al.* 2014).



**Fig. 2-1** Localizarea geografică a populațiilor de molid analizate (RADU, CURTU *et al.* 2014).

#### *Analizele de laborator*

Extragerea enzimelor, electroforeza orizontală pe gel de amidon și colorarea specifică fiecărui sistem enzimatic s-a efectuat conform procedurilor descrise în KONNERT și WERNER (2004). S-au analizat șapte sisteme enzimatice și 12 loci genici: Phosphoglucose - isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9. – *Pgi-A*, *Pgi-B*, Aspartataminotransferase (GOT) E.C.2.6.1.1. – *Got-A*, *Got-B*, *Got-C*, Glutamatdehidrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2 – *Gdh-A*, Formiatdehidrogenase (FDH) E.C.1.2.1.2 – *Fdh-A*, Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1. – *Pgm-A*, *Pgm-B*, Shikimatdehidrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25. – *Skdh-A* și Isocitratdehidrogenase (IDH) E.C. 1.1.1.42 – *Idh-A*, *Idh-B* (CURTU *et al.* 2009b; RADU *et al.* 2014).

#### *Analiza statistică a datelor*

Cu ajutorul programului GenAlEx ver. 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006) s-au calculat următorii indici ai diversității: procentul de loci polimorfi (PPL%), numărul mediu de alele pe locus ( $N_a$ ), numărul efectiv de alele pe locus ( $N_e$ ), heterozigoția așteptată ( $H_e$ ), heterozigoția observată ( $H_o$ ) și indicele de fixare ( $F$ ). Bogăția alelică, raportată la cea mai mică mărime a unui eșantion, a fost calculată folosind tehnica *rarefaction* cu programul FSTAT 2.9.3.2. (GOUDET 1995). Indicele de diferențiere genetică  $F_{ST}$  între populații pentru fiecare locus și per total a fost calculat cu programul ARLEQUIN ver. 3.5.1.2. (EXCOFFIER *et al.* 2005).

**Tabelul 2-1** Descrierea populațiilor de molid analizate

Populația	Subpopulația	Latitudinea	Longitudinea	Altitudinea medie (m)	Temp. medie anuală (°C)	Mărimea eșantionului (N)
Apuseni (APS)	Molid de turbărie (APS-1)	46°36'5.61"N	22°46'25.09"E	1210	5.1	60
	<i>P. a. var. columnaris</i> (APS-2)	46°35'1.51"N	22°45'45.19"E	1390	5.0	30
	<i>P. a. var. pyramidalis</i> (APS-3)	46°36'42.02"N	22°45'28.554"E	1300	4.0	60
Parâng (PRG)	Altitudine mare (PRG-1)	45°24'45.79"N	23°38'17.66"E	1800	3.2	60
	Altitudine mică (PRG-2)	45°24'56.77"N	23°37'39.72"E	1370	4.6	60
Postăvar (PST)	Altitudine mare (PST-1)	45°34'10.11"N	25°33'52.78"E	1720	2.6	50
	Altitudine mică (PST-2)	45°36'33.40"N	25°32'35.70"E	920	6.0	50
Maramureș (MMS)	Altitudine mare (MMS-1)	47°45'47.08"N	24°37'39.40"E	1380	4.0	82
	Altitudine mică (MMS-2)	47°45'8.30"N	24°37'46.52"E	850	5.8	78
Nemira (NMR)	-	46°09'9.77"N	26°21'2.48"E	1300	4.2	100
Poiana Ruscă (PRS)	-	45°43'18.19"N	22°31'28.56"E	900	7.1	65

Temperatura medie anuală a fost luată din [www.worldclim.org](http://www.worldclim.org)

Testarea diferențelor între populațiile de mare și mică altitudine s-a făcut cu testul Student (testul *t*). Dendrograma UPGMA a fost construită pe baza distanțelor genetice *Cavalli-Sforza* cu ajutorul programului POPULATION 1.2.3.2. (LANGELLA 2000).

## Rezultate

Numărul total de alele observate la cei 12 loci genici analizați a fost de 38 (Tab. 2-2). Locusul genic cu cel mai mare număr de alele (cinci) a fost *Skdh-A*. Au fost identificate cinci alele specifice (*e.g.* prezente într-o singură populație), din care: două în masivul Postăvarul (*Idh-B-2* și *Pgi-A-3*), două în populația Poiana Ruscă (*Idh-A-4* și *Skdh-A-5*) și una în Apuseni (*Gdh-A-4*). Frecvența lor relativă este însă foarte redusă, sub 1% (Tab. 2-2).

**Tabelul 2-2** Frecvențele relative ale alelelor la cei 12 loci genici analizați

Locus	Alela	Populația					
		APS	PRG	PST	MMS	NMR	PRS
<i>Fdh-A</i>	1	0.007	0.021	0.000	0.003	0.000	0.008
	2	0.993	0.979	1.000	0.997	1.000	0.992
<i>Gdh-A</i>	2	0.960	0.942	0.970	0.981	0.965	0.954
	3	0.037	0.058	0.030	0.019	0.035	0.046
	4	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Got-A</i>	2	0.013	0.000	0.010	0.003	0.015	0.023
	3	0.983	1.000	0.990	0.997	0.985	0.962
	4	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015
<i>Got-B</i>	1	0.003	0.008	0.005	0.025	0.015	0.000
	2	0.993	0.983	0.995	0.972	0.950	1.000
	3	0.003	0.008	0.000	0.003	0.035	0.000
<i>Got-C</i>	2	0.397	0.392	0.420	0.469	0.425	0.423
	4	0.577	0.600	0.550	0.531	0.570	0.577
	5	0.027	0.008	0.030	0.000	0.005	0.000
<i>Idh-A</i>	2	0.040	0.004	0.015	0.041	0.035	0.015
	3	0.960	0.996	0.985	0.959	0.965	0.977
	4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
<i>Idh-B</i>	2	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
	3	0.997	0.996	0.965	0.997	0.990	0.992
	4	0.003	0.004	0.030	0.003	0.010	0.008

**Tabelul 2-2** (continuare) Frecvențele relative ale alelelor la cei 12 loci genici analizați

<i>Pgi-A</i>	2	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000
	3	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
<i>Pgi-B</i>	1	0.003	0.004	0.015	0.028	0.000	0.000
	2	0.323	0.425	0.255	0.291	0.300	0.331
	3	0.670	0.571	0.715	0.669	0.690	0.654
	4	0.003	0.000	0.015	0.013	0.010	0.015
<i>Pgm-A</i>	1	0.070	0.025	0.010	0.003	0.015	0.000
	2	0.917	0.971	0.985	0.956	0.945	0.985
	3	0.013	0.004	0.005	0.031	0.035	0.015
	4	0.000	0.000	0.000	0.009	0.005	0.000
<i>Pgm-B</i>	1	0.010	0.017	0.000	0.000	0.000	0.008
	2	0.990	0.983	0.990	0.981	1.000	0.992
	3	0.000	0.000	0.010	0.019	0.000	0.000
<i>Skdh-A</i>	1	0.043	0.021	0.020	0.059	0.020	0.000
	2	0.013	0.046	0.000	0.003	0.010	0.023
	3	0.927	0.925	0.980	0.934	0.960	0.946
	5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
	6	0.017	0.008	0.000	0.003	0.010	0.023

Abrevieri: APS – Apuseni, PRG – Parâng, MMS – Maramureș, NMR – Nemira, PST – Postăvar, PRS – Poiana Ruscă.

Nicio populație nu a prezentat variație la toți locii genici (Tab. 2-3). Procentul cel mai mic de loci polimorfi a fost înregistrat în masivul Nemira (86.1%). Procentul atinge valoarea maximă (91.7%) în trei populații: Apuseni, Postăvar și Maramureș. Bogăția alelică, un parametru independent de mărimea eșantionului, are valoarea maximă (1.955) în populația Apuseni, în timp ce valoarea minimă este înregistrată în Parâng (1,740). Valorile heterozigoției observate și așteptate sunt foarte apropiate între populații. Un ușor exces de heterozigoți, indicat de valorile foarte apropiate de zero și negative ale parametrului  $F$ , a fost observat în toate populațiile analizate (Tab. 2-3). Nu au fost constatate diferențe semnificative din punct de vedere statistic ( $P > 0.05$ ) între subpopulațiile de mare altitudine și cele de joasă altitudine eșantionate în Munții Maramureșului, Masivul Postăvarul și Munții Parâng, în privința parametrilor genetici. De asemenea, deși molidul columnar din Munții Apuseni (APS-2) prezintă valoarea cea mai ridicată a bogăției alelice, heterozigoției așteptate observate, comparativ cu celelalte două biotipuri (APS-1, APS-3), diferențele sunt ne semnificative. Molidul columnar prezintă cea mai mică

valoare (58,3%) pentru procentul de loci polimorfi, dacă se iau în considerare toate subpopulațiile (Tab. 2-2).

**Tabelul 2-3** Diversitatea genetică în populații de molid din România (RADU, CURTU *et al.* 2014)

Populația	Subpopulația	N	PPL (%)	Na	Ne	A	Ho	He	F
APS	APS-1	60	75.0%	2.250	1.205	1.944	0.126	0.122	-0.036
	APS-2	30	58.3%	2.000	1.237	2.000	0.150	0.134	-0.082
	APS-3	60	83.3%	2.250	1.176	1.922	0.123	0.117	-0.039
	APS	150	91.7%	2.667	1.205	1.955	0.130	0.125	-0.031
PRG	PRG-1	60	58.3%	1.833	1.178	1.665	0.113	0.106	-0.042
	PRG-2	60	75.0%	2.083	1.218	1.816	0.133	0.126	-0.039
	PRG	120	83.3%	2.333	1.200	1.740	0.123	0.118	-0.030
PST	PST-1	50	83.3%	2.000	1.175	1.870	0.109	0.106	-0.031
	PST-2	50	66.7%	2.000	1.176	1.743	0.098	0.096	-0.016
	PST	100	91.7%	2.333	1.175	1.807	0.104	0.102	-0.017
MMS	MMS-1	82	83.3%	2.083	1.185	1.810	0.110	0.112	-0.013
	MMS-2	78	75.0%	2.250	1.203	1.912	0.119	0.120	-0.016
	MMS	160	91.7%	2.500	1.194	1.861	0.114	0.116	-0.012
NMR	NMR	100	75.0%	2.333	1.187	1.923	0.119	0.116	-0.029
PRS	PRS	65	83.3%	2.250	1.188	1.897	0.121	0.112	-0.037
	Media generală	115.83	86.1%	2.403	1.192	1.864	0.119	0.115	-0.026
	SE		2.78%	0.106	0.039		0.020	0.020	0.004

Populații: APS – Apuseni; PRG – Parâng; MMS – Maramureș; PST – Postăvar; NMR – Nemira; PRS – Poiana Ruscă. N – mărimea eșantionului; PPL% - procentul de loci polimorfici; Na – numărul mediu de alele pe locus; Ne – numărul efectiv de alele pe locus; A – bogăția alelică; Ho – heterozigoția observată; He – heterozigoția așteptată; F – indicele de fixare; SE – eroarea standard.

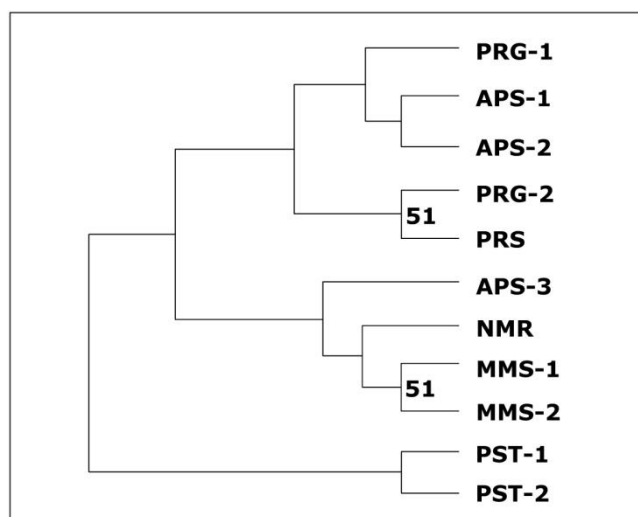
Indicele de diferențiere genetică între cele șase populații,  $F_{ST}$ , care se bazează pe variația frecvenței alelelor între populații, prezintă o valoare redusă ( $0.9\% \pm 0.1\%$ ). Locii genici cu cea mai mare putere de diferențiere au fost: *Pgm-A*, *Got-B*, *Pgi-B*, *Idh-B* și *Skdh-A* (Tab. 2-3).

**Tabelul 2-3** Valorile indicelui de diferențiere  $F_{ST}$  pentru fiecare locus genic

Locusul genic	$F_{ST}$
<i>Fdh-A</i>	0.008
<i>Gdh-A</i>	0.004
<i>Got-A</i>	0.009
<i>Got-B</i>	0.015
<i>Got-C</i>	0.002
<i>Idh-A</i>	0.008
<i>Idh-B</i>	0.010
<i>Pgi-A</i>	0.004
<i>Pgi-B</i>	0.011
<i>Pgm-A</i>	0.016
<i>Pgm-B</i>	0.006
<i>Skdh-A</i>	0.010
Media	0.009
SE	0.001

SE – eroarea standard

Dendrograma UPGMA, construită pe baza distanțelor genetice *Cavalli-Sforza*, luând în considerare subpopulațiile, indică o grupare în conformitate cu localizarea geografică, cu unele excepții (Fig. 2-2). Primul grup din cele trei este alcătuit din două subpopulații situate în Munții Apuseni, Poiana Ruscă și Parâng. Cel de-al doilea grup cuprinde cele două subpopulații din Maramureș, Munții Nemira și o subpopulație din Munții Apuseni. Cel de-al treilea grup este format numai din cele două subpopulații din Masivul Postăvarul. Un suport statistic adecvat (valori *bootstrap* > 50) s-a găsit numai pentru gruparea celor două subpopulații din Maramureș și, respectiv, pentru populația Poiana Ruscă cu subpopulația de joasă altitudine din Munții Parâng (Fig. 2-2).



**Fig. 2-2** Dendrograma UPGMA pe baza distanțelor genetice *Cavalli-Sforza* între populații de molid (numai valorile *bootstrap* peste 50% sunt raportate)

## Discuții

Nivelul diversității genetice, estimat pe bază de aloenzime, pentru populațiile de molid din Munții Carpați, este similar celui raportat pentru diferite specii de conifere (HAMRICK *et al.* 1992). Valorile pentru proporția de loci polimorfi și numărul de alele pe locus sunt foarte asemănătoare cu cele obținute pentru molid în alte studii (KRUTOVSKII și BERGMANN 1995; LAGERCRANTZ și RYMAN 1990). Valorile obținute sunt însă mai mici decât cele raportate pentru molidurile din Bucovina (TEODOSIU 2009; TEODOSIU 2011) și Carpații ucrainieni (KORSHIKOV și PRIVALIKHIN 2007). Totuși, aceste comparații trebuie tratate cu precauție pentru că, atât numărul de markeri aloenzimatici, cât și felul lor a variat de la un studiu la altul. Unele din cele cinci alele specifice unei anumite populații carpatice, ca de exemplu *Gdh-A-4* sau *Skdh-A-5*, au fost observate în alte populații de molid din Ucraina (KORSHIKOV și PRIVALIKHIN 2007) sau într-un experiment IUFRO cu proveniențe de molid (KANNENBERG și GROSS 1999).

Nivelul foarte redus de diferențiere genetică între populațiile carpatice, deși situate la distanțe considerabile una de cealaltă, poate fi explicat prin fluxul genic foarte eficient prin intermediul polenului pe distanțe mari (BURCZYK *et al.* 2004) și mărimea mare a populațiilor de molid, care face ca efectele derivei genetice să fie minime (KRUTOVSKII și BERGMANN 1995). Diferențe genetice foarte reduse între populații au fost raportate și în alte zone de areal ale molidului, precum și la alte specii de molid (GIANNINI *et al.* 1991; KORSHIKOV și PRIVALIKHIN 2007; KRAVCHENKO *et al.* 2008; LEWANDOWSKI și BURCZYK 2002). Interesant este că unul dintre locii genici care a diferențiat cel mai bine între populațiile de molid, *Pgm-A*, a dat rezultate foarte bune și în privința diferențierii între *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* (CURTU *et al.* 2011b). Chiar



dacă markerii genetici de tipul aloenzimelor sunt considerați, de regulă, neutri din punct de vedere selectiv (WHITE *et al.* 2007), faptul că variația lor reprezintă diferențe la nivel de gene funcționale, poate fi pus în legătură cu adaptarea la condiții de mediu diferite (BUSH și SMOUSE 1992).

Diversitatea genetică ridicată estimată pentru molidul din zona Munților Apuseni sugerează existența unui fost refugiu glaciatic important în zonă. Ținuturile premontane din Carpați i-au oferit molidului condiții climatice favorabile în timpul ultimei glaciațiuni, polenul de molid fiind găsit în mlaștinile de turbă din Transilvania încă din epociile târzii ale glaciațiunii Würm (POP 1954). Lipsa unor diferențe genetice între molidurile de joasă și mare altitudine a fost constatată și în Munții Alpi. Astfel, diversitatea genetică intrapopulațională nu a fost mai mică în 20 de populații din etajul boreal și subalpin din Elveția, comparativ cu populații de molid de joasă altitudine (MÜLLER-STARCK 1995). O diversitate genetică mai redusă în populația de molid de mare altitudine, comparativ cu cea de mică altitudine, a fost evidențiată de-a lungul unui profil altitudinal de pe versantul nordic al Masivului Piatra Craiului (CURTU 2003). În acest studiu au fost luați în considerare patru markeri genetici de tipul STS (*sequence-tagged-sites*). Comparatiile între perechi de populații de mică și mare altitudine ar putea fi afectate de introducerea de materiale de reproducere din alte zone geografice (CURTU *et al.* 2009b), proces care poate conduce în unele cazuri la o diminuare sau chiar creștere artificială a diversității genetice, prin amestecul provenienței locale cu material alohton.

## **Concluzii**

Populațiile carpatice de molid diferă foarte puțin în privința genelor care codifică enzime, fapt care indică existența unui schimb de gene intens. Diversitatea intrapopulațională aloenzimatică prezintă un nivel moderat, similar în mare măsură, cu valorile raportate pentru alte zone de areal. Nu s-au constatat diferențe semnificative între molidurile de mică și mare altitudine, chiar dacă în două din trei cazuri, valorile diversității au fost mai mari în populațiile de mică altitudine. Rezultatele obținute sunt utile în acțiunea de conservare a resurselor genetice de molid din România.

## 2.2 Analize genetice în populații de brad (*Abies alba* Mill.) afectate de fenomenul de uscare

### Introducere

Bradul (*Abies alba* Mill.) este cea mai pretențioasă specie față de factorii climatici și edafici, dintre coniferele autohtone. Uscăciunea, chiar și temporară, este cu greu suportată de brad. La altitudini mici, factorul climatic care limitează cel mai mult răspândirea bradului este umiditatea (STĂNESCU *et al.* 1997). Exemplarele de brad, care cresc în condiții staționale limitative, sunt afectate cu regularitate de fenomenul de deperisare, care poate conduce chiar la uscarea acestora. Existența unor perioade secetoase, întinse pe parcursul mai multor ani, cu temperaturi foarte ridicate în timpul sezonului de vegetație, coroborate cu vârsta înaintată a brădetelor și sporirea vulnerabilității exemplarelor bătrâne prin neaplicarea adecvată a lucrărilor silvotehnice sunt considerate cauzele principale ale fenomenului de deperisare/uscare (ȘOFLETEA 1995). Uscări de intensitate relativ ridicată, cauzate de stresul hidric, au afectat și bradul din zona limitrofă Șesului Bârsei (Cristian, Vulcan, Noua), aflat la limita altitudinală inferioară de răspândire (ȘOFLETEA 1995).

Disponibilitatea unor noi resurse genomice a făcut posibilă identificarea unor regiuni polimorfice de ADN, care conțin repetări de secvențe simple, în transcriptomul bradului. Astfel, recent au fost dezvoltate și caracterizate două seturi, fiecare fiind format din opt markeri genetici de tip EST-SSRs (POSTOLACHE *et al.* 2014). Scopul cercetărilor a fost testarea acestor markeri genetici de ultimă generație pe exemplare de brad sănătoase și, respectiv, afectate de fenomenul de uscare.

### Material și metode

În iunie 2014, au fost eșantionate 104 exemplare de brad situate în trei zone afectate de uscare, după secetele din anii 2012 și 2013, din pădurile limitrofe Brașovului: Răcădău, Noua și Timișul de Jos. Eșantionajul a constat din alegerea de perechi de doi arbori, din care unul este sănătos și unul afectat de fenomenul de uscare (Fig. 2-3). Arborii din aceeași pereche au avut aproximativ aceeași vârstă și au fost situați în același microhabitat, beneficiind astfel de condiții similare de creștere. Pentru scanarea genomului bradului s-au ales 14 markeri genetici, de tipul secvențelor simple repetitive (EST-SSRs), identificați și caracterizați recent în Italia (Tab. 2.-4), pe baza analizei transcriptomului bradului (POSTOLACHE *et al.* 2014).



**Fig. 2-3** Pereche de exemplare de brad eşantionate. Fiecare pereche a fost formată dintr-un arbore sănătos și unul afectat de fenomenul de uscure (Foto: Curtu AL 2014)

Izolarea ADN-ului din ace de brad (verzi sau uscate) s-a realizat cu metoda CTAB (DOYLE 1991). În vederea amplificării celor 14 markeri genetici nucleari, cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț (PCR), ADN-ul a fost diluat în proporție de 1:20. Protocolul reacției de polimerizare și condițiile de amplificare și electroforeză capilară au fost identice cu cele descrise în POSTOLACHE și colaboratorii (2014).

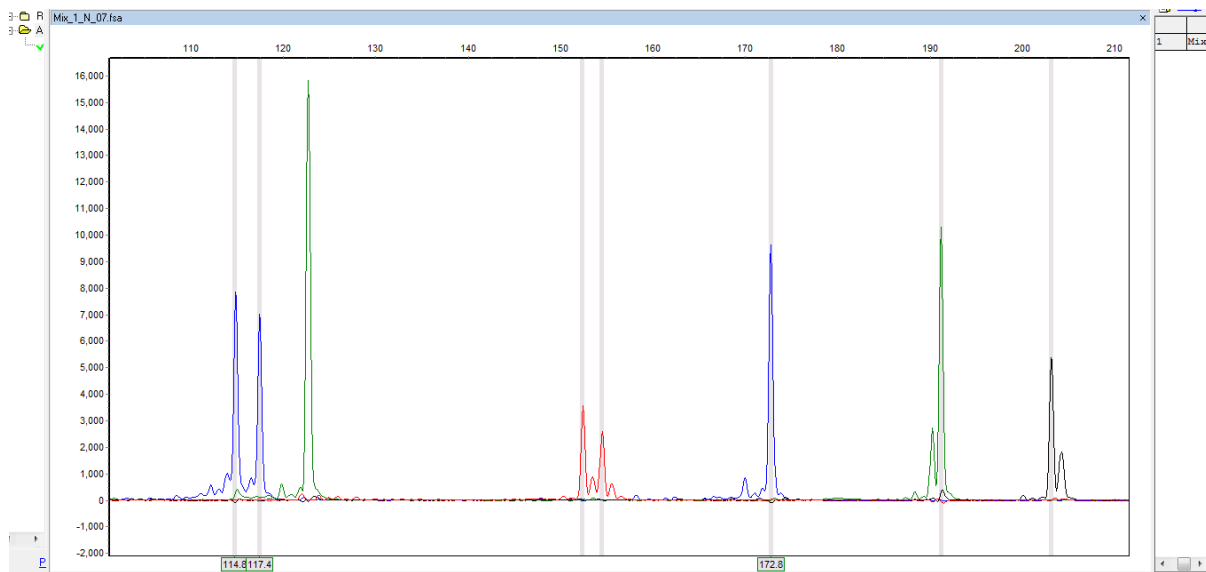
**Tabelul 2-4** Caracteristicile regiunilor de ADN analizate (după POSTOLACHE *et al.* 2014)

Denumire EST-SSR	Unitate de repetare	Lungime fragment (perechi de baze)
Aat01	(GCG) <sub>10</sub>	103-127
Aat02	(CAG) <sub>7</sub>	123-129
Aat03	(AT) <sub>9</sub>	149-161
Aat04	(CAG) <sub>11</sub>	158-191
Aat05	(GCA) <sub>7</sub>	177-192
Aat06	(GCA) <sub>8</sub>	196-214
Aat08	(AT) <sub>9</sub>	302-312

**Tabelul 2-4** (continuare) Caracteristicile regiunilor de ADN analizate

Aat09	(TCA)8	150–156
Aat10	(AT)12	226–250
Aat11	(AAC)9	255–270
Aat13	(AG)8	326–342
Aat14	(TA)9	358–394
Aat15	(AGA)8	361–373
Aat16	(GAA)7	427–430

Pentru vizualizarea electroforegramelor s-a folosit pachetul software GeneMarker version 2.4.0 (Fig. 2-4).



**Fig. 2-4** Electroforegramă obținută pentru arborele N-07, eșantionat în zona Noua și încadrat în categoria exemplarelor de brad neafectate de fenomenul de uscare. Vizualizare cu software-ul Genemarker v. 2.4.0.

Evidențierea distribuțiilor frecvențelor relative pentru fiecare EST-SSR și calculul indicilor de diversitate genetică s-a realizat cu software-ul GenAlEx versiunea 6.4 (PEAKALL și SMOUSE 2006). Testarea existenței unei structuri genetice s-a efectuat cu ajutorul programului STRUCTURE, folosind procedura *blind* și modelul frecvenței alelelor corelate (PRITCHARD *et al.*

2000). Numărul de grupuri genetice omogene a fost determinat cu metoda descrisă de EVANNO (2005) și programul STRUCTURE HARVESTER (EARL 2011).

### Rezultate și discuții

Prin compararea indicilor diversității genetice între cele două subpopulații (arbori sănătoși vs. arbori uscați) se observă că valorile acestora sunt ușor mai mari pentru colectivul arborilor sănătoși (Tab. 2-5). Astfel, arborii de brad rezistenți la factorul principal de stres, uscăciunea, prezintă o bogăție alelică mai ridicată și un grad mai mare de heterozigoție comparativ cu arborii de brad afectați de fenomenul de uscare. De asemenea, se poate observa că subpopulația arborilor sănătoși prezintă un mic exces de heterozigoți, în timp ce subpopulația de arbori afectați de fenomenul de uscare are o valoare pozitivă pentru parametrul  $F$ , și deci un exces ușor de homozigoți. Totuși, aceste diferențe rămân ne semnificative din punct de vedere statistic datorită numărului mic de exemplare luate în studiu (Tab. 2-5). O diversitate genetică mai mare pentru exemplare rezistente la un factor de stres (poluare atmosferică), comparativ cu cele sensibile, a fost evidențiată în șase arborete de fag din Germania (MÜLLER-STARCK 1989). Aceste rezultate susțin ipoteza potrivit căreia existența diversității genetice este esențială pentru supraviețuirea indivizilor unei populații.

**Tabelul 2-5** Diversitatea genetică pentru arbori sănătoși și uscați de brad

Subpopulația		Na	Ne	Ho	He	F
Arbori sănătoși	Media	3.857	1.732	0.308	0.302	-0.027
	SE	0.740	0.258	0.069	0.069	0.034
Arbori uscați	Media	3.786	1.722	0.291	0.291	0.004
	SE	0.772	0.264	0.071	0.071	0.025

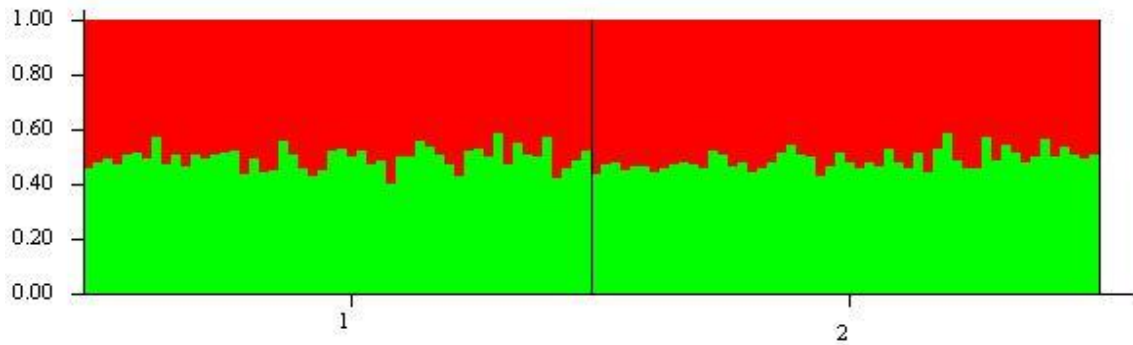
Na – numărul mediu de alele; Ne – numărul efectiv de alele; Ho – heterozigoția observată, He – diversitatea genică; F – indicele de fixare; SE – eroarea standard.

Valoarea medie a indicelui de diferențiere genetică ( $F_{ST}$ ) între cele două subpopulații este foarte redusă, de numai 0,4%. Cele mai mari diferențe între exemplarele de brad sănătoase și cele afectate de fenomenul de uscare sunt înregistrate la locii Aat02 și Aat04 (Tab. 2-6).

**Tabelul 2-6** Valorile indicelui de diferențiere genetică  $F_{ST}$ 

Locus EST-SSRs	$F_{ST}$
Aat01	0.007
Aat02	0.010
Aat08	0.002
Aat03	0.000
Aat04	0.009
Aat05	0.003
Aat06	0.005
Aat10	0.004
Aat11	0.006
Aat09	monomorf
Aat13	0.002
Aat14	0.003
Aat15	0.005
Aat16	0.002
Media	0.004
SE	0.001

Analiza celor 14 EST-SSRs nu a permis o grupare a arborilor eșantionați în raport cu fenotipul lor (sănătos/uscat). În eșantionul de 104 arbori de brad nu au fost identificate două grupuri genetice omogene, care să corespundă celor două fenotipuri. Astfel, fiecare exemplar, indiferent de colectivul din care face parte, aparține în proporții relativ egale celor două clusteruri genetice (reprezentate de culorile roșu și verde), fapt ce indică lipsa unei structuri genetice pentru  $K = 2$  (Fig. 2-5).



**Fig. 2-5** Histogramă obținută cu ajutorul programului STRUCTURE (PRITCHARD *et al.* 2000) pentru ipoteza cu două grupuri genetice omogene ( $K = 2$ ).

În concluzie, analizele bazate pe markeri genetici de ultimă generație, de tip EST-SSRs, nu au evidențiat diferențe semnificative între arborii de brad sănătoși și cei afectați de fenomenul de uscare din populații de brad de mică altitudine din zona limitrofă depresiunii Brașovului. Analize genomice, ce implică un număr foarte mare de markeri, pot constitui o cale de urmat în viitor pentru identificarea regiunilor din genomul bradului care determină o rezistență sporită la stresul hidric.

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

Generarea de cunoaștere în domeniu, prin cercetare științifică, va continua să reprezinte o componentă esențială a activității mele universitare. Implicarea activă în cercetarea fundamentală și aplicativă va facilita integrarea celor mai noi cunoștințe în conținutul disciplinelor aferente postului didactic (genetică forestieră și dendrologie). Mai mult, studenții vor avea posibilitatea efectuării de lucrări practice și își vor putea dezvolta abilitățile de cercetare într-un laborator de genetică modern.

*Evoluția profesională anterioară*

După obținerea, în anul 2006, a titlului de doctor în științe silvice la Universitatea Georg-August Göttingen din Germania, crearea unui laborator de genetică moleculară în cadrul facultății din Brașov, în care să fie realizate analize de markeri genetici, a constituit o prioritate. Dotarea laboratorului, începută în perioada 2006-2008, s-a făcut cu ajutorul unei echipe de oameni profesioniști și inimoși, care au atras și pus la dispoziție fondurile necesare achiziției de echipamente. În anul 2007 s-a reușit efectuarea primei electroforeze orizontale pe gel de amidon, ce a permis evidențierea variației la gene care codifică enzime, urmată de prima extracție de ADN și prima reacție de polimerizare în lanț (PCR). În același an s-a obținut și primul proiect într-o competiție națională – PNII-IDEI-173, *Evaluarea resurselor genetice de stejar pedunculat (Quercus robur L.) și de stejar brumăriu (Q. pedunculiflora K. Koch) cu ajutorul descriptorilor fenotipici și a markerilor genetici*, în valoare de 318.000 lei. Echipa de cercetare s-a extins prin includerea unor tineri entuziaști (studenți, masteranzi și doctoranzi) și treptat au început să apară primele rezultate obținute exclusiv pe baza analizelor efectuate în noul laborator. Astfel, prima publicație într-o revistă indexată ISI a apărut în anul 2009 (Curtu *et al.*, *Allozyme variation of coniferous tree species from Maramureș Mountains, Romania*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici 37: 245-251). În anul 2008 s-a utilizat, pentru prima dată, tehnica PCR-RFLPs și electroforeza verticală pe geluri de poliacrilamidă pentru determinarea variației la nivelul ADN-ului cloroplastic. A urmat prima analiză de fragment (microsateliți) și secvențiere ADN prin electroforeză capilară. Toate aceste progrese tehnologice au constituit un avantaj în accesarea de noi fonduri. Astfel, în anul 2010, am obținut un alt proiect într-o competiție națională (Programul Resurse Umane – Tinere Echipe), în valoare 750.000 lei. Titlul proiectului a fost: *Cercetări privind hibridarea naturală în complexul de specii Quercus din România (TE-73)*. O nouă



generație de echipamente pentru laboratorul de genetică, care a permis eficientizarea unor protocoale de lucru, a fost achiziționată în anul 2011 în cadrul proiectului PRO-DD.

Începând cu anul 2009 au fost publicate 15 articole în reviste cotate ISI din domeniul *Forestry* și *Plant Sciences*, ce conțin rezultate obținute în proiectele proprii sau prin colaborări cu colective de cercetare din străinătate. Recunoașterea activității de cercetare științifică este dată de: numărul de citări (peste 200 în reviste cotate ISI și peste 400 în Google Scholar), includerea în colectivul editorial al unor reviste științifice românești cotate ISI (Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, Annals of Forest Research), calitatea de referent științific la 16 reviste de mare prestigiu internațional (cel puțin o recenzie pentru: Forest Ecology and Management, Tree Genetics & Genomes, Canadian Journal of Botany, European Journal of Forest Research, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, Annals of Forest Research, International Journal of Plant Sciences, Dendrobiology, Conservation Genetics, Evolutionary Ecology, Botanical Journal of the Linnean Society, Annals of Botany, Plant Systematics and Evolution, iForest, DNA Research, Annals of Forest Science), nominalizarea ca expert evaluator în numeroase competiții interne și internaționale (Horizon 2020).

În perioada 2007-2015 am fost implicat în activitatea de conservare a resurselor genetice la nivel european (rețeaua EUFROGEN), coordonarea la nivel național a trei acțiuni în cadrul programului de Cooperare în Știință și Tehnologie (COST) - *Biosafety of Forest Transgenic Trees; Strengthening conservation: a key issue for adaptation of marginal/peripheral populations of forest tree to climate change in Europe* (MaP-FGR), *Non-native tree species for European forests - experiences, risks and opportunities* (NNEXT). Am susținut lucrări la conferințe internaționale în Germania, Elveția, Austria, România, Coreea de Sud, Argentina, Franța, SUA și Africa de Sud. Am ținut prelegeri în calitate de invitat sau în cadrul stagiilor de cercetare la BFW Viena, Universitatea Georg-August Göttingen și Universitatea de Științe Agricole din Florența. Am coordonat peste 50 de proiecte de diplomă/lucrări de disertație și am fost referent științific pentru 11 teze de doctorat susținute la: Universitatea Transilvania din Brașov, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca și Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului din Timișoara. În anul 2014 am fost ales membru corespondent al secției de Silvicultură din cadrul Academiei de Științe Agricole și Silvice "Gheorghe Ionescu-Sisești". Din anul 2015 fac parte din Governing Board al EVOLTREE (EVOLution of TREEs as drivers of terrestrial biodiversity – [www.evoltree.eu](http://www.evoltree.eu)) și din Consiliul Național al Cercetării Științifice (CNCS).

În anul 2010, am obținut prin competiție internațională, în calitate de director de proiect, un proiect care a vizat înființarea unui parteneriat educațional transatlantic (Managing and

Conserving Forests for Multiple Values) ce a pus bazele unui schimb de studenți și profesori între facultăți de Silvicultură din Uniunea Europeană (Brașov, Praga și Goettingen) și Canada (Alberta, Vancouver și Laval). Peste 100 de studenți și profesori au beneficiat în perioada 2011-2013 de mobilități de scurtă și lungă durată în cadrul acestui proiect finanțat de Comisia Europeană. Tot în plan didactic, s-au adus contribuții importante prin publicarea a cinci cărți/capitole de cărți și elaborarea de suporturi de curs, în format electronic, pentru toate disciplinele predate. Din anul 2015 am activat ca expert al ARACIS, iar din aprilie 2012, am răspuns, în calitate de decan, de conducerea Facultății de Silvicultură și Exploatarea Forestiere.

### *Planuri de dezvoltare*

În ultimii ani, tehnicile moleculare folosite în genetică (genomică) au cunoscut un avans substanțial, care face posibilă analiza unui volum mare de date la costuri relativ scăzute. Aceste progrese tehnologice permit abordarea unor noi teme de cercetare, de mare interes atât pentru comunitatea științifică, cât și pentru practica silvică. În condițiile alocării unor fonduri reduse în competițiile naționale, se va urmări atragerea de finanțări de la unitățile de administrație silvică, prin cercetări care să răspundă unor nevoi actuale ale producției (de ex. identificarea unor exemplare rezistente la factorii de stres, controlul transferului de materiale forestiere de reproducere, identificarea pe cale genetică a cultivarelor și clonelor de plop și salcie din țara noastră); un exemplu elocvent în acest domeniu de preocupări este participarea în colectivul mixt Facultate-INCDS „*Marin Drăcea*” (Stațiunea Brașov) la proiectul de înființare a unei livezi semincere de stejar brumăriu, destinat producerii de sămânță genetic ameliorată.

Un obiectiv major pentru perioada următoare este consolidarea și lărgirea echipei de cercetare, atât de necesare pentru obținerea unor rezultate valoroase. Calitatea de a îndruma doctoranzi și postdoctoranzi va facilita integrarea în echipă a unor tineri valoroși, care vor dobândi în timp abilități de cercetător în domeniul geneticii și al aplicațiilor acesteia în silvicultură. În acest context, consider că am acumulat deja o bogată experiență în calitate de membru în colectivul de îndrumare a tezelor de doctorat de genetică moleculară elaborate în facultate. Se va urmări invitarea de experți recunoscuți pe plan internațional în cadrul comisiilor de doctorat și îndrumarea de doctoranzi în cotutelă cu profesori din străinătate.

Inițierea și/sau dezvoltarea parteneriatelor cu laboratoare de prestigiu din domeniul geneticii forestiere (INRA, CNR, BFW etc.) constituie o altă direcție de dezvoltare, mai ales că primele contacte cu institute prestigioase au fost deja stabilite. Prin colaborări cu cercetători ce abordează subiecte foarte complexe, multidisciplinare (aici este viitorul!), de la frontierele cunoașterii,

membrii grupei de cercetare vor avea acces la tehnologiile de ultimă generație și vor putea obține rezultate semnificative. Prin astfel de colaborări, echipa de cercetare va putea să publice în cele mai prestigioase reviste științifice.

Se va urmări cu precădere publicarea rezultatelor în reviste de top din categoria *Forestry* și *Plant Sciences*. Nu se va face rabat de la regulile de etică în cercetare și publicare. Rezultatele cercetărilor aplicative vor fi popularizate în reviste profesionale de tradiție. Implicarea studenților din ciclurile de licență și masterat în activitatea de cercetare științifică, prin abordarea unor teme de actualitate în cadrul proiectelor de diplomă și lucrărilor de disertație, va fi o direcție importantă de dezvoltare. Voi continua să particip activ ca referent la manifestările științifice de profil din țară și străinătate, jurnale științifice de prestigiu și în colegiul editorial al revistelor românești indexate ISI (*Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* și *Annals of Forest Research*). Creșterea vizibilității și calității lucrărilor publicate în *Bulletin of Transilvania University of Brasov, series II Forestry* (indexat în prezent în baza de date Scopus) va fi, de asemenea, o prioritate.

Direcțiile de cercetare pentru perioada imediat următoare se vor baza pe noile tehnologii de genotipare și instrumente analitice și vor viza:

- continuarea investigațiilor privind dinamica fenomenului de hibridare naturală și procesul de speciație ecologică în cazul speciilor de stejari autohtoni (complexul *Q. robur* - *Q. pedunculiflora*);
- analiza populațiilor marginale/periferice și izolate, situate la limita altitudinală inferioară de răspândire în țara noastră. Aceste populații sunt supuse unei presiuni selective puternice, fluxul genic dinspre centrul arealului fiind restricționat, și se presupune că adăpostesc exemplare cu potențial adaptativ ridicat;
- determinarea structurii și diversității genetice la principalele specii de interes cinegetic din țară noastră. Datele genetice sunt deosebit de utile pentru fundamentarea măsurilor de management cinegetic și a strategiei de conservare (de ex. pentru carnivore mari).

În plan didactic, accentul în cadrul orelor de curs și laborator va fi pus pe înțelegerea și utilizarea corectă a noțiunilor și conceptelor specifice, pe raționament și analogii, astfel încât să se evite memorarea inutilă a unor formule matematice sau descrieri. Se vor discuta situații și probleme reale, cu care studenții se vor confrunta în activitatea profesională viitoare, și modul în care acestea pot fi soluționate. Orele de predare vor fi interactive iar studenții vor fi încurajați să pună întrebări, pentru că rolul întrebării în procesul de învățare este fundamental. Atmosfera în cadrul orelor de predare va fi una deschisă și prietenoasă, tocmai pentru a stimula întrebările și discuțiile pe tematica cursurilor. În cadrul orelor de aplicații practice se va pune accentul pe

lucrul în grupuri mici, în vederea dezvoltării abilităților de colaborare în rezolvarea unei probleme. Relația profesor-student va fi una bazată pe comunicare, iar evaluarea studenților se va face în mod transparent.

Folosirea tehnologiei și resurselor electronice în actul de predare reprezintă o necesitate. Xavier Prats Monne, directorul general adjunct al Directoratului General pentru Educație și Cultură din cadrul Comisiei Europene, afirma recent că impactul masiv al tehnologiei asupra metodelor folosite în educație a generat un adevărat *tsunami* iar cei care nu se vor adapta vor dispărea din peisajul educațional. Se impune astfel utilizarea într-o mai mare măsură a platformei de *e-learning* și a unor forumuri de discuții, care să faciliteze activitățile didactice. Se vor utiliza în continuare prezentările pe bază de proiecții (PowerPoint), prin care studenților li se pot prezenta imagini și grafice sugestive, care ilustrează foarte bine conținutul cursurilor. La finalul fiecărui curs se va face o scurtă recapitulare a celor mai importante noțiuni și idei discutate. De asemenea, la începutul cursului se va face o scurtă trecere în revistă a principalelor aspecte prezentate în prelegerea anterioară.

Invitarea unor specialiști recunoscuți în domeniu, din țară și străinătate, pentru susținerea de prelegeri pe teme specifice disciplinelor predate constituie un alt aspect important ce vizează creșterea atractivității și calității cursurilor. Dezvoltarea legăturilor cu alte grupuri de profil de la universitățile din țară și din străinătate va conduce la armonizarea și îmbunătățirea conținutului cursurilor predate în cadrul programelor de studii din domeniul Silvicultură.

Elaborarea de manuale, care să încorporeze cele mai noi realizări în domeniul extrem de dinamic și interesant care este genetica (profesorul FW Nicholas afirma recent: "Can there ever been a more exciting time to study genetics?"), reprezintă o altă prioritate pentru următorii ani. Se are în vedere, în principal, introducerea unui capitol privind genomica structurală, funcțională și comparativă la speciile de arbori, precum și prezentarea unor noțiuni de bază privind *next-generation sequencing*, interferența ARN, analiza SNP și aplicațiile acestor tehnologii în silvicultură. Intenționez, de asemenea, să elaborez un set de exerciții pe baza datelor genetice obținute în proiectele de cercetare pe care le-am coordonat în ultimii ani. Aceste exerciții vor contribui la o mai bună înțelegere și o aplicare corectă a conceptelor prezentate în partea de curs.

Cursul de genetică forestieră va cuprinde capitole de genetică moleculară, citogenetică, genetica transmiterii caracterelor, genetica populațiilor și genetică cantitativă. Exemplele care vin să susțină aspectele teoretice ale geneticii vor fi despre speciile de arbori. Un mai mare accent se va pune pe partea de aplicații ale geneticii în silvicultură: ameliorare și conservare. Realizarea unor parteneriate cu Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Silvicultură "Marin Drăcea" și unități silvice, în vederea elaborării de proiecte de diplomă/lucrări de disertație pe teme de

interes comun în domeniul geneticii moleculare și cantitative, va constitui o altă direcție de dezvoltare. În plus față de activitățile de predare/evaluare și îndrumare de proiecte de diplomă/lucrări de disertație mă voi implica activ și în organizarea de workshopuri și școli naționale/internaționale de vară pentru studenți și tineri cercetători (de ex. în cadrul rețelei de excelență Evoltree).

În final, dar nu în cele din urmă, doresc o colaborare foarte bună cu toți colegii din facultate, din Universitatea Transilvania, din alte universități, institute și centre de cercetare din țară și străinătate, atât în ceea ce privește activitatea de cercetare științifică, cât și activitatea didactică, această colaborare fiind o premisă importantă pentru îndeplinirea planurilor de evoluție și dezvoltare enunțate în acest ultim capitol al tezei de abilitare.

**(B-iii) Bibliografie**

- AAS, G., 1991 Kreuzungsversuche mit Stiel- und Traubeneichen (*Q. robur* L. und *Q. petraea* (Matt.) Liebl.). Allgemeine Forst- und Jagdzeitung **162**: 141-145.
- BACILIERI, R., A. DUCOUSSO and A. KREMER, 1995 Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in a mixed stand of Northwest of France. Silvae Genetica **44**: 1-10.
- BACILIERI, R., T. LABBE and A. KREMER, 1994 Intraspecific genetic structure in a mixed population of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. Heredity **73**: 130-141.
- BELLETTI, P., S. LEONARDI, I. MONTELEONE and P. PIOVANI, 2005 Allozyme variation in different species of deciduous oaks from northwestern Italy. Silvae Genetica **54**: 9-16.
- BERG, E. E., and J. L. HAMRICK, 1995 Fine-scale genetic-structure of a Turkey oak forest. Evolution **49**: 110-120.
- BERGMANN, F., and H. H. HATTEMER, 1998 Isozymes in forest genetic research, pp. 227-238 in *Forest Genetics and Tree Breeding*, edited by A. K. MANDAL and G. L. GIBSON. CBS Publishers and Distributors, New Delhi.
- BLADA, I., and F. POPESCU, 2007 Swiss stone pine provenance experiment in Romania: II. variation in growth and branching traits to age 14. Silvae Genetica **56**: 148-158.
- BORDÁCS, S., F. POPESCU, D. SLADE, U. CSAIKL, I. LESUR *et al.*, 2002 Chloroplast DNA variation of white oaks in the northern Balkans and in the Carpathian Basin. Forest Ecology and Management **156**: 197-209.
- BORN, C., O. J. HARDY, M.-H. CHEVALLIER, S. OSSARI, C. ATTEKE *et al.*, 2008 Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. Molecular Ecology **17**: 2041-2050.
- BOROVICS, A., and C. MÁTYÁS, 2013 Decline of genetic diversity of sessile oak at the retracting (xeric) limits. Annals of Forest Science **70**: 835-844.
- BORZA, A., 1936 *Quercus pedunculiflora*, un nou stejar din Romania. Bul. Grad. Bot. si al Muzeului Bot. de la Univ. Cluj **XVI**: 55-62.
- BROSHTILOV, K., 2006 *Quercus robur* L. leaf variability in Bulgaria. Plant Genetic Resources Newsletter: 64-71.

- BRUSCHI, P., G. G. VENDRAMIN, F. BUSSOTTI and P. GROSSONI, 2000 Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *Annals of Botany* **85**: 325-333.
- BURCZYK, J., A. LEWANDOWSKI and W. CHALUPKA, 2004 Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Forest Ecology and Management* **197**: 39-48.
- BURGER, W. C., 1975 The species concept in *Quercus*. *Taxon* **24**: 45-50.
- BUSH, R. M., and P. E. SMOUSE, 1992 Evidence for the adaptive significance of allozymes in forest trees. *New Forests* **6**: 179-196.
- CARLSSON, J., 2008 Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* **99**: 616-623.
- CAVERS, S., B. DEGEN, H. CARON, M. R. LEMES, R. MARGIS *et al.*, 2005 Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity* **95**: 281-289.
- CHESNOIU, E. N., N. SOFLETEA, A. L. CURTU, A. TOADER, R. RADU *et al.*, 2009 Bud burst and flowering phenology in a mixed oak forest from Eastern Romania. *Annals of Forest Research* **52**: 199-206.
- CHUNG, M. Y., B. K. EPPERSON and M. GI CHUNG, 2003 Genetic structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae). *Evolution* **57**: 62-73.
- CIOCÂRLAN, V., 2000 *Flora ilustrată a României*. Editura Ceres, București.
- COTTRELL, J. E., R. C. MUNRO, H. E. TABBENER, A. D. MILNER, G. I. FORREST *et al.*, 2003 Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history. *Forest Ecology and Management* **176**: 287-303.
- CRĂCIUNESC, I., B. VORNAM, L. LEINEMANN, R. FINKELDEY, N. ȘOFLETEA *et al.*, 2015 High genetic differentiation among European white oak species (*Quercus* spp.) at a dehydrin gene. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* **43**: 582-588.
- CRAFT, K. J., M. V. ASHLEY and W. D. KOENIG, 2002 Limited hybridization between *Quercus lobata* and *Quercus douglasii* (Fagaceae) in a mixed stand in central coastal California. *American Journal of Botany* **89**: 1792-1798.
- CURTU, A. L., 2003 Cercetari privind variabilitatea genetica a molidului [*Picea abies* (L.) Karst.] realizate cu ajutorul markerilor ADN. *Revista Padurilor* **3**: 10-15.
- CURTU, A. L., I. CRACIUNESC, C. ENESCU, A. VIDALIS and N. SOFLETEA, 2015 Fine-scale spatial genetic structure in a multi-oak-species (*Quercus* spp.) forest. *iForest - Biogeosciences and Forestry* **8**: 324-332.

- CURTU, A. L., O. GAILING and R. FINKELDEY, 2007a Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 218.
- CURTU, A. L., O. GAILING and R. FINKELDEY, 2009a Patterns of contemporary hybridization inferred from paternity analysis in a four-oak-species forest. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 284.
- CURTU, A. L., O. GAILING, L. LEINEMANN and R. FINKELDEY, 2007b Genetic variation and differentiation within a natural community of five oak species (*Quercus* spp.). *Plant Biology* **9**: 116-126.
- CURTU, A. L., I. C. MOLDOVAN, M. C. ENESCU, I. CRĂCIUNESC and N. SOFLETEA, 2011a Genetic differentiation between *Quercus frainetto* Ten. and *Q. pubescens* Willd. in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* **39**: 275-282.
- CURTU, A. L., N. SOFLETEA, R. RADU, A. BACEA, I. V. ABRUDAN *et al.*, 2009b Allozyme variation of coniferous tree species from Maramures Mountains, Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* **37**: 245-251.
- CURTU, A. L., N. SOFLETEA, A. TOADER, I. C. MOLDOVAN, M. ENESCU *et al.*, 2009c Stejarul brumariu: specie sau unitate intraspecifica a stejarului pedunculat. *Revista Padurilor* **5**: 24-30.
- CURTU, A. L., N. SOFLETEA, A. V. TOADER and M. C. ENESCU, 2011b Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus robur* L. and its closest relative, the drought tolerant *Quercus pedunculiflora* K. Koch. *Annals of Forest Science* **68**: 1163-1172.
- DANCIU, M., and D. PARASCAN, 2002 *Botanică forestieră*. Editura Pentru Viață, Brasov.
- DAVIS, P. H., 1965 *Flora of Turkey and the East Aegean Island*. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- DE QUEIROZ, K., 2007 Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* **56**: 879-886.
- DEMASURE, B., N. SODZI and R. PETIT, 1995 A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* **4**: 129-131.
- DONIȚĂ, N., T. GEAMBAȘU and R. R. BRAD, 2004 *Dendrologie*. Editura Vasile Goldis, Arad.
- DOUNAVI, A., N. KOUTSIAS, M. ZIEHE and H. HATTEMER, 2010 Spatial patterns and genetic structures within beech populations (*Fagus sylvatica* L.) of forked and non-forked individuals. *European Journal of Forest Research* **129**: 1191-1202.
- DOW, B. D., and M. V. ASHLEY, 1998 High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity* **89**: 62-70.



- DOW, B. D., M. V. ASHLEY and H. F. HOWE, 1995 Characterization of highly variable (GA/CT)<sub>n</sub> microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theoretical and Applied Genetics* **91**: 137-141.
- DOYLE, J., 1991 DNA protocols for plants, pp. 283-293 in *Molecular techniques in taxonomy*. Springer.
- DUCOUSSO, A., H. MICHAUD and R. LUMARET, 1993 Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. *Annales des Sciences Forestières* **50**: 91s-106s.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S., B. DEMESURE, S. FINESCHI, V. LE CORRE and R. PETIT, 1997 Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* **146**: 1475-1487.
- DURAND, J., C. BODENES, E. CHANCEREL, J.-M. FRIGERIO, G. VENDRAMIN *et al.*, 2010 A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC Genomics* **11**: 570.
- DUTCĂ, I., I. V. ABRUDAN, P. T. STANCIOIU and V. BLUJDEA, 2010 Biomass Conversion and Expansion Factors for Young Norway Spruce (*Picea abies* (L) Karst) Trees Planted on Non-Forest Lands in Eastern Carpathians. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **38**: 286-292.
- EARL, D. A., 2011 Structure harvester v0.6. Available at [http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/).
- EL MOUSADIK, A., and R. J. PETIT, 1996 High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **92**: 832-839.
- ENESCU, C. M., A. L. CURTU and N. SOFLETEA, 2013 Is *Quercus virgiliana* a distinct morphological and genetic entity among European white oaks? *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **37**: 632-641.
- ENESCU, V., and L. CONTESCU, 1984 *Teste de descendențe în faza de pepinieră la molid din rezervații de semințe*. ICAS.
- ENNOS, R., W. SINCLAIR, X. HU and A. LANGDON, 1999 Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. *Systematics association special volume* **57**: 1-19.
- EPPERSON, B. K., 1992 Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. *New Forests* **6**: 257-278.
- EVANNO, G., S. REGNAUT and J. GOUDET, 2005 Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.

- EXCOFFIER, L., G. LAVAL and S. SCHNEIDER, 2005 Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- FALUSH, D., M. STEPHENS and J. K. PRITCHARD, 2003 Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.
- FARCAS, S., F. POPESCU and I. TANTAU, 2006 Dinamica spatiala si temporală a stejarului, frasinului si carpenului in timpul Tardi- si Postglaciarului pe teritoriul Romaniei. Presa Universitara Clujeana, Cluj-Napoca.
- FINKELDEY, R., 2001 Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 1. Allelic diversity and differentiation at isozyme gene loci. *Forest Genetics* **8**: 185-195.
- FORTINI, P., V. VISCOSI, L. MAIURO, S. FINESCHI and G. G. VENDRAMIN, 2009 Comparative leaf surface morphology and molecular data of five oaks of the subgenus *Quercus* Oerst (Fagaceae). *Plant Biosystems* **143**: 543 - 554.
- GAILING, O., and A. L. CURTU, 2014 Interspecific gene flow and maintenance of species integrity in oaks. *Annals of Forest Research* **57**: 5-18.
- GAILING, O., H. WACHTER, H.-P. SCHMITT, A. L. CURTU and R. FINKELDEY, 2007 Characterization of different provenances of Slavonian oaks (*Quercus robur* L.) in Münsterland (Germany) with chloroplast DNA markers: PCR-RFLPs and chloroplast microsatellites. *Allgemeine Forst und Jagdzeitung* **178**: 85-90.
- GEBUREK, T., 1999 Genetic variation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) populations in Austria. III. Macrospatial allozyme patterns of high elevation populations. *Forest Genetics* **6**: 201-211.
- GEORGESCU, C. C., and P. CRETZOIU, 1941 Consideratiuni sistematice asupra speciei *Quercus pedunculiflora* K. Koch. in Romania. *Analele ICAS* **7**: 3-37.
- GEORGESCU, C. C., I. LUPE and P. CRETZOIU, 1942 Raspandirea stejarului brumariu (*Quercus pedunculiflora* C. Koch). *Analele ICAS* **8**: 165-172.
- GEORGESCU, C. C., and J. MORARIU, 1948 *Monografia stejarilor din România*. Universul, Bucuresti.
- GIANNINI, R., M. MORGANTE and G. G. VENDRAMIN, 1991 Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genetica* **40**: 160-166.
- GÖMÖRY, D., R. LONGAUER, L. PAULE, D. KRAJEROVÁ and J. SCHMIDTOVÁ, 2010 Across-species patterns of genetic variation in forest trees of Central Europe. *Biodiversity and Conservation* **19**: 2025-2038.

- GOMORY, D., L. PAULE, I. M. SHVADCHAK, F. POPESCU, M. SULKOWSKA *et al.*, 2003 Spatial patterns of the genetic differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) at allozyme loci in the Carpathians and the adjacent regions. *Silvae Genetica* **52**: 78-83.
- GÖMÖRY, D., and J. SCHMIDTOVA, 2007 Extent of nuclear genome sharing among white oak species (*Quercus* L. subgen. *Lepidobalanus* (Endl.) Oerst.) in Slovakia estimated by allozymes. *Plant Systematics and Evolution* **266**: 253-264.
- GONZALEZ-QUEVEDO, C., L. G. SPURGIN, J. C. ILLERA and D. S. RICHARDSON, 2015 Drift, not selection, shapes toll-like receptor variation among oceanic island populations. *Molecular Ecology* **24**: 5852-5863.
- GOUDET, J., 1995 FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485-486.
- GOUDET, J., 2001 FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995), pp.
- GREGORIUS, H.-R., 1991 Gene conservation and the preservation of adaptability, pp. 31-47 in *Species Conservation: A Population-Biological Approach*, edited by A. SEITZ and V. LOESCHCKE. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- GUICHOUX, E., L. LAGACHE, S. WAGNER, P. LEGER and R. J. PETIT, 2011 Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology Resources* **11**: 578-585.
- HAMPE, A., L. EL MASRI and R. J. PETIT, 2010 Origin of spatial genetic structure in an expanding oak population. *Molecular Ecology* **19**: 459-471.
- HAMRICK, J. L., and M. J. W. GODT, 1989 Allozyme diversity in plant species, pp. 43-63 in *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*, edited by A. H. D. BROWN, M. T. CLEGG, A. L. KAHLER and B. S. WEIR. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- HAMRICK, J. L., M. J. W. GODT and S. L. SHERMAN-BROYLES, 1992 Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* **6**: 95-124.
- HARDY, O. J., 2009 How fat is the tail? *Heredity* **103**: 437-438.
- HARDY, O. J., and X. VEKEMANS, 2002 SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**: 618-620.
- HATTEMER, H. H., and H.-R. GREGORIUS, 1990 Is gene conservation under global climate change meaningful?, pp. 158-166 in *Climate Change and Genetic Resources*, edited by M. T. JACKSON, B. V. FORD-LLOYD and M. J. PARRY. Belhaven Press, London.

- HEUERTZ, M., X. VEKEMANS, J. F. HAUSMAN, M. PALADA and O. J. HARDY, 2003 Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular Ecology* **12**: 2483-2495.
- HEY, J., 2006 Recent advances in assessing gene flow between diverging populations and species. *Current Opinion in Genetics & Development Genomes and evolution* **16**: 592-596.
- HOEBEE, S. E., C. MENN, P. ROTACH, R. FINKELDEY and R. HOLDEREGGER, 2006 Spatial genetic structure of *Sorbus torminalis*: The extent of clonal reproduction in natural stands of a rare tree species with a scattered distribution. *Forest Ecology and Management* **226**: 1-8.
- HOSIUS, B., 1993 Wird die genetische Struktur eines Fichtenbestandes von Durchforstungseingriffen beeinflusst? *Forst und Holz* **48**: 306-308.
- HU, J., L. WANG and J. LI, 2011 Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. *Biologia Plantarum* **55**: 577-580.
- HUSSENDÖRFER, E., 1996 Wird "Biodiversität" durch eine künstliche Bestandesbegründung beeinflusst?, pp. 160-176 in *Biodiversität und nachhaltige Forstwirtschaft*, edited by G. MÜLLER-STARCK. ecomed, Landsberg.
- INGRAM, J., and D. BARTELS, 1996 The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology* **47**: 377-403.
- JENSEN, J., A. LARSEN, L. R. NIELSEN and J. COTTRELL, 2009 Hybridization between *Quercus robur* and *Q. petraea* in a mixed oak stand in Denmark. *Ann. For. Sci.* **66**: 706.
- JENSEN, J. S., D. C. OLRİK, H. R. SIEGISMUND and A. J. LOWE, 2003 Population genetics and spatial autocorrelation in an unmanaged stand of *Quercus petraea* in Denmark. *Scandinavian Journal of Forest Research* **18**: 295-304.
- KALISZ, S., J. D. NASON, F. M. HANZAWA and S. J. TONSOR, 2001 Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution* **55**: 1560-1568.
- KAMPFER, S., C. LEXER, J. GLÖSSL and H. STEINKELLNER, 1998 Characterization of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* **129**: 183-186.
- KANNENBERG, N., and K. GROSS, 1999 Allozymic variation in some Norway spruce populations of the International IUFRO provenance-testing programme of 1964/1968. *Silvae Genetica* **48**: 209-217.
- KIMMINS, J., 2004 *Forest Ecology: A Foundation for Sustainable Forest Management and Environmental Ethics in Forestry*. Prentice Hall.
- KLEINSCHMIT, J., 1993 Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Annales des Sciences Forestières* **50**: 166s-185s.

- KLEINSCHMIT, J. R. G., A. KREMER and A. ROLOFF, 1995 Sind Stieleiche und Traubeneiche zwei getrennte Arten? Allgemeine Forstzeitschrift/Der Wald **26**: 1453-1456.
- KONNERT, M., and M. WERNER, 2004 Isoenzymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies*) - Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme -, pp. 1-22. Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP).
- KORSHIKOV, I. I., and S. N. PRIVALIKHIN, 2007 Genetic structure of populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) from Ukrainian Carpathians. Russian Journal of Genetics **43**: 1364-1372.
- KOSOVÁ, K., P. VÍTÁMVÁS and I. PRÁŠIL, 2007 The role of dehydrins in plant response to cold. Biologia Plantarum **51**: 601-617.
- KRAVCHENKO, A., A. Y. LARIONOVA and L. MILYUTIN, 2008 Genetic polymorphism of siberian spruce (*Picea obovata* ledeb.) in middle Siberia. Russian Journal of Genetics **44**: 35-43.
- KREMER, A., J. L. DUPOUEY, J. D. DEANS, J. COTTRELL, U. CSAIKL *et al.*, 2002 Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. Annals of Forest Science **59**: 777-787.
- KRUTOVSKII, K. V., and F. BERGMANN, 1995 Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. **74**: 464-480.
- LAGACHE, L., E. K. KLEIN, E. GUICHOUX and R. J. PETIT, 2013 Fine-scale environmental control of hybridization in oaks. Molecular Ecology **22**: 423-436.
- LAGERCRANTZ, U., and N. RYMAN, 1990 Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. Evolution **44**: 38-53.
- LANGELLA, O., 2000 POPULATIONS 1.2.19: population genetic software, individuals or population distances, phylogenetic trees. Available at <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations>., pp.
- LEPAIS, O., V. LEGER and S. GERBER, 2006 High throughput microsatellite genotyping in oak species. Silvae Genetica **55**: 238-240.
- LEPAIS, O., R. J. PETIT, E. GUICHOUX, J. E. LAVABRE, F. ALBERTO *et al.*, 2009 Species relative abundance and direction of introgression in oaks. Molecular Ecology **18**: 2228-2242.
- LEWANDOWSKI, A., and J. BURCZYK, 2002 Allozyme variation of *Picea abies* in Poland. Scandinavian Journal of Forest Research **17**: 487-494.
- LEXER, C., A. KREMER and R. J. PETIT, 2006 Shared alleles in sympatric oaks: recurrent gene flow is a more parsimonious explanation than ancestral polymorphism. Molecular Ecology **15**: 2007-2012.

- LIND, J., and O. GAILING, 2013 Genetic structure of *Quercus rubra* L. and *Quercus ellipsoidalis* E. J. Hill populations at gene-based EST-SSR and nuclear SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*: 1-16.
- LITT, M., and J. A. LUTY, 1989 A hypervariable microsatellite revealed by invitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* **44**: 397-401.
- LOISELLE, B. A., V. L. SORK, J. NASON and C. GRAHAM, 1995 Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **82**: 1420-1425.
- LUNA, R., B. K. EPPERSON and K. OYAMA, 2005 Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. *Heredity* **95**: 298-305.
- LUO, J., Y. WANG, H. KORPELAINEN and C. LI, 2005 Allozyme variation in natural populations of *Picea asperata*. *Silva Fennica* **39**: 167-176.
- MARQUARDT, P. E., C. S. ECHT, B. K. EPPERSON and D. M. PUBANZ, 2007 Genetic structure, diversity, and inbreeding of eastern white pine under different management conditions. *Canadian Journal of Forest Research* **37**: 2652-2662.
- MARQUARDT, P. E., and B. K. EPPERSON, 2004 Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology* **13**: 3305-3315.
- MAXIMILIAN, C., and D. M. IOAN, 1984 *Dicționar enciclopedic de genetică*. Editura Științifică și Pedagogică, București.
- MAYR, E., 1942 *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- MENITSKY, Y. L., 2005 *Oaks of Asia*. Science Publishers.
- MIHAI, G., N. SOFLETEA, A. L. CURTU, G. PARNUTA, L. IONITA *et al.*, 2008 Evaluari privind variatia genetica a principalelor specii de arbori forestieri din Romania, in vederea stabilirii surselor de seminte testate. *Revista Padurilor* **4**: 3-11.
- MOLDOVAN, I. C., N. SOFLETEA, A. L. CURTU, I. V. ABRUDAN, D. POSTOLACHE *et al.*, 2010 Chloroplast DNA diversity of oak species in Eastern Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj* **38**: 301-307.
- MUIR, G., C. C. FLEMING and C. SCHLÖTTERER, 2000 Species status of hybridizing oaks. *Nature* **405**: 1016.
- MUIR, G., and C. SCHLÖTTERER, 2005 Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology* **14**: 549-561.
- MÜLLER-STARCK, G., 1989 Genetic implications of environmental stress in adult forest stands of *Fagus sylvatica* L., pp. 127-142 in *Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree*

- Populations*, edited by F. SCHOLZ, H.-R. GREGORIUS and D. RUDIN. Springer, Berlin, Heidelberg, etc.
- MÜLLER-STARCK, G., 1995 Genetic variation of high elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Switzerland. *Silvae Genetica* **44**: 356-362.
- MÜLLER-STARCK, G., A. ZANETTO, A. KREMER and S. HERZOG, 1996 Inheritance of isoenzymes in sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) and offspring from interspecific crosses. *Forest Genetics* **3**: 1-12.
- NEOPHYTOU, C., F. ARAVANOPOULOS, S. FINK and A. DOUNAVI, 2011 Interfertile oaks in an island environment. II. Limited hybridization between *Quercus alnifolia* Poech and *Q. coccifera* L. in a mixed stand. *European Journal of Forest Research*: 1-13.
- NEOPHYTOU, C., F. A. ARAVANOPOULOS, S. FINK and A. DOUNAVI, 2010 Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forest Ecology and Management* **259**: 2026-2035.
- PAETKAU, D., W. CALVERT, I. STIRLING and C. STROBECK, 1995 Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* **4**: 347-354.
- PAFFETTI, D., D. TRAVAGLINI, A. BUONAMICI, S. NOCENTINI, G. G. VENDRAMIN *et al.*, 2012 The influence of forest management on beech (*Fagus sylvatica* L.) stand structure and genetic diversity. *Forest Ecology and Management* **284**: 34-44.
- PÂRNUȚĂ, G. (Editor), 2010 *Genetica și ameliorarea arborilor*. Editura Silvică.
- PEAKALL, R., and P. E. SMOUSE, 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.
- PEÑALOZA-RAMÍREZ, J. M., A. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, L. MENDOZA-CUENCA, H. CARON, A. KREMER *et al.*, 2010 Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. *Annals of Botany* **105**: 389-399.
- PETIT, R., S. BREWER, S. BORDÁCS, K. BURG, R. CHEDDADI *et al.*, 2002a Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* **156**: 49-74.
- PETIT, R., U. CSAIKL, S. BORDÁCS, K. BURG, E. COART *et al.*, 2002b Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* **156**: 5-26.
- PETIT, R., A. EL MOUSADIK and O. PONS, 1998 Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**: 844-855.
- PETIT, R. J., I. AGUINAGALDE, J.-L. DE BEAULIEU, C. BITTKAU, S. BREWER *et al.*, 2003 Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* **300**: 1563-1565.

- PETIT, R. J., C. BODENES, A. DUCOUSSO, G. ROUSSEL and A. KREMER, 2004 Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist* **161**: 151-164.
- PETIT, R. J., and L. EXCOFFIER, 2009 Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution* **24**: 386-393.
- PIOTTI, A., S. LEONARDI, M. HEUERTZ, J. BUIITEVELD, T. GEBUREK *et al.*, 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**.
- PONS, O., and R. J. PETIT, 1995 Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 462-470.
- POP, E., 1954 *Studii botanice în mlaștinile noastre de turbă*.
- POPESCU, F., and D. POSTOLACHE, 2009 Genetic variability of the oak stands in Romania, like a result of the interaction between the postglacier evolution of the vegetation and the anthropic influences. *Revista Padurilor* **5**: 49-54.
- POSTOLACHE, D., C. LEONARDUZZI, A. PIOTTI, I. SPANU, A. ROIG *et al.*, 2014 Transcriptome versus Genomic Microsatellite Markers: Highly Informative Multiplexes for Genotyping *Abies alba* Mill. and Congeneric Species. *Plant Molecular Biology Reporter* **32**: 750-760.
- POTENKO, V., O. KOREN and V. VERKHOLAT, 2007 Genetic variation and differentiation in populations of Japanese emperor oak *Quercus dentata* Thunb. and Mongolian oak *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb. in the south of the Russian Far East. *Russian Journal of Genetics* **43**: 387-395.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS and P. DONNELLY, 2000 Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- RADU, R. G., A. L. CURTU, G. SPARCHEZ and N. ȘOFLETEA, 2014 Genetic diversity of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] in Romanian Carpathians. *Annals of Forest Research* **57**: 19-29.
- RAJENDRA, K., 2011 Spatial dynamics of intraspecific genetic variation in European beech (*Fagus sylvatica* L.), pp. 125. Georg-August University of Göttingen, Göttingen.
- RIESEBERG, L. H., and D. E. SOLTIS, 1991 Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* **5**: 65-84.
- RUSHTON, B. S., 1993 Natural hybridization within the genus *Quercus*. *Annales des Sciences Forestieres* **50**: 73-90.
- SALVINI, D., P. BRUSCHI, S. FINESCHI, P. GROSSONI, E. D. KJČR *et al.*, 2008 Natural hybridisation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd.



- within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting. *Plant Biology* **11**: 758-765.
- SCHUELKE, M., 2000 An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology* **18**: 233-234.
- SCHWARZ, O., 1937 *Monographie der Eichen Europas und des Mittelmeergebietes I. Textband*. Dahlem, Berlin.
- SCHWARZ, O., 1993 *Quercus* L., pp. 72-76 in *Flora Europaea*, edited by T. G. TUTIN, N. A. BURGESS and A. O. CHATER. Cambridge University Press, Cambridge.
- SCOTTI-SAINTAGNE, C., S. MARIETTE, I. PORTH, P. G. GOICOECHEA, T. BARRENECHE *et al.*, 2004 Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics* **168**: 1615-1626.
- SEEHAUSEN, O., G. TAKIMOTO, D. ROY and J. JOKELA, 2008 Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular Ecology* **17**: 30-44.
- SMOUSE, P. E., and R. PEAKALL, 1999 Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* **82**: 561-573.
- SMOUSE, P. E., R. O. D. PEAKALL and E. V. A. GONZALES, 2008 A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Molecular Ecology* **17**: 3389-3400.
- ȘOFLETEA, N., 2005 *Genetica și ameliorarea arborilor*. Editura Pentru Viață, Brașov.
- ȘOFLETEA, N., 1995 Cercetări de genetică ecologică în păduri de brad afectate de fenomenul de uscare, pp. 250. Universitatea Transilvania din Brașov, Brașov.
- SOFLETEA, N., M. BUDEANU and G. PARNUTA, 2012 Provenance Variation in Radial Increment and Wood Characteristics Revealed by 30 Years Old Norway Spruce Comparative Trials. *Silvae Genetica* **61**: 170-178.
- ȘOFLETEA, N., and A. L. CURTU, 2007 *Dendrologie*. Editura Universitatii Transilvania, Brasov.
- SORK, V. L., F. W. DAVIS, P. E. SMOUSE, V. J. APSIT, R. J. DYER *et al.*, 2002 Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? *Molecular Ecology* **11**: 1657-1668.
- STANCIU, A., 1997 Cercetari taxonomice, morfologice și ecologice privind hibridii genului *Quercus* din Rezervatia Stiintifica Bejan-Deva, judetul Hunedoara, pp. 140 in *Facultatea de Silvicultura*. Universitatea Transilvania Brasov, Brasov.
- STĂNESCU, V., and N. ȘOFLETEA, 1992 Cercetări de genetică ecologică în molidișuri montane (II). *Revista Pădurilor* **1**: 2-5.
- STĂNESCU, V., N. ȘOFLETEA and O. POPESCU, 1997 *Flora forestieră lemnoasă a României*.
- STATSOFT, 2008 STATISTICA for Windows [Software-System For Data Analysis], pp.

- STEINHOFF, S., 1997 Results of *Quercus* hybridization work from 1989 to 1996 at Escherode (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.), pp. 156-164 in *Diversity and adaptation in oak species*, edited by K. C. STEINER. Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- STEINKELLNER, H., S. FLUCH, E. TURETSCHKEK, C. LEXER, R. STREIFF *et al.*, 1997 Identification and characterization of (GA/CT)<sub>n</sub>- microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology* **33**: 1093-1096.
- STREIFF, R., T. LABBE, R. BACILIERI, H. STEINKELLNER, J. GLÖSSL *et al.*, 1998 Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology* **7**: 317-328.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU and J. BOUVET, 1991 Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR, 2007 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- TEODOSIU, M., 2009 Molidul (*Picea abies* (L.) Karst.), pp. 184-190 in *Surse de seminte testate pentru principalele specii de arbori forestieri din Romania*, edited by G. MIHAI. Editura Silvică.
- TEODOSIU, M., 2011 Cercetări privind variabilitatea genetică în arboretele de molid din Obcinele Bucovinei, pp. 164. Universitatea *Transilvania* din Braşov, Braşov.
- TOADER, A., I. C. MOLDOVAN, N. SOFLETEA, I. V. ABRUDAN and A. L. CURTU, 2009a DNA isolation and amplification in oak species (*Quercus* spp.). *Bulletin of the Transilvania University of Brasov* **2 Series II**: 45-50.
- TOADER, A., N. SOFLETEA and A. L. CURTU, 2009b Variatia genetica izoenzimatica a stejarului pedunculat (*Quercus robur* L.) si stejarului brumariu (*Quercus pedunculiflora* K. Koch) din Romania, pp. 1-8 in *Forest and Sustainable Development*, edited by T. U. O. BRASOV. Editura Universitatii Transilvania din Brasov, Brasov.
- TURNER, T. L., and M. W. HAHN, 2007 Locus- and population-specific selection and differentiation between incipient species of *Anopheles gambiae*. *Mol Biol Evol* **24**: 2132-2138.
- VALBUENA-CARABANA, M., S. C. GONZALEZ-MARTINEZ, O. J. HARDY and L. GIL, 2007 Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization. *Molecular Ecology* **16**: 1207-1219.

- VALBUENA-CARABANA, M., S. C. GONZALEZ-MARTINEZ, V. L. SORK, C. COLLADA, A. SOTO *et al.*, 2005 Gene flow and hybridisation in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl.) in central Spain. *Heredity* **95**: 457-465.
- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS and P. SHIPLEY, 2004 Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**: 535-538.
- VEKEMANS, X., and O. J. HARDY, 2004 New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* **13**: 921-935.
- VICARIO, F., G. G. VENDRAMIN, P. ROSSI, P. LIÑ and R. GIANNINI, 1995 Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for detecting genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 1012-1018.
- VORNAM, B., O. GAILING, J. DERORY, C. PLOMION, A. KREMER *et al.*, 2011 Characterisation and natural variation of a dehydrin gene in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Plant Biology* **13**: 881-887.
- WHITE, T., W. T. ADAMS and D. B. NEALE, 2007 *Forest genetics*. CABI Publishing.
- ZANETTO, A., and A. KREMER, 1995 Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. I. Monolocus patterns of variation. *Heredity* **75**: 506-517.
- ZANETTO, A., A. KREMER, G. MÜLLER-STARCK and H. H. HATTEMER, 1996 Inheritance of isozymes in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Journal of Heredity* **87**: 364-370.
- ZANETTO, A., G. ROUSSEL and A. KREMER, 1994 Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Forest Genetics* **1**: 111-123.
- ZENG, Y.-F., W.-J. LIAO, R. J. PETIT and D.-Y. ZHANG, 2010 Exploring species limits in two closely related Chinese oaks. *PLoS ONE* **5**: e15529.