



Universitatea
Transilvania
din Braşov

ŞCOALA DOCTORALĂ INTERDISCIPLINARĂ

Facultatea de Silvicultură și exploatare forestiere

Marina SELLER

**DIVERSITATEA GENETICĂ A PINULUI SILVESTRU (*PINUS
SYLVESTRIS* L.) DIN SIBERIA CENTRALĂ**

REZUMAT

Coordonator științific

Prof. dr. ing. Alexandru Lucian CURTU

BRAȘOV, 2023

CUPRINS

	Pg. teza	Pg. rezumat
MULȚUMIRI	6	5
INTRODUCERE	15	6
CAPITOLUL 1. CONTEXTUL STUDIULUI	17	8
1.1. Caracteristicile biologice, ecologia și arealul pinului silvestru (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	17	8
1.2. Scopul și obiectivele cercetărilor	19	10
1.3. Material și metode	19	10
1.3.1. Localizarea studiului	19	10
1.3.1.1. Caracteristicile climatice ale regiunii Krasnoyarsk	20	11
1.3.1.2. Caracteristicile climatice ale Republicii Khakassia	23	13
1.3.1.3. Caracteristicile climatice ale Republicii Tuva	24	14
1.3.2. Populațiile de pin silvestru analizate	25	15
1.3.3. Analize genetice	29	16
1.3.4. Analize statistice	32	17
1.4. Studii de genetică moleculară asupra pinului silvestru	34	19
1.5. Conceptul general al cercetării	35	20
1.6. Referințe bibliografice	37	22
CAPITOLUL 2. DIVERSITATEA GENETICĂ LA NIVELUL ADN-ULUI CLOROPLASTIC ÎN POPULAȚIILE DE <i>P. SYLVESTRIS</i> L. DIN SIBERIA CENTRALĂ ȘI CARPAȚII ROMÂNIEI	45	29
2.1. Introducere	45	29
2.2. Material și metode	47	30
2.2.1. Material biologic	47	30
2.2.2. Analiza moleculară	49	30
2.2.3. Analiza statistică	50	30

2.3. Rezultate	52	31
2.4. Discuții	58	33
2.5. Concluzii	61	33
2.6. Referințe	61	34
2.7. Material suplimentar	67	36
CAPITOLUL 3. DIVERSITATEA GENETICĂ ȘI STRUCTURA POPULAȚIILOR DE PIN SILVESTRU (<i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.) DIN SIBERIA CENTRALĂ	70	39
3.1. Introducere	70	39
3.2. Material și metode	72	40
3.2.1. Material biologic	72	40
3.2.2. Extragerea ADN-ului și genotiparea microsateliților	73	40
3.2.3. Analiza datelor	74	40
3.3. Rezultate	77	41
3.4. Discuții	84	44
3.5. Concluzii	87	45
3.6. Referințe	87	46
CAPITOLUL 4. STUDIUL GENETIC AL POPULAȚIILOR DE PIN SILVESTRU (<i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.) DIN MUNȚII ȘI PODIȘURILE DIN SUDUL SIBERIEI CENTRALE: DIVERSITATE ȘI DIFERENȚIERE	94	49
4.1. Introducere	94	50
4.2. Material și metode	96	50
4.2.1. Material biologic	96	50
4.2.2. Extracția ADN-ului și analiza microsateliților	98	50
4.2.3. Analiza datelor	99	50
4.3. Rezultate	101	51
4.4. Discuții	106	54
4.5. Concluzii	109	56
4.6. Referințe bibliografice	110	57

4.7. Material suplimentar	118	59
CAPITOLUL 5. CONCLUZII. CONTRIBUȚII ORIGINALE. DISEMINAREA REZULTATELOR	122	62
5.1. Concluzii	122	62
5.2. Contribuții originale	123	63
5.3. Diseminarea rezultatelor	123	63
REZUMAT		65

MULȚUMIRI

Aș dori să-mi exprim recunoștința față de coordonatorul meu, Prof. dr. ing. Alexandru Lucian Curtu, pentru îndrumarea și sprijinul acordat în timpul doctoratului. Multe mulțumiri colegilor mei care au contribuit la acest studiu. Mulțumiri speciale pentru conf. dr. ing. Elena Ciocîrlan pentru ajutorul acordat în analizele de laborator; Endre György Tóth, pentru ajutorul acordat în analiza statistică a datelor; Pavel Mikhaylov, Serghei Kulakov, Nadezhda Kulakova, Natalia Melnichenko, Aleksey Ibe și Tatyana Sukhikh pentru ajutorul acordat în colectarea materialului pentru această cercetare. Aș dori, de asemenea, să-mi exprim recunoștința față de membrii comisiei de îndrumare, Prof.dr.ing. Neculae Șofletea și conf. dr. ing. Adrian Victor Indreica pentru observațiile și sugestiile făcute pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Aș dori să mulțumesc Universității Transilvania din Brașov pentru bursa acordată. Sprijinul financiar oferit de Ministerul Educației și Științei al Federației Ruse (Misiunea de Stat "Principiile fundamentale ale protecției pădurilor împotriva ento - și fito - dăunătorilor din Siberia" nr. FEFE 2020-0014) este, de asemenea, recunoscut.

INTRODUCERE

Pădurile boreale reprezintă unul dintre cele mai mari ecosisteme de pe Pământ. Cea mai mare parte a pădurilor boreale se află în Rusia, unde alcătuiesc o fâșie largă între tundra forestieră din nord și zona de păduri mixte de foioase din sud. În pădurile boreale predomină speciile de conifere. Pinul silvestru și laricele formează o taigă de conifere deschisă, iar bradul, molidul și cedrul - taigă de conifere închisă (Markatyuk, 2012). Până la 75 % din taigaua din Siberia este aproape de starea sa naturală (WWF). Astfel, în această regiune, unde structura naturală a populațiilor forestiere a fost încă păstrată, este posibil să se efectueze studii unice care vizează conservarea diversității genetice a plantelor lemnoase în viitor. Conservarea resurselor genetice forestiere este de importanță vitală, deoarece acestea reprezintă o resursă excepțională și de neînlocuit pentru generațiile viitoare. Diversitatea genetică este cheia pentru a asigura viabilitatea ecosistemelor forestiere și adaptarea speciilor forestiere la schimbările climatice (FAO 2014). Cu cât potențialul genetic este mai ridicat, cu atât mai puternic este impactul factorilor de stres la care poate rezista o populație și cu atât mai diverse sunt habitatele în care aceasta se poate dezvolta (Padutov et al. 2008). În prezent, principalii factori care duc la o diminuare a diversității genetice a pădurilor sunt incendiile, bolile, doborâturile de vânt, inundațiile și activitățile antropice. Se consideră că un nivel al diversității genetice (heterozigoție) sub 30 % amenință supraviețuirea populațiilor în condițiile schimbărilor climatice (The State Coordination Program for the Development of Biotechnology in the Russian Federation 2012, Padutov V. E. 2001, Padutov et al. 2008). Prin urmare, dezvoltarea durabilă a arboretelor este posibilă numai prin conservarea diversității genetice.

Pinul silvestru (*Pinus sylvestris* L.) este una dintre speciile principale în ecosistemele forestiere din regiunile boreale din Eurasia. Acesta are o mare importanță ecologică și este adaptat la o varietate de condiții de mediu (Naydenov et al. 2007, Dering et al. 2017). Pinul silvestru este una dintre cele mai importante specii de arbori din punct de vedere comercial, care este apreciată la nivel mondial pentru lemnul său (Mátyás et al. 2004). O parte semnificativă din arealul speciei se află în Siberia, unde pădurile de pin sunt dispersate sub forma unui mozaic spațial complex și doar în bazinul râului Angara formează o zonă continuă. Din cauza perturbărilor naturale, a supraexploatării și a gestionării necorespunzătoare, suprafața pădurilor de pin silvestru din Rusia a scăzut cu două milioane de hectare în ultimii zece ani

(Sheller et al. 2021). De aceea, studiul diversității genetice și al structurii pădurilor de pin silvestru din Rusia este foarte relevant.

În ultimele decenii, markerii ADN de tipul microsateliților (sin. secvențe simple repetitive, SSR), au fost utilizați pe scară largă în studiile genetice. Aceștia se caracterizează printr-un nivel ridicat de polimorfism și pot fi extrem de utili în studierea structurii populaționale a speciilor de conifere caracterizate printr-un nivel scăzut de diversitate interpopulațională (Bernhardsson et al. 2016, Șofletea et al. 2020, Dering et al. 2021, Kavaliauskas et al. 2022). În această lucrare, se abordează problema evaluării diversității și structurii genetice a populațiilor de pin silvestru din Siberia Centrală cu ajutorul markerilor ADN nucleari și cloroplastici.

Capitolul 1. CONTEXTUL STUDIULUI

1.1. Caracteristicile biologice, ecologia și arealul pinului silvestru (*Pinus sylvestris* L.)

Pinul silvestru (*Pinus sylvestris* L.) este una dintre cele mai răspândite specii de pin (familia *Pinaceae*). Este un arbore cu o înălțime de până la 25-35 m și un diametru de până la 1 m. Coroana este piramidală, dar, în timp, ramurile de la baza coroanei se usucă, cad și coroana capătă o formă tabulară. Scoarța este brun-roșiatică, exfoliabilă în mod constant sub formă de plăci subțiri. Acele sunt grupate câte două într-o teacă, de culoare verde - albastrui, acoperite cu un înveliș ceros. Florile masculine sunt galbene, iar cele femele sunt roșiaticice, localizate pe vârfulurile lujerilor anuali și apar din aprilie până în mai. Conurile sunt la început verzi, ulterior brune, iar la maturarea acestora solzii se depărtează și eliberează semințele aripate (Pravdin 1964, Steven și Carlisle 1959).

Pinul silvestru este una dintre speciile cu temperament de lumină, lumina fiind unul dintre factorii care stimulează germinația semințelor. Slaba toleranță la umbră a pinului silvestru se explică prin incapacitatea aparatului său asimilator de a se adapta la umbrirea puternică. Subarboretul de pin de sub coronamentul pădurii suferă de lipsă de lumină, dar, în momentul în care beneficiază de suficientă lumină, o parte din subarboret reușește să își adapteze aparatul asimilator, după care își accelerează semnificativ creșterea (Zelawsk și Zelawska 1967, Rysin și Savelieva 2008). Pinul silvestru este considerat ca fiind o specie termofilă. Dependența pinului silvestru de regimul de temperatură este foarte clar vizibilă în regiunile muntoase din Siberia de Est și Transbaikalia, unde crește pe versanții sudici mai bine încălziți și este absent pe versanții orientați spre nord (Rysin și Savelieva 2008). Pinul silvestru este o specie xerofită. Particularitățile aparatului său asimilator și ale sistemului radicular îi permit să crească pe diferite soluri cu regimuri hidrologice foarte diferite. Pinul silvestru este capabil să reziste la un conținut relativ scăzut de oxigen în sol, dar până la anumite limite. De exemplu, atunci când concentrația de oxigen din sol scade de la 21% la 9%, creșterea rădăcinilor puieților de pin nu se modifică semnificativ, dar la 4% aceasta încetinește de 20 de ori (Leyton și Rousseau 1958). Pinul silvestru poate crește pe soluri foarte sărace, fiind capabili să supraviețuiască cu o deficiență semnificativă sau chiar cu oprirea completă a aportului de nutrienți. Pinul silvestru poate crește pe soluri foarte acide (pH = 3,0-3,5) și pe soluri calcaroase, dar pH-ul optim este de 4,5-5,6 (Ivanov 1970). La o majorare a pH-ului până la 7,0, creșterea puieților scade cu aproape jumătate (Levkina 1964).

Pinul silvestru este un arbore foarte răspândit în Eurasia, începând din Spania și Marea Britanie și mai departe spre est până în bazinul râului Aldan și în mijlocul râului Amur din Siberia de Est. În nord, crește până în Laponia, iar în sud se găsește în Mongolia și China (Pravdin 1964). Aria de distribuție a pinului silvestru în Rusia este prezentată în figura 1.1.

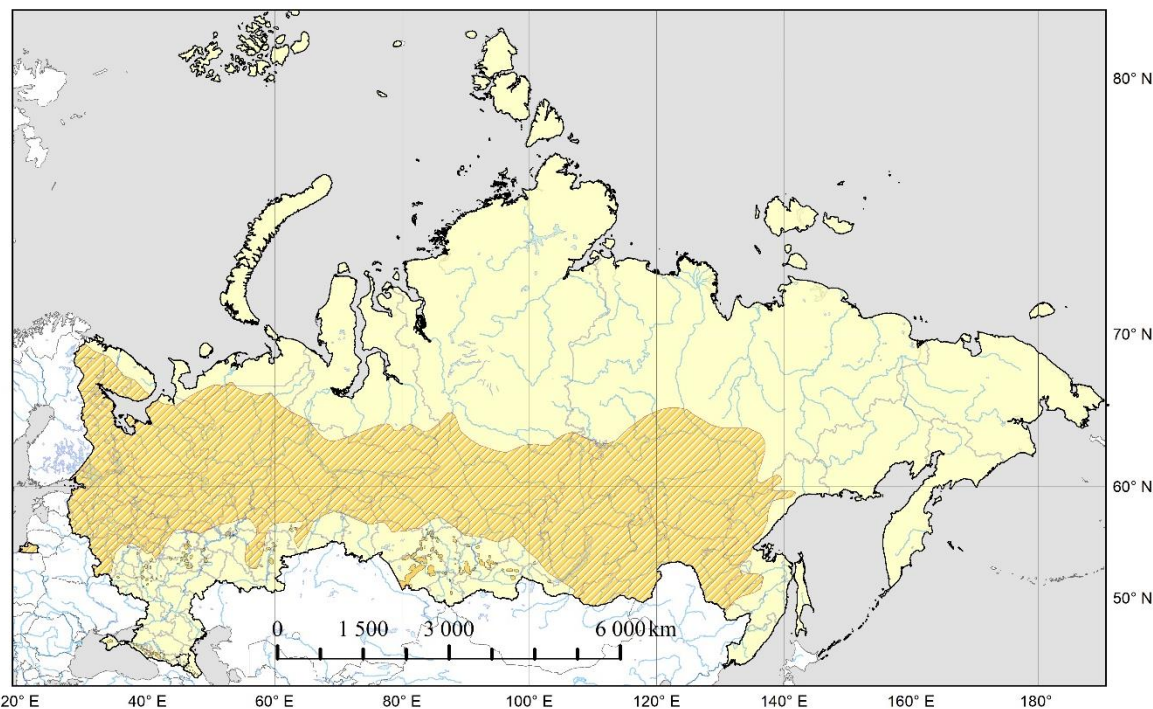


Figura 1.1. Distribuția pinului silvestru în Rusia (Pravdin 1964). Zonele portocalii reprezintă prezența naturală a pinului silvestru.

În Rusia, pinul silvestru este una dintre principalele specii de arbori din fondul forestier și acoperă 15,6% din acesta (FAO 2012). O parte semnificativă a arealului său se află în Siberia, unde pădurile de pin silvestru formează un mozaic spațial complex și doar în bazinul râului Angara formează un areal de distribuție continuu, instalându-se pe mai multe tipuri de soluri (Pimenov 2015).

Pinul silvestru este adesea plantat pentru a consolida terenurile nisipoase și ravenele, versanții montani sau pentru a crea perdele forestiere de protecție. Prezintă un mare interes ornamental, fiind utilizat în amenajări și construcții peisagistice. În plus, este o specie importantă din punct de vedere comercial, lemnul său este ușor de prelucrat, cu proprietăți mecanice bune și are numeroase utilizări, în primul rând ca material de construcție și lemn de celuloză (Mátyás et al. 2004).

1.2. Scopul și obiectivele cercetărilor

Scopul studiului este de a caracteriza modelele de diversitate genetică ale pinului silvestru la nivelul ADN -ului nuclear și cloroplastic pentru diferite tipuri de ecosisteme și regiuni geografice.

Obiectivele specifice ale cercetării sunt:

1. evaluarea diversității genetice la nivelul ADN-ului cloroplastic în populațiile de pin silvestru din Siberia Centrală;
2. evaluarea diversității genetice la nivelul ADN-ului nuclear în interiorul și între populațiile naturale de pin silvestru din Siberia Centrală;
3. evaluarea comparativă a diversității genetice la nivelul ADN-ului nuclear în populații de pin silvestru din zona montană și de podiș din sudul Siberiei Centrale.

1.3. Material și metode

1.3.1. Localizarea cercetărilor

Siberia Centrală este o regiune imensă din punct de vedere al acoperirii teritoriale și unică din punct de vedere al condițiilor naturale. O serie de geografi asociază teritoriul acestei regiuni în principal cu Platoul Siberiei Centrale, determinând localizarea sa între râurile Yenisey și Lena până la bazinul râului Aldan, linia de coastă a mărilor Kara și Laptev, creasta munților Sayan de Est și centura muntoasă a regiunii Baikal (Parmuzin 1964; Snytko și Konovalova 2005). Potrivit lui Gerasimov și coautorilor (1964), Siberia Centrală include, de asemenea, partea din Câmpia Siberiei de Vest adiacentă râului Yenisey și partea centrală a Munților Altai-Sayan. În acest studiu, optăm, de asemenea, la această din urmă viziune asupra teritoriului Siberiei Centrale. Siberia Centrală poate fi considerată ca fiind cea mai împădurită regiune a Rusiei. Taigaua europeană este puternic tăiată, în Siberia de Vest - aproximativ jumătate din suprafața zonei forestiere este ocupată de mlaștini, iar la est de râul Lena și de lacul Baikal, zona de taiga până la Oceanul Pacific este traversată de lanțuri muntoase fără arbori sau slab împădurite (Gerasimov 1964). Zonele de studiu sunt situate pe teritoriile a trei regiuni federale ale Rusiei: Krasnoyarsk Krai, Republica Khakassia și Republica Tuva.

1.3.1.1. Caracteristicile climatice ale regiunii Krasnoyarsk

Krasnoyarsk Krai ocupă 2 366 797 km² și se extinde pe 650 -1460 km de la vest la est și 2990 km de la nord la sud (figura 1.2). Suprafața pădurii din regiunea Krasnoyarsk este de 168,1 milioane de hectare. Pădurile acoperă 69% din teritoriul regiunii. Condițiile naturale ale regiunii sunt foarte diverse datorită dimensiunilor sale impresionante. Sudul regiunii face parte din regiunea fizico-geografică a muntelui Altai-Sayan, în nordul regiunii există o vastă câmpie - câmpia Siberiană de Nord (Goryachko și colab. 2010). Râul Yenisey traversează cea mai mare parte a regiunii Krasnoyarsk. Câmpia Siberiană de Vest ocupă malul stâng al râului Yenisey, iar platoul Siberian de Est ocupă malul drept.

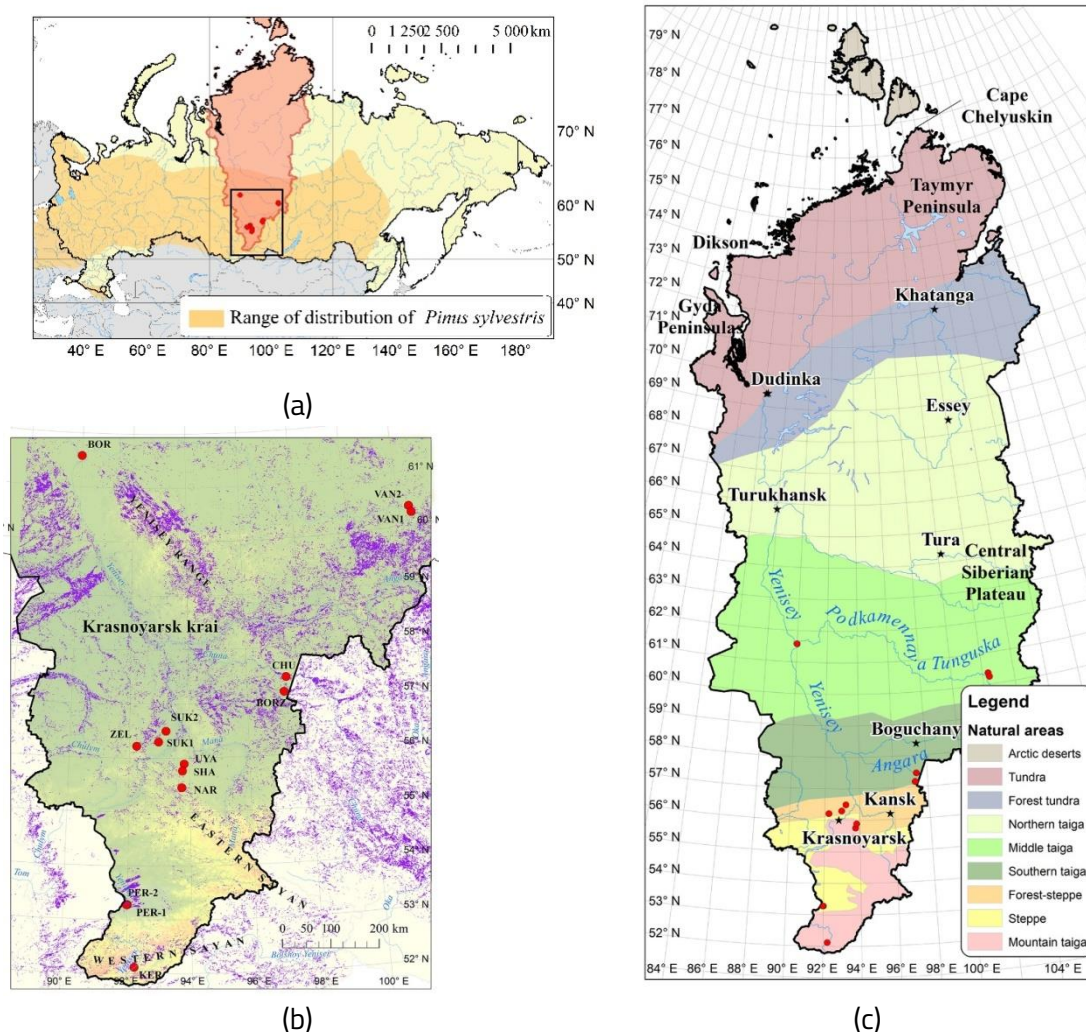


Figura 1.2. (a), (b) Hărți ale populațiilor de pin silvestru din regiunea Krasnoyarsk. Populațiile de pin silvestru studiate sunt indicate prin puncte de culoare roșie. (b) Arealul pinului silvestru - culoare purpurie (Shvidenko și Schepaschenko 2014). (c) zonele de vegetație din regiunea Krasnoyarsk.

Teritoriul regiunii Krasnoyarsk este situat în trei zone climatice: arctic, subarctic și temperat. Temperatura medie anuală în nord este de -10°C (Khatanga, Dudinka), în centru de -7°C (Turukhansk),

și în sud de $-2,4^{\circ}\text{C}$ (Boguchany) / $-0,7^{\circ}\text{C}$ (Kansk). Numai în bazinul Minusinsk temperaturile sunt pozitive ($1,2^{\circ}\text{C}$). Regiunea este caracterizată prin ierni lungi și reci. Temperaturile medii ale lunii ianuarie în părțile nordice și centrale sunt de la -27 (-29) $^{\circ}\text{C}$ (Dikson, Dudinka) până la -36 (-39) $^{\circ}\text{C}$ (Tura, Essey); în partea sudică sunt de la -16°C (Krasnoyarsk) până la -24°C (Boguchany) (figura 1.2 c). Temperaturile medii din luna iulie variază de la mai puțin de 10°C pe coasta arctică până la 19°C în partea de sud. În partea sudică a regiunii sunt frecvente înghețurile timpurii sau târzii și ploile prelungite în a doua jumătate a verii. Cantitățile anuale de precipitații scad de la 550 mm în vest la 300 mm în est; cantitatea maximă de precipitații (1000-1200 mm pe an) este pe versanții vântuiți ai Munților Sayan.

Pe teritoriul regiunii Krasnoyarsk Krai există mai multe tipuri de ecosisteme naturale, cum ar fi: deșerturi arctice, tundră, tundră forestieră, taiga, stepă și stepă forestieră (figura 1.2c). Zona deșerturilor arctice se întâlnește pe extremitatea nordică a Peninsulei Taymyr - Capul Chelyuskin. Cea mai mare parte a peninsulelor Taymyr și Gyda este ocupată de o zonă de tundră, cu lățimea de 600-700 km și este împărțită în subzone arctice. Zona de tundră forestieră se extinde în nordul Câmpiei Siberiene de Vest cu o fâșie de 150-200 km, iar în Siberia Centrală lățimea acestei zone ajunge la 900 km, contopindu-se cu zona de păduri pre-tundră. Tundra forestieră este reprezentată de larice siberian, iar în partea de sud este amestecată cu molidul siberian (Efits 2012). Aproape 50% din teritoriul regiunii este ocupat de zona de taiga, care este împărțită în trei subzone: taiga nordică, taiga mijlocie și taiga sudică. La sud de Cercul Arctic, taigaua nordică se întinde până la 64° latitudine nordică pe platoul Siberiei Centrale și aproape până la 62° latitudine nordică la vest de râul Yenisey. Taigaua mijlocie de pe platoul Siberiei Centrale atinge 58° latitudine N, iar la vest de râul Yenisey se întinde până la 60° latitudine N. Pădurile mixte de conifere domină pe lanțul Yenisey, iar printre acestea se regăsesc păduri de mestecăn și de plop. În bazinul râului Angara și în valea râului Podkamennaya Tunguska, sunt prezentate păduri de larice și pin. Taigaua sudică, care se întinde la vest și la est de lanțul Yenisey, se caracterizează printr-o abundență a pădurilor de pin. Stepele forestiere sunt reprezentate de stepa forestieră Mariinsky-Achinsk (tip vest-siberian) și de stepele forestiere Krasnoyarsk și Kansk (tip central-siberian). Zona de silvostepă este cea mai dezvoltată din punct de vedere economic. Suprafețe mari de pădure din zona de stepă sunt ocupate de terenuri arabile și de fânețe. Vegetația din partea muntoasă sudică a regiunii este extrem de diversă. În Munții Sayan de Est predomină pădurile de conifere, iar în Munții Sayan de Vest pădurile mixte. Începând de la o altitudine de 1300-1400 m în

Munții Kuznetsk Alatau și 1500-1700 m în Munții Sayan, se întinde zona subalpină, iar la o altitudine de 1500- 2000 m zona alpină. Pajiștile subalpine și alpine ocupă în principal versanții sudici (Goryachko et al. 2010).

1.3.1.2. Caracteristicile climatice ale Republicii Khakassia

Republica Khakassia ocupă 61 569 km² și se întinde pe aproximativ 200 km de la vest la est și pe circa 460 km de la nord la sud. Republica Khakassia este situată în sudul Siberiei și are ca formă predominantă de relief munții care ocupă 80% din teritoriu (figura 1.3).

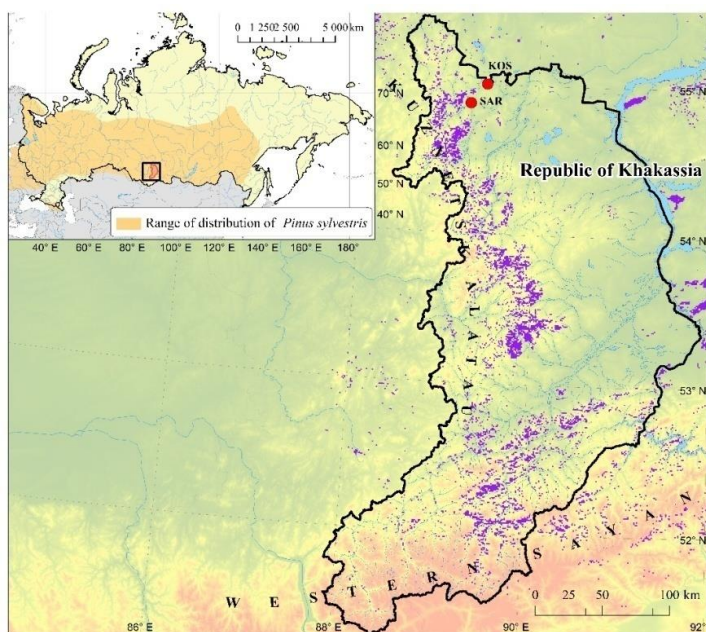


Figura 1.3. Harta populațiilor de pin silvestru din Republica Khakassia. Populațiile de pin silvestru studiate sunt indicate prin puncte de culoare roșie. Arealul pinului silvestru este marcat cu culoare purpurie (Shvidenko și Schepaschenko 2014).

Teritoriul regiunii este eterogen și este împărțit în trei mari zone geografice: vestul Munților Sayan, Munții Kuznetsky Alatau și bazinul Minusinskaya (Lushnikova et al. 2018). Dealurile cu aflorimente stâncoase și creste joase alternează cu văile râurilor și bazinele lacurilor. Clima este extrem de continentală, cu ierni reci și veri calde în depresiuni. Temperatura medie a lunii ianuarie este cuprinsă între -19 și -21°C, la poalele munților aceasta variind de la -16 la -18°C. Vara este caldă cu numeroase

zile însorite. Temperatura medie în luna iulie este de 18-19°C (zona montană 12°C). Precipitațiile medii anuale variază de la 250 mm în regiunea de stepă la 600-700 mm în regiunea montană. Lungimea sezonului de vegetație este de 155-165 de zile.

1.3.1.3. Caracteristicile climatice ale Republicii Tuva

Republica Tuva ocupă 168 604 km² și se extinde 630 km de la vest la est și 420 km de la nord la sud (figura 1.4). Republica Tuva este situată în sudul Siberiei, în partea superioară a râului Yenisey. Predomină munții cu o altitudine de 1200-1800 m (Samoylova 2017).

Clima este extrem de continentală. Iernile sunt dure, lungi (din noiembrie până în aprilie), cu multe zile însorite. Temperatura medie în luna ianuarie variază între -28 și -34,9°C (în depresiuni). Pe versanți, în special în sud, apare o inversare a temperaturii. În depresiuni, înălțimea stratului de zăpadă este de 10-15 cm, în munți de 50-80 cm sau mai mult. Verile sunt călduroase, aride, cu temperaturi ridicate în depresiuni și moderat calde în munți. Temperatura medie în iulie este de 16-18°C (maxim 39°C). Precipitațiile medii anuale variază între 600 mm în munți și 138 mm în depresiuni. Sezonul de vegetație este de 150-160 de zile. Diversitatea tipurilor de sol și a vegetației este asociată cu poziția intermediară a acestei regiuni între semideserturile Mongoliei și regiunile boreale din Siberia. Pădurile de pin silvestru (pădurea Balgazynsky) se regăsesc în depresiuni pe sedimente nisipoase (Kuzhuget 2014). În munți, are loc zonarea altitudinală a peisajelor. La o altitudine de 1300-1500m, stepele sau silvostepelile sunt înlocuite cu păduri de cedru-zadă în amestec cu molid, mesteacăn și plop. Pădurile ocupă 64,5% din teritoriu (Samoylova 2017).

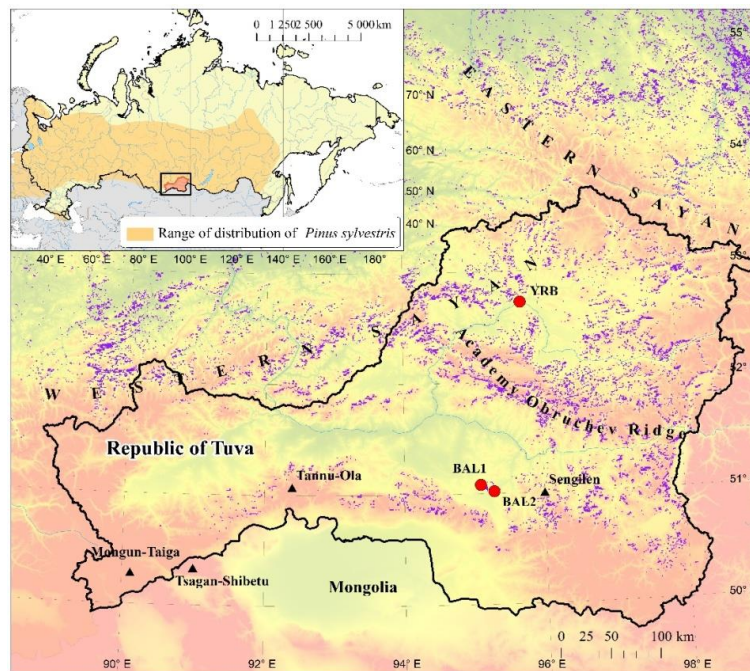


Figura 1.4. Harta populațiilor de pin silvestru din Republica Tuva. Populațiile de pin silvestru studiate sunt indicate prin puncte roșii. Arealul pinului silvestru este marcat cu culoare purpurie (Tikhonova et al. 2018).

1.3.2. Populații de pin silvestru analizate

Au fost alese 19 populații de pin silvestru din arealul natural de distribuție a speciei, din Siberia Centrală (Figurile 1.5). Pinul silvestru este specia dominantă în toate populațiile studiate. Cinci dintre ele (BOR, VAN1, VAN2, CHU și BORZ) se află în zona forestieră de taiga, trei (SUK1, SUK2 și ZEL) cresc în zona de silvostepă, iar unsprezece (UYA, SHA, NAR, KOS (SAR1), SAR (SAR-2), PER-1, PER-2, KER, YRB (TOD), BAL1 și BAL2) sunt distribuite în zona muntoasă din sudul Siberiei. Totodată au fost incluse în studiu șapte populații îndepărtate: patru din Carpații României (POI, CHE, RET, LOT), una din partea europeană a Rusiei (SHA), una din Siberia de Vest (ARO) și una din Extremul Orient rusesc (SVO).

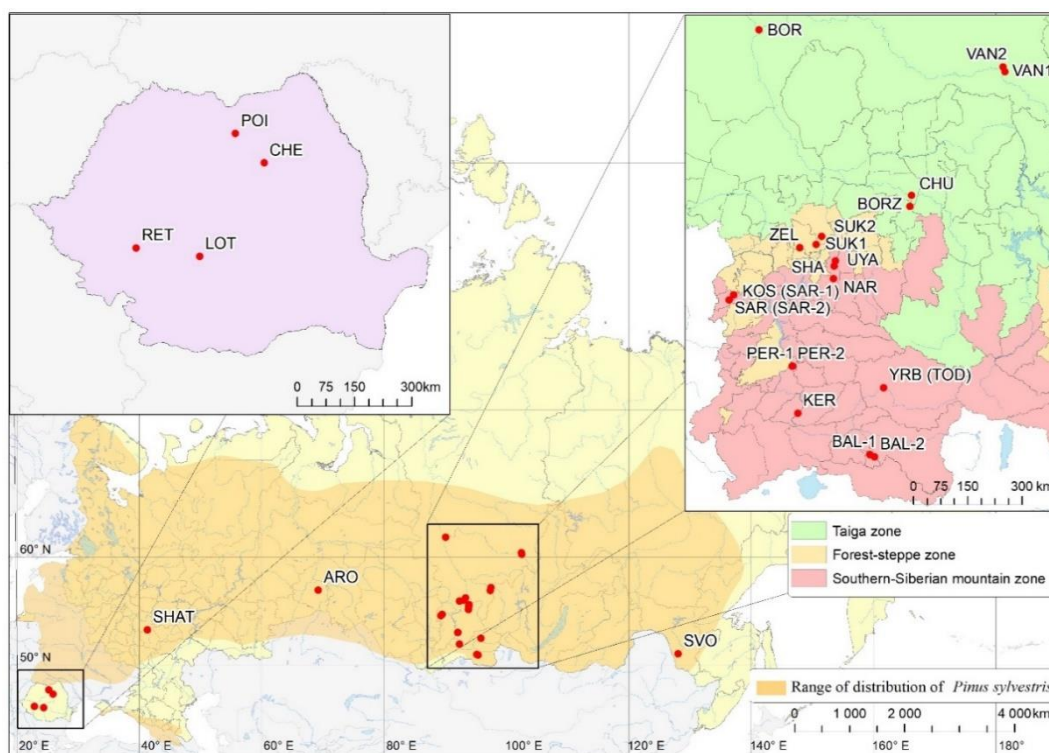


Figura 1.5. Localizarea populațiilor de pin silvestru studiate în Siberia Centrală, partea europeană a Rusiei, Siberia de Vest, Extremul Orient rusesc și Carpații României.

1.3.3. Analize genetice

ADN-ul a fost extras prin metoda CTAB (Doyle și Doyle 1990) din ace de pin uscate. Calitatea și concentrația ADN-ului extras au fost măsurate cu spectrofotometrul Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, SUA). Pentru analizele ulterioare, probele au fost diluate astfel încât concentrația ADN-ului să fie de 10-20 ng/μl.

Pentru analiza ADN-ului la nivel cloroplastic au fost aleși 10 markeri de tipul microsateleților după cum urmează: PCP45071, PCP36567, PCP48256, PCP41131, PCP30277, PCP26106, Pt1254, Pt15169, Pt71936, Pt87268 (Vendramin et al. 1996; Provan et al. 1998). Markerii cpSSR au fost grupați în două reacții PCR, fiecare reacție cu un volum total de 10-12 μl. Pentru amplificarea ADN-ului s-a folosit kitul Qiagen Multiplex PCR (Qiagen, Germania) respectând protocolul recomandat de producător. Reacția PCR a fost efectuată într-un termocycler Corbett (Corbett Research, Australia) în următoarele condiții: denaturarea inițială - 15 min la 95°C, apoi 30 de cicluri de 15 s la 94°C, 1 min 30 s la 60°C (pentru setul

de 6 markeri PCP) și 58°C (pentru setul de 4 markeri Pt), 1 min 30 s la 72°C și o extensie finală de 10 min la 72°C.

Pentru analiza ADN-ului la nivel nuclear au fost utilizați zece perechi de markeri SSR: Psyl16, Psyl17, Psyl42, Psyl44, Psyl57 (Sebastiani et al. 2012); PtTX2146 (Auckland et al. 2002); PtTX4001 (Auckland et al. 2002); lw_isotig04195, lw_isotig04306, lw_isotig07383 (Fang et al. 2014). Markerii au fost grupați în trei multiplexe de analiză: setul 1 - Psyl44, Psyl57 și lw_isotig04306; setul 2 - Psyl16, PtTX2146 și lw_isotig07383; setul 3 - Psyl17, Psyl42, lw_isotig04195 și PtTX4001. Primerii au fost marcați pentru a fi analizați cu ajutorul secvențiatorului Beckman Coulter (Fullerton, CA, SUA). Markerii au fost amplificați cu ajutorul kitului Qiagen Multiplex PCR (Qiagen, Hamburg, Germania) respectând protocolul recomandat de producător. Reacția PCR a fost efectuată în următoarele condiții: o denaturare inițială de 5 minute la 95 °C, apoi 32 de cicluri de 30 s la 95 °C, 90 s la 58 °C, 50 s la 72 °C și o extensie finală de 7 minute la 72 °C. Genotiparea indivizilor a fost realizată cu ajutorul software-ului GenomeLab GeXP (versiunea 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA, SUA).

Fragmentele amplificate au fost analizate pe un analizor genetic Beckman Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA) utilizând protocolul standard recomandat de producător. Dimensionarea fragmentelor a fost realizată cu ajutorul software-ului GenomeLab GeXP (versiunea 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA).

1.3.4. Analize statistice

Programele POPGENE ver. 1.31 (Yeh et al. 1999) și GenAlEx v. 6. 5 (Peakall și Smouse 2006) au fost utilizate pentru a estima parametrii diversității genetice: numărul mediu de alele (N_a); numărul efectiv de alele (N_e); coeficientul de consangvinizare în raport cu subpopulația (F_{is}); coeficientul de consangvinizare în raport cu populația totală (F_{it}); coeficientul de diferențiere genetică (F_{st}); heterozigoția observată (H_o); heterozigoția așteptată (H_e); indicele Shannon (H); indicele de diversitate genetică Nei (h); fluxul genetic (N_m). Bogăția alelică (A_R) a fost calculată în R (R Core Team. R 2013) utilizând pachetul "hierfstat" (Goudet 2005).

Programul HAPLOTYPE ANALYSIS ver. 1.05 (Eliades și Eliades 2009) a fost utilizat pentru a estima numărul de haplotipuri diferite (A), numărul de haplotipuri private (P), numărul efectiv de haplotipuri (N_E), diversitatea haplotipurilor (H_{CP}) și distanța genetică medie între haplotipuri (D^2sh).

Software-ul BOTTLENECK v.1.2.02 (Piry et al. 1999) a fost utilizat pentru a testa dacă există blocaje recente ale populației pe baza modelului - stepwise mutation model (SMM). Semnificația statistică a fost determinată prin testul Wilcoxon signed-rank cu 1000 de iterații.

Structura populației a fost analizată cu ajutorul programului STRUCTURE v.2.3.4 - analiza bayesiană (Pritchard et al. 2000). Testarea s-a realizat pentru următorii parametri : 20 de execuții independente, pentru K de la 1 la 10, fiecare execuție cu 100 000 de pași burn-in și 500 000 de iterații Monte Carlo Markov, presupunând un model de mixt (admixture model, cu opțiune LocPrior selectată) și frecvențele alelelor corelate. Identificarea numărului de grupuri omogene s-a realizat cu ajutorul programului Structure Harvester (Earl și VonHoldt 2012) pe baza valorilor ΔK și a valorilor medii $L(K)$ (Evanno et al. 2005). Matricile medii ale proporțiilor alocării arborilor pentru fiecare populație au fost estimate cu ajutorul programului CLUMPP v.1.1.2. (Jakobsson și Rosenberg, 2007).

Analiza moleculară a varianței (AMOVA), implementată în software-ul GenAlEx v. 6.5, a fost utilizată pentru a determina distribuția variației genetice între populații. Semnificația diferențelor a fost estimată folosind o abordare prin permutare cu 999 de repetări. În plus, a fost realizată o matrice F_{st} (Nei et al. 1983) și o analiză a coordonatelor principale (PCoA) cu ajutorul pachetului "ade4" din R (Thioulouse et al. 2018) pentru a compara diferențierea genetică între populații.

Software-ul SAMOVA v.2.0 (Dupanloup et al. 2002) a fost utilizat pentru a identifica grupurile de populații pentru care există o diferențiere maximă. S-au efectuat rulări cu un număr de grupuri stabilit de la 2 la 7, efectuându-se 100 de simulări. Valoarea maximă a F_{CT} a fost aleasă ca indicator al celei mai bune grupări.

A fost efectuată o analiză de interpolare a formei peisajului genetic cu ajutorul programului Alleles in Space (Miller 2005), pentru a realiza o diagramă de suprafață care să arate discontinuitățile genetice majore, indicând zonele probabile de contact între grupurile genetice detectate. Pe diagrama de suprafață, vârfurile pozitive indică zonele cu discontinuități genetice mari (distanțe genetice mari), iar vârfurile negative reprezintă zonele cu similitudini genetice (distanțe genetice mici).

Barierile potențiale în calea fluxului genetic între populațiile studiate au fost identificate cu ajutorul algoritmului de diferențiere maximă al lui Monmonier (Monmonier 2010) implementat în software-ul BARRIER v.2.2 (Manni et al. 2004). Au fost generate 1000 de matrici de distanțe genetice D (distanța genetică standard a lui Nei corectată în funcție de mărimea eșantionului) în software-ul MSA (Dieringer

și Schlötterer 2003). Matricile au fost utilizate ulterior pentru a estima posibilele bariere ale fluxului de gene.

Pentru a testa corelația dintre distanțele geografice și distanțele genetice între populații, s-a utilizat testul Mantel. Testul Mantel a fost realizat în pachetul "adegenet" din R (Jombart și Ahmed 2011). În plus, deoarece izolarea geografică poate conduce fie la cline continue de diferențiere genetică, fie la existența unor petece îndepărtate, a fost utilizat un estimator de densitate "kernel" bidimensional (2D) pentru valorile F_{ST} liniarizate folosind pachetul "MASS" din R (Venables și Ripley 2013). Abordarea densității cu acest estimator are ca scop identificarea unei structuri genetice subordonate care poate ajuta la explicarea corelației observate între cele două distanțe.

Pentru a testa ipoteza izolării în funcție de mediu (IBE) (Wang și Bradburd 2014), distanțele euclidiene climatice au fost estimate utilizând datele climatice relativ recente (c. 1950–2000) folosind 19 variabile bioclimatice (tabelul S1) care au fost extrase din baza de date WorldClim v.1.4 (<http://www.worldclim.org/>). Ulterior, distanțele genetice, geografice și climatice au fost utilizate în analizele de regresie Mantel, parțial-Mantel și MMRR (Multiple Matrix Regression with Randomization). Testul parțial-Mantel a fost efectuat cu ajutorul pachetului "vegan" (Oksanen et al. 2022), iar analiza MMRR a fost realizată cu ajutorul scriptului personalizat al lui Wang et al. (2013). Script-ul MMRR poate fi accesat în Dryad Data Repository (DOI:10.5061/dryad.kt71r)).

1.4. Studii de genetică moleculară asupra pinului silvestru

În ultimele decenii, au fost realizate numeroase studii privind diversitatea genetică a populațiilor de pin silvestru, utilizând markeri SSR (simple sequence repeats) mitocondriali, cloroplastici și nucleari. ADN-ul acestor organite este moștenit în mod diferit. Genomurile citoplasmice ale speciilor de Pinaceae au un sistem de moștenire special, de exemplu, ADN-ul mitocondrial este moștenit pe cale maternă și, în consecință, fluxul genetic este limitat de mobilitatea semințelor. Datorită mobilității reduse a semințelor, markerii mitocondriali sunt potriviți pentru identificarea structurii genetice a populațiilor. Cu toate acestea, aplicarea markerilor mitocondriali în ceea ce privește pinul silvestru este îngreunată de faptul că polimorfismul detectat în regiunile mitocondriale nad1 și nad7 este limitat la partea vestică a arealului de răspândire a pinului silvestru, în timp ce populațiile din nord-estul Rusiei europene și din

Siberia s-au dovedit a nu fi polimorfice în funcție de aceste fragmente (Naydenov et al. 2007; Čelepirović et al. 2009; Buchovska et al. 2013; Dering et al. 2017; Semerikov et al. 2018).

ADN-ul cloroplastic este moștenit pe cale paternă, iar mobilitatea ridicată a polenului asigură un flux genetic mai semnificativ. Markerii de ADN cloroplastic permit identificarea structurilor genetice sau a haplotipurilor de ADN recent apărute (Provan et al. 1998, Robledo-Arnuncio et al. 2005, Cheddadi et al. 2006, Semerikov et al. 2014, Bernhardsson et al. 2016, Dering et al. 2017).

Markerii ADN nucleari oferă oportunități pentru a studia istoria și mecanismele evoluției. Cu toate acestea, există unele probleme legate de aplicarea markerilor ADN nucleari, cum ar fi recombinarea, selecția, mutația, heterozigoția, dificultatea reacției PCR și a secvențierii etc. (Zhang și Hewitt 2003). Chiar dacă microsateliții nucleari s-au dovedit a fi utili pentru studierea modelelor filogeografice și a fluxurilor genetice la conifere, dezvoltarea unor noi markeri fiabili pentru speciile de conifere este dificilă din cauza dimensiunii mari a genomului lor (estimată la 22,474 Mb pentru pinul silvestru) și a naturii repetitive extinse a ADN-ului (Sebastiani et al. 2012; González-Martínez et al. 2004, 2010). Din acest motiv, amplificarea încrucișată a markerilor SSR concepuți anterior este o modalitate rentabilă de a studia loci foarte polimorfici la mai multe specii diferite (Tóth et al. 2017). Studiile la nivel nuclear, la pinul silvestru, au confirmat faptul că markerii SSR nucleari pot fi utilizați în mod eficient pentru a investiga diversitatea genetică a acestuia (Scalfi et al. 2009, Belletti et al. 2012, Naydenov et al. 2011, Lučić et al. 2014, Pyhäjärvi et al. 2007).

Cunoașterea modelelor de diversitate genetică a pinului silvestru este foarte importantă pentru practica silvică. Aceasta poate îmbunătăți gestionarea resurselor genetice de pin silvestru, dat fiind schimbările climatice preconizate.

1.5. Conceptul general al cercetării

Teza de doctorat este prezentată în capitole, fiecare capitol fiind un articol publicat într-o revistă indexată WOS. Capitolele de rezultate cuprind următoarele aspecte:

Capitolul 2: Diversitatea ADN-ului cloroplastic în populațiile de P. sylvestris L. din Siberia Centrală și Carpații României.

În acest studiu, au fost folosiți 10 markeri SSR de ADN cloroplastic pentru a studia diversitatea genetică a 19 populații de pin silvestru din *Siberia Centrală și Carpații României*. Rezultatele studiului au arătat o diversitate genetică ridicată ($H_{CP} = 0,91-1,00$) în toate populațiile analizate. Analiza markerilor cpSSR a permis identificarea a 158 de haplotipuri de ADNcp. Majoritatea haplotipurilor (85%) au fost detectate o singură dată (haplotipuri unice), iar restul haplotipurilor au fost observate de la doi până la nouă indivizi. Trei haplotipuri de ADNcp au fost găsite în populațiile de pin silvestru din Carpați și cele din Siberia Centrală. Analiza moleculară a varianței (AMOVA) a arătat că doar 3% din variație există între populațiile din Siberia Centrală și 6% din variație există între populațiile din Munții Carpați. În general, s-a observat o diferențiere slabă a populațiilor de pin silvestru din Siberia Centrală și Carpații României. Prezentul studiu privind diversitatea genetică în populațiile de pin silvestru poate contribui la gestionarea și conservarea durabilă a resurselor genetice de pin silvestru din Siberia Centrală și Carpații României.

Capitolul 3: Diversitatea genetică și structura populațiilor de pin silvestru (Pinus sylvestris L.) din Siberia Centrală.

În acest capitol, s-a evaluat variația genetică a 17 populații de pin silvestru din Rusia, din diferite zone ale arealului speciei, utilizând microsateliți nucleari (nSSR). Mai exact, au fost analizate 14 populații naturale din Siberia Centrală și trei populații din partea europeană a Rusiei, Siberia de Vest și respectiv Extremul Orient rusesc. Toate populațiile au prezentat valori ridicate ale diversității genetice ($H_E = 0,514$) și ale bogăției alelice $A_R = 4,150$. Cu toate acestea, cea mai estică populație a prezentat cel mai scăzut nivel de diversitate genetică ($H_E = 0,433$) și bogăție alelică ($A_R = 3,505$). S-au identificat cinci grupuri genetice care corespund: părții europene a Rusiei, sudului Siberiei Centrale, nord-vestului Siberiei Centrale, Siberiei centrale și de Vest, și Extremului Orient rusesc. Cu toate acestea, populația europeană a fost cea mai distinctă din punct de vedere genetic. Variația interpopulațională a reprezentat doar 5% din varianța totală. Cel mai ridicat nivel de diferențiere genetică a fost găsit doar între populațiile cele mai vestice și cele mai estice ($F_{ST} = 0,097$). Această informație poate contribui la o mai bună înțelegere a modelului de diversitate genetică a populațiilor de pin silvestru din Siberia Centrală și poate avea un aport important pentru conservarea resurselor genetice ale speciei.

Capitolul 4: Studiul genetic al populațiilor de pin silvestru din regiunea montană și de podiș din sudul Siberiei Centrale (Pinus sylvestris L.): diversitate și diferențiere.

În acest capitol, a fost studiată diversitatea genetică și structura a opt populații de pin silvestru situate în sudul Siberiei Centrale. Un nivel ridicat de diversitate genetică ($H_E=0,518$) a fost identificat în populațiile analizate. Nu au fost detectate efecte de tip gât de stică, care să fie datorate izolării prin distanță sau ale izolării prin mediu. Cea mai mare diversitate genetică a fost semnalată în interiorul populațiilor, și doar 7% din aceasta între populații. Atât analiza structurii, cât și gruparea UPGMA au arătat existența a două grupuri genetice. Primul grup s-a constituit din două populații din bazinul Minusink și o populație din vestul Munților Sayan, iar al doilea grup s-a constituit din celelalte populații din munții Kuznetsk Alatau, bazinul central Tuva și bazinul Todzha. Rezultatele sugerează că populațiile de pin silvestru studiate pot proveni din două fonduri de gene diferite. Modelul diversității genetice identificat în cadrul cercetărilor poate fi util pentru elaborarea măsurilor de conservare a resurselor genetice ale pinului silvestru din sudul Siberiei Centrale.

1.6. Referințe bibliografice

1. Auckland, L.D., Bui, T., Zhou, Y., Shepherd, M., Williams, C.G. (2002). Conifer microsatellite handbook. Texas A&M University, College Station TX, 57.
2. Belletti, P., Ferrazzini, D., Piotti, A., Monteleone, I., Ducci, F. (2012). Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy. *Eur J For Res* 131, 1127–1138.
3. Bernhardsson, C., Floran, V., Ganea, S.L., García-Gil, (2016). Present genetic structure is congruent with the common origin of distant Scots pine populations in its Romanian distribution. *For Ecol Manag* 361,131-143.
4. Buchovska, J., Danusevičius, D., Baniulis, D., Stanys, V., Šikšnianienė, J.B., Kavaliauskas, D. (2013). The Location of the Northern Glacial Refugium of Scots Pine Based on Mitochondrial DNA markers. *Baltic Forestry* 19 (1), 2-12.
5. Čelepirović, N., Ivankovic, M., Gradecki-Postenjak, M., Nagy, L., Borovics, A., Agbaba, A.N., Littvay, T. (2009). Review of investigation of variability of nad1 gene intron B/C of mitochondrial genome in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Period Biol* 111, 453–457.

6. Cheddadi, R., Vendramin, G. G., Litt, T., François, L., Kageyama, M., Lorentz, S., Laurent, J.-M., de Beaulieu, J.-L., Sadori, L., Jost, A., and Lunt, D. (2006). Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. *Global Ecol. Biogeogr.* 15, 271-282.
7. Dering, M., Kosiński, P., Wyka, T.P., Pers-Kamczyc, E., Boratyński, A., Boratyńska, K., Reich, P.B., Romo, A., Zadworny, M., Żytkowiak, R., Oleksyn, J. (2017). Tertiary remnants and Holocene colonizers: Genetic structure and phylogeography of Scots pine reveal higher genetic diversity in young boreal than in relict Mediterranean populations and a dual colonization of Fennoscandia. *Divers. Distrib.* 23, 540-555.
8. Dering, M., Baranowska, M., Beridze, B., Chybicki, I.J., Danelia, I., Iszkuło, G., Kvartskhava, G., Kosiński, P., Rączka, G., Thomas, P.A. et al. (2021). The evolutionary heritage and ecological uniqueness of Scots pine in the Caucasus ecoregion is at risk of climate changes. *Sci. Rep.* 11, 22845.
9. Dieringer, D., Schlötterer, C. (2003). MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol. Ecol. Notes.* 3, 167–169.
10. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13–15.
11. Dupanloup, I., Schneider, S., and Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571–2581.
12. Earl, D. A., and vonHoldt, B. M. (2012). Structure harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361.
13. Efits, O.A. (2012). Vegetation cover of the Krasnoyarsk krai. Siberian Federal University. 128.
14. Eliades, N.-G., Eliades, D.G. (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for Analysis of Haplotypes Data. Distributed by the Authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding; Georg-Augst University Goettingen: Göttingen, Germany, 18.
15. Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
16. Fang, P., Niu, S., Yuan, H., Li, Z., Zhang, Y., Yuan, L., Li, W. (2014). Development and characterization of 25 454 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (Pinaceae). *Appl. Plant Sci.* 2, 455.
17. FAO (2012). The Russian Federation forest sector. Outlook study to 2030, Rome, Italy, 84.

18. FAO (2014) The state of the world's forest genetic resources. Commission on genetic resources for food and agriculture, Rome, Italy, 277.
19. Gerasimov, I.P., Preobrazhensky, V.S., Richter, G.D. (1964). Middle Siberia. Moscow, 480.
20. González-Martínez, S.C., Robledo-Arnuncio, J.J., Collada, C., Díaz, A., Williams, C.G., Alía, R., Cervera, M.T. (2004). Cross-amplification and sequence variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines. *Theor Appl Genet* 109, 103–111.
21. González Díaz P. (2018). Development and maintenance of genetic diversity in Scots pine, *Pinus sylvestris* (L.). Doctoral thesis. University of Stirling. United Kingdom, 196.
22. Goryachko, M.D., Samoylova, G.S., Kuzminykh, S.V., Fedorova, V.I., Prokinova, A.N., Pavlinov, P.S. (2010). Krasnoyarsk krai. *The Great Russian Encyclopedia*, 5, 630.
23. Goudet, J. (2005). Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol. Ecol. Notes*. 5, 184-186.
24. Ivanov, A.F. (1970). Growth of woody plants and soil acidity. Minsk, 218.
25. Jakobsson, M., and Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801–1806.
26. Jombart, T., Ahmed, I. (2011). Adegnet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27, 3070–3071.
27. Kavaliauskas, D., Danusevičius, D., Baliuckas, V. (2022). New Insight into Genetic Structure and Diversity of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Populations in Lithuania Based on Nuclear, Chloroplast and Mitochondrial DNA Markers. *Forests*. 13, 1179.
28. Kuzhuget, S.K. (2014). Forest landscape - Balgazyn ribbon pine forest. *Science Time* 11, 163-166.
29. Levkina, T.I. (1964). On the question of the relation of seedlings of tree species to the reaction of the environment and liming of soils of forest nurseries. The renewal of forests in deforestation and the cultivation of seedlings in nurseries. Petrozavodsk. 179-202.
30. Leyton, K., Rousseau, L. (1958). Root growth of tree seedlings in relation to aeration. In: K. Thimann (ed.), *The Physiology of Forest Trees*, 467-475.

31. Lučić, A., Popović, V., Neveniċ, M., Ristiċ, D., Rakonjac, L., Ćirković –Mitroviċ, T., Mladenović –Driniċ, S. (2014). Genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Serbia revealed by SSR markers. *Arch Biol Sci* 66, 1485–1492.
32. Lushnikova, O.S., Andreeva, A.A., Zalutsky, D.V., Lysogorsky, K.V., Adygaeva, N.N., Nepomnyashchy, V.V., Shurkina, V.V., Popov, A.A., Ankipovich, E.S., Zlotnikova, T.V., Shanina, E.V., Ivanova, T.V. (2018). State report. Ministry of Natural Resources and Ecology of the Republic of Khakassia, 242.
33. Markatyuk A. A. (2012). The importance of boreal forests located on territories of Eastern Siberia. *Actual problems of the forest complex. Bryansk*, 31, 40-41.
34. Mátyás, C., Ackzell, L., Samuel, C.J.A. (2004). EUFORGEN Technical Guidelines for Genetic Conservation and Use for Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.); International Plant Genetic Resources Institute: Rome, Italy, 6.
35. Miller, M. P. (2005). Alleles in space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J. Hered.* 96, 722–724.
36. Monmonier, M.S. (2010). Maximum-Difference Barriers: An Alternative Numerical Regionalization Method. *Geogr. Anal.* 5, 245–261.
37. Naydenov, K.D., Senneville, S., Beaulieu, J., Trambly, F., Bousquet, J. (2007). Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor. *BMC Evol Biol* 7, 233.
38. Naydenov, K.D., Naydenov, M.K., Tremblay, F., Alexandrov, A., Aubin-Fournier, L.D. (2011). Patterns of genetic diversity that result from bottlenecks in Scots Pine and the implications for local genetic conservation and management practices in Bulgaria. *New Forests* 42, 179-193.
39. Nei, M., Tajima, F., Tateno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.* 19, 153-170.
40. Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., et al. (2022). Package 'vegan': community ecology package.
41. Padutov, V.E. (2001). Genetic resources of pine and spruce of Belarus, monograph, Gomel, 144.
42. Padutov, V. E., Khotyleva, L.V., Baranov, O.Yu., Ivanovskaya, S.I. (2008). Genetic effects of transformation of forest ecosystems. *Ecological Genetics VI* (1), 3-11.

43. Parmuzin, Yu. P. (1964). Middle Siberia. Moscow. 311.
44. Peakall, R., Smouse, P.E. (2006). GenAIEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6, 288–295.
45. Pimenov, A.V. (2015). Biodiversity of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in contrasting ecotopes of the south of Siberia]. Biology Doctoral dissertation. Krasnoyarsk. 406.
46. Piry, S., Luikart, G., and Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. J. Hered. 90, 502–503.
47. Pravdin, L.F. (1964). Scots pine. Moscow. Science. 189.
48. Pritchard, J., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.
49. Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N.J., McNicol, J.W., Forrest, G.I., Cottrell, J., Powell, W. (1998). Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. The Royal Society 265, 1697–705.
50. Pyhäjärvi, T., García-Gil, M.R., Knürr, T., Mikkonen, M., Wachowiak, W., Savolainen, O. (2007). Demographic history has influenced nucleotide diversity in European *Pinus sylvestris* populations. Genetics 177, 1713–1724.
51. R Core Team (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
52. Robledo-Arnuncio, J.J., Collada, C., Alia, R., Gil, L. (2005). Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. Journal of Biogeography 32(4), 595–605.
53. Rysin, L.P., Savelyeva, L.I. (2008). Pine forests of Russia. Moscow. Association of Scientific Publications, 289.
54. Samoylova, G.S. 2017. The nature of Khakassia. The Great Russian Encyclopedia 2004-2017. Osipov, Yu.S. (Ed.) Moscow, 799.
55. Scalfi, M., Piotti, A., Rossi, M., Piovani, P. (2009) Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: The rear edge of the range. Eur. J. Forest Res. 128, 377–386.

56. Sebastiani, F., Pinzauti, F., Kujala, S. T., González-Martínez, S. C., Vendramin, G. G. (2012). Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 231-234.
57. Semerikov, V.L., Semerikova, S.A., Dymshakova, O.S., Zatsepina, K.G., Tarakanov, V.V., Tikhonova, I.V., Ekart, A.K., Vidyakin, A.I., Jamiyansuren, S., Rogovtsev, R.V., et al. (2014). Microsatellite loci polymorphism of chloroplast DNA of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Asia and Eastern Europe. *Russ. J. Genet.* 50, 577–585.
58. Semerikov, V., Semerikova, S., Putintseva, Yu., Tarakanov, V., Tikhonova, I., Vidyakin, A., Oreshkova, N., Krutovsky, K. (2018). Colonization history of Scots pine in Eastern Europe and North Asia based on mitochondrial DNA variation. *Tree Genetics & Genomes* 14, 1-7.
59. Sheller, M., Ciocîrlan, E., Mikhaylov, P., Kulakov, S., Kulakova, N., Ibe, A., Sukhikh, T., Curtu, A.L. (2021). Chloroplast DNA Diversity in Populations of *P. sylvestris* L. from Middle Siberia and the Romanian Carpathians. *Forests* 12, 1757.
60. Shvidenko, A.Z., Schepaschenko, D.G. (2014). Carbon Budget of Russian Forests. *Siberian Journal of Forest Science* 1, 69-92.
61. Snytko, V.A., Konovalova, T.I. (2005). Stability and anthropogenic transformation of taiga geosystems in the South of Central Siberia. *Siberian Ecological Journal* 4, 651-661.
62. Şofletea, N., Mihai, G., Ciocîrlan, E., Curtu, A.L. (2020). Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure in Isolated Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Populations Native to Eastern and Southern Carpathians. *Forests* 11, 1047.
63. Steven, H.M., Carlisle, A. (1959). The native pinewoods of Scotland, 368.
64. The State Coordination Program for the Development of Biotechnology in the Russian Federation for 2011-2020. Approved by the Government of the Russian Federation on 24.04.2012. 67.
65. Thioulouse, J., Dray, S., Dufour, A.B., Siberchicot, A., Jombart, T., Pavoine, S. (2018). Description of Species Structures. In *Multivariate Analysis of Ecological Data with ade4*. Springer: New York, NY, USA, 97–117.
66. Tikhonova, I.V., Mukhortova, L.V., Danilova, I.V., Mikhailova, I.A. (2018). Assessment of Soil Suitability for Growth of Coniferous Forests Species in Tuva Republic. *Russian Journal of Forest Science* 3, 194-209.

67. Tóth, E.G., Köbölkuti, Z.A., Pedryc, A., Höhn, M. (2017). Evolutionary history and phylogeography of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Europe based on molecular markers. *J. For. Res.* 28, 637–651.
68. Venables, W.N., Ripley, B.D. (2013). *Modern Applied Statistics with S-PLUS*; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 5, 1–6.
69. Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P., Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol. Ecol.* 5, 111–114.
70. Wang, I. J. (2013). Examining the full effects of landscape heterogeneity on spatial genetic variation: A multiple matrix regression approach for quantifying geographic and ecological isolation. *Evolution* 67, 3403–3411.
71. Wang, I. J., and Bradburd, G. S. (2014). Isolation by environment. *Mol. Ecol.* 23, 5649–5662.
72. World Wildlife Fund (WWF). <http://www.wwf.ru/forests/eng/> (accessed on 24 June 2023).
73. Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T. (1999). *POPGENE Version 1.32 Microsoft Windows-Based Freeware for Populations Genetic Analysis*; University of Alberta: Edmonton, AB, Canada, 1999.
74. Zelawski, W., Zelawska, B. (1967). Some aspects of the effect of shade on growth of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings of various provenance. *Ecol. Polska ser. A.*, 15.
75. Zhang, D.X., Hewitt, G.M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology* 12(3), 563–584.

Capitolul 2

DIVERSITATEA LA NIVELUL ADN-ULUI CLOROPLASTIC ÎN POPULAȚIILE DE *P. SYLVESTRIS* L. DIN SIBERIA CENTRALĂ ȘI CARPAȚII ROMÂNIEI

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în *Forests Journal* cu modificări minore (Sheller, M.; Ciocîrlan, E.; Mikhaylov, P.; Kulakov, S.; Kulakova, N.; Ibe, A.; Sukhikh, T.; Curtu, A.L. Chloroplast DNA Diversity in Populations of *P. sylvestris* L. from Middle Siberia and the Romanian Carpathians. *Forests*. 2021, 12, 1757. Q1, Impact Factor – 2.9 <https://doi.org/10.3390/f12121757>)

2.1. Introducere

Diversitatea genetică este baza stabilității biologice și permite speciilor să evolueze și să se adapteze la schimbările de mediu (FAO 2014). Cunoașterea structurii genetice și a nivelului de variabilitate genetică a populațiilor este relevantă pentru dezvoltarea măsurilor care vizează conservarea diversității genetice a speciilor (Altukhov 2004).

Pinul silvestru (*Pinus sylvestris* L.) este una dintre speciile cheie în ecosistemele forestiere din regiunile boreale din Eurasia. Este de mare importanță ecologică și economică și este adaptată la o varietate de condiții de mediu (Naydenov et al. 2007, Dering et al. 2017). Pinul silvestru este o specie monoică, polenizată de vânt (Robledo-Arnuncio et al. 2005, Sebastiani et al. 2012, Șofletea et al. 2020). De obicei formează păduri pure extinse sau de amestec cu mesteacăn și alte specii de rășinoase (Olsson 2019). În acest studiu, s-au folosit markeri cloroplastici de tipul microsateiților pentru a caracteriza nivelul diversității genetice a populațiilor de pin silvestru din două regiuni geografice ale arealului natural Eurasiatic, regiuni diferite din punct de vedere ecologic și evolutiv. Mai exact, s-au avut în vedere următoarele ipoteze: (1) Care este modelul diversității și structurii genetice în populațiile de pin silvestru din Siberia Centrală și Carpații României? (2) Cât de mare este gradul de diferențiere genetică între cele două regiuni de distribuție a pinului silvestru la nivelul ADN-ului cloroplastic?

2.2. Material și metode

2.2.1. Material Vegetal

Au fost analizate 19 populații de pin silvestru din arealul natural a pinului silvestru din Siberia Centrală și Carpații României (figura 1.5). Pinul silvestru este specie dominantă în toate populațiile studiate. Patru dintre populații (VAN2, VAN1, CHU și BORZ) sunt situate în zona de taiga, trei (SUK2, SUK1 și ZEL) cresc în zona de silvostepă și opt (UYA, SHA, NAR, KOS, SAR, YRB, BAL1 și BAL2) sunt distribuite în zona montană din sudul Siberiei și patru populații relictice de pin silvestru (POI, CHE, RET, LOT) sunt situate în sudul și estul Carpaților României. Au fost aleși aleatoriu 10 arbori adulți din fiecare populație. În consecință, numărul total de indivizi analizați a fost de 190. Frunzele colectate au fost puse în pungi cu silicagel până când s-a efectuat extracția ADN-ului.

2.2.2. Analiza moleculară

ADN-ul a fost extras din ace uscate utilizând metoda CTAB (Doyle și Doyle 1990). Pentru analiza genetică au fost aleși zece microsateți cloroplastici: PCP45071, PCP36567, PCP48256, PCP41131, PCP30277, PCP26106, Pt1254, Pt15169, Pt71936, Pt7268 (Vendramin et al. 1996, Provan și colab. 1998). Markerii cpSSR au fost amplificați în două reacții PCR în volum total de 10-12 μ l, cu ajutorul kitului PCR Multiplex Qiagen (Qiagen, Germania) în condițiile recomandate de producător. Fragmentele amplificate au fost analizate pe un analizor genetic Beckman Coulter (Fullerton, CA) pe baza protocolului recomandat de producător. Dimensionarea fragmentelor a fost efectuată utilizând software-ul GenomeLab GeXP (versiunea 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA).

2.2.3. Analiza statistică

Parametrii diversității și structurii genetice au fost calculați folosind următoarele programe: POPGENE ver. 1.31 (Yeh și colab. 1999), GenAlEx V.6. 5 (Peakall și Smouse 2006), HAPLOTYPE ANALYSIS ver. 1.05 (Eliades și Eliades 2009), STATISTICA V.8 (Pai 2007), STRUCTURE ver.2.3.4 (Pritchard și colab. 2000).

2.3. Rezultate

Analiza la nivel cloroplastic a 190 de arbori de pin silvestru a permis identificarea a 158 de haplotipuri de ADN cloroplastic. Majoritatea haplotipurilor (85%) au fost detectate o singură dată (haplotipuri unice). În cele patru populații din Carpații României și în trei populații din Siberia (CHU, ZEL și UYA) s-au identificat cel mai mare număr de haplotipuri private (9). Cel mai mic număr de haplotipuri private (5) a fost înregistrat la două populații siberiene (populațiile SUK1 și BAL1). Au fost identificate trei haplotipuri comune (H86, H107, H118) în două populații siberiene (NAR și BAL2) și trei populații carpatice (POI, CHE și RET) (tabelul S2.1).

Distanța genetică Nei a avut valori de la 0,0032 (NAR/KOS) la 0,2441 (VAN 1/POOL) (tabelul S2.2). Gruparea UPGMA reliefează existența a două grupuri (figura 2.1.). În primul grup se regăsesc cele 15 populații din Siberia Centrală, iar în cel de-al doilea grup cele 4 populații carpatice.

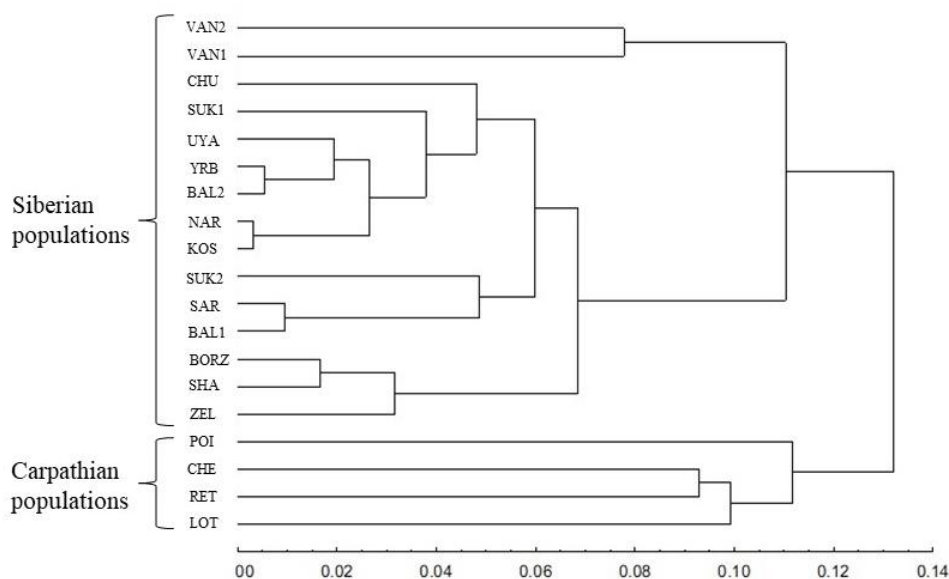


Figura 2.1. Dendrograma UPGMA pe baza distanțelor genetice Nei între populațiile de pin silvestru analizate.

Analiza moleculară a varianței (AMOVA) a arătat că variația dintre cele două regiuni geografice (Siberia Centrală și Munții Carpați) a reprezentat 5% din varianța totală. Rezultatele analizei AMOVA sugerează o diferențiere mai mică între populații siberiene ($\Phi_{iPT} = 3\%$, $p < 0,05$) comparativ cu populațiile carpatice ($\Phi_{iPT} = 6\%$; $p < 0,01$).

Analiza structurii populațiilor de pin silvestru din Siberia și Carpați a arătat că numărul de grupuri identificat este trei ($K = 3$) (figura 4). Toți indivizii analizați au prezentat genotipuri intermediare. Pentru $K = 3$, arborii din populațiile siberiene sunt alocați într-un număr mai mare în clusterul 3 (culoare albastră), comparative cu populațiile carpatice la care cel mai mare număr de indivizi este alocat clusterului-ului 1 (culoare roșie) (figura 2.2.).

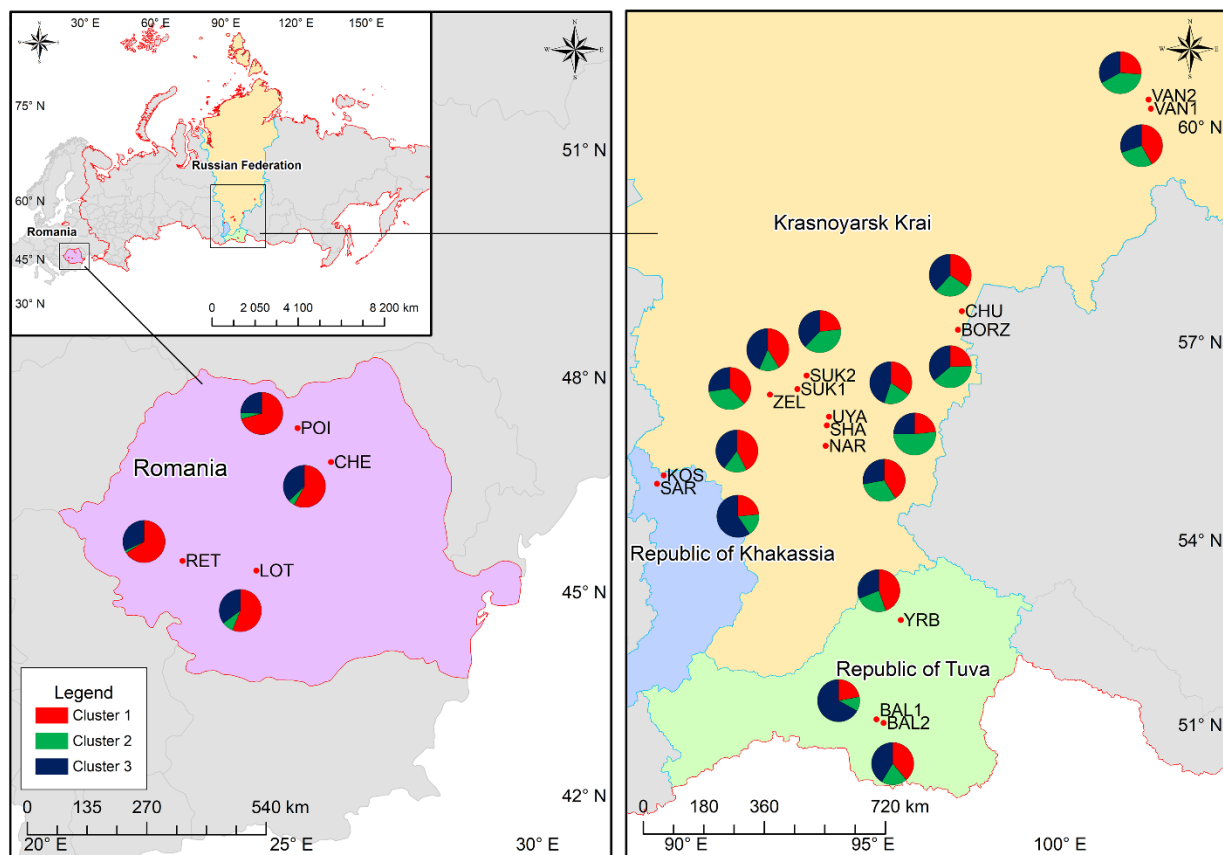


Figura 2.2. Localizarea geografică a populațiilor de pin silvestru studiate în Siberia Centrală și Carpații României. Populațiile de pin silvestru sunt semnalate prin puncte roșii. Diagramele arată proporțiile medii de apartenență la cluster a indivizilor analizați în fiecare dintre cele 19 populații de pin silvestru pentru $K = 3$.

Analiza corelației dintre distanța genetică și distanța geografică pentru populațiile studiate folosind testul Mantel, evidențiază pe de o parte faptul că există o corelație scăzută, dar semnificativă între diferențierea genetică și distanța geografică la populațiile din Siberia ($R_2 = 0,1746$, $p < 0,01$), iar pe de altă parte faptul că nu există o corelație semnificativă între distanța genetică și distanța geografică pentru populațiile carpatice ($R_2 = 0,0059$, $p > 0,05$).

2.4. Discuții

Rezultatele analizelor indică o diversitate genetică ridicată ($H_{CP} = 0,91-1,00$) la toate populațiile de pin silvestru studiate. În Siberia Centrală, populații cele mai nordice (2 populații) au prezentat o valoare puțin mai mare a diversității ($H_{CP} = 1,00$) comparative cu populațiile cele mai sudice (2 populații) ($H_{CP} = 0,91$ și $H_{CP} = 0,98$, respectiv). Cel mai mic număr de haplotipuri (7) a fost detectat în populația BAL1 - cea mai sudică pădure de pin din Asia de Nord. Incendiile locale, care au avut loc între 1988 și 2014, pot fi cauza reducerii numărului de haplotipuri observate la populația BAL1 (Kuular și Namzyn 2015, Kuzhuget 2014). Scăderea dimensiunii populației, cauzată de incendii, exploatarea forestieră, boli sau poluarea mediului poate duce la scăderea diversității genetice (Ellstrand și Elam 1993). O altă explicație ar fi dimensiunea relativ mică a eșantionului (10 arbori pe populație).

AMOVA reliefează un nivel scăzut al structurii genetice ($\Phi_{PT} = 3\%$) pentru cele 15 populații siberiene, chiar dacă acestea se află la distanțe de peste 1000 km. Analiza bayesiană reliefează o structură genetică slabă între cele două regiuni geografice, chiar dacă s-au identificat 3 grupuri de apartenență a indivizilor. Această este în concordanță cu gruparea reliefată de dendrograma UPGMA.

Analiza genetică la nivelul ADN-ului cloroplastic, indică faptul că există o diversitate genetică ridicată a indivizilor în populațiile de pin silvestru din Siberia Centrală și Carpații României și că, în ciuda distanțelor geografice mari și a barierelor, există o diferențiere genetică limitată.

2.5. Concluzii

În studiul de față, 10 markeri cpSSR au fost utilizați pentru a estima diversitatea genetică pentru 19 populații naturale de pin silvestru din Siberia Centrală și Carpații României. Toate populațiile au prezentat niveluri ridicate de diversitate genetică. Cu toate acestea, una dintre cele mai sudice populații siberiene a prezentat cea mai mică valoare a diversității haplotipice. În consecință, performanța acestei populații de pin silvestru ar trebui să fie punctul central al studiului pe termen lung care vizează monitorizarea dinamicii populației. Studiul nostru poate contribui la dezvoltarea unei strategii de gestionare durabilă a resurselor genetice de pin silvestru în Siberia Centrală și Carpații României.

2.6. Referințe bibliografice

1. Altukhov, Y.P. (2004) Dynamics of gene pools under anthropogenic influences. Vestnik VOGiS 8, 40–59.
2. Dering, M., Kosiński, P., Wyka, T.P., Pers-Kamczyc, E., Boratyński, A., Boratyńska, K., Reich, P.B., Romo, A., Zadworny, M., Żytkowiak, R., Oleksyn, J. (2017). Tertiary remnants and Holocene colonizers: Genetic structure and phylogeography of Scots pine reveal higher genetic diversity in young boreal than in relict Mediterranean populations and a dual colonization of Fennoscandia. Diversity and Distributions. 23,540–555.
3. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13–15.
4. Eliades, N-G., Eliades, D.G. (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotypes data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-Augst University Goettingen, Germany. 18.
5. Ellstrand, N.C., Elam, D.R. (1993). Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. Annu. Rev. Ecol. Syst. 24,217–242.49. Prishnivskaya, Ya.; Nassonova, E.; Vasileva, Yu.; Boronnikova, S. (2019). Selecting of Polymorphic Loci of Genome for Identification of Populations of *Pinus sylvestris* L. on East-Europe Plain. Bulletin of Science and Practice 5, 25-30.
6. Kuular, K.B. and Namzyn, S.A. (2015). Climatology and anthropogeny dynamics of Balgazyn ribbon pine forest. Interexpo Geo-Sib. 4,25–28.
7. Kuzhuget, S.K. (2014). Forest landscape - Balgazyn ribbon pine forest. Science Time 11, 163–166.
8. Naydenov, K.D., Senneville, S., Beaulieu, J., Trambly, F., Bousquet, J. (2007). Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor. BMC Evol Biol 7,233.
9. Olsson, J. (2019). Genetic diversity and hardiness in Scots pine from Scandinavia to Russia. Master thesis in Ecology. Umeå University, Sweden.
10. Peakall, R., Smouse, P.E. (2006). GenAIEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6, 288–295.

11. Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
12. Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N.J., McNicol, J.W., Forrest, G.I., Cottrell, J., Powell, W. (1998). Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *The Royal Society* 265,1697–705.
13. Robledo-Arnuncio, J.J., Collada, C., Alia, R., Gil, L. (2005). Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography* 32(4), 595–605.
14. Sebastiani, F., Pinzauti, F., Kujala, S.T., González-Martínez, S.C., Vendramin, G.G. (2012). Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conserv Genet Resour* 4,231–234.
15. Şofletea, N., Mihai, G., Ciocîrlan, E., Curtu, A.L. (2020). Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure in Isolated Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Populations Native to Eastern and Southern Carpathians. *Forests* 11,1047.
16. Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P., Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol. Ecol.* 5,111–114.
17. Weiß, C.H. (2007). StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. *Asta Adv. Stat. Anal.* 91, 339–341.
18. Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T. (1999). POPGENE Version 1.32 Microsoft Windows-Based Freeware for Populations Genetic Analysis; University of Alberta: Edmonton, AB, Canada, 1999.

2.7. Material suplimentar

Tabelul S2. 1. Frecvența celor 17 haplotipuri comune în cadrul populațiilor de pin silvestru

No.	Haplotip *	Cod	Populație																		
			VAN2	VAN1	CHU	BORZ	SUK2	SUK1	ZEL	UYA	SHA	NAR	KOS	SAR	YRB	BAL1	BAL2	POI	CHE	RET	LOT
1	112/120/138/137/147/154/64/124 /147/164	H41					0.1	0.1													
2	112/120/138/137/147/154/64/126 /147/164	H42					0.1									0.1					
3	113/119/138/137/146/154/64/128 /147/164	H59	0.1											0.1							
4	113/119/138/137/147/154/63/126 /147/164	H62												0.1	0.1						
5	113/119/138/137/147/154/64/126 /147/164	H64		0.1				0.1						0.1							
6	113/119/138/139/147/153/64/125 /148/164	H68	0.1	0.1																	
7	113/120/138/137/146/154/64/125 /147/164	H85				0.1						0.1									
8	113/120/138/137/146/154/64/126 /147/164	H86														0.1			0.1		
9	113/120/138/137/147/153/65/125 /147/164	H100										0.1			0.1						
10	113/120/138/137/147/154/64/124 /148/164	H107										0.1							0.1		
11	113/120/138/137/147/154/64/126 /147/164	H112	0.1				0.1	0.2		0.1			0.1			0.3					

12	113/120/138/137/147/154/64/127 /146/165	H116							0.1						0.1						
13	113/120/138/137/147/154/64/127 /148/164	H117								0.1	0.1										
14	113/120/138/137/147/154/64/128 /147/165	H118									0.1						0.1				
15	113/120/138/137/147/155/64/126 /148/164	H122			0.1	0.1										0.1					
16	113/120/138/138/147/153/64/125 /148/164	H130		0.1								0.1									
17	113/120/139/137/147/154/64/127 /149/166	H149					0.1	0.1													

* A doua coloană prezintă dimensiunile în perechi de baze ale alelelor la fiecare dintre cei zece markeri studiați (PCP36567, PCP48256, PCP41131, PCP30277, PCP26106, PCP45071, Pt1254, Pt15169, Pt71936 și, respectiv, Pt87268).

Tabelul S2. 2. Distanțele genetice Nei între cele 19 populații de pin silvestru analizate

ID	VAN2	VAN1	CHU	BORZ	SUK2	SUK1	ZEL	UYA	SHA	NAR	KOS	SAR	YRB	BAL1	BAL2	POI	CHE	RET	LOT
VAN2	****																		
VAN1	0.0778	****																	
CHU	0.0916	0.1095	****																
BORZ	0.0729	0.1117	0.0643	****															
SUK2	0.1287	0.1956	0.053	0.0451	****														
SUK1	0.076	0.1335	0.0444	0.0608	0.0587	****													
ZEL	0.1036	0.0673	0.0506	0.0206	0.0688	0.0713	****												
UYA	0.0959	0.1541	0.058	0.05	0.06	0.0353	0.0473	****											
SHA	0.0909	0.1042	0.0828	0.0167	0.073	0.1325	0.0427	0.0989	****										
NAR	0.0531	0.0935	0.0491	0.0183	0.0571	0.0535	0.0171	0.0333	0.0636	****									
KOS	0.0068	0.0699	0.0395	0.0385	0.0792	0.011	0.0549	0.0318	0.0789	0.0032	****								
SAR	0.095	0.1642	0.0788	0.0565	0.0525	0.0536	0.0871	0.029	0.1048	0.0667	0.0606	****							
YRB	0.1192	0.1314	0.0539	0.0515	0.0822	0.057	0.0462	0.0261	0.0684	0.0332	0.0219	0.0601	****						
BAL1	0.1182	0.1973	0.0753	0.0564	0.0448	0.0389	0.1145	0.0294	0.1144	0.0779	0.0581	0.0095	0.0692	****					
BAL2	0.0929	0.1906	0.0431	0.0481	0.0849	0.0327	0.0859	0.0129	0.103	0.0265	0.0123	0.0491	0.0055	0.0334	****				
POI	0.1841	0.2441	0.1657	0.1345	0.1971	0.1549	0.1042	0.0485	0.1822	0.0662	0.1078	0.1351	0.0652	0.1483	0.0654	****			
CHE	0.145	0.1566	0.1389	0.1495	0.1884	0.139	0.1235	0.0926	0.1825	0.1072	0.1077	0.0936	0.1652	0.1264	0.1249	0.097	****		
RET	0.113	0.1777	0.1023	0.1662	0.1911	0.0823	0.1095	0.0666	0.1974	0.1152	0.0678	0.1436	0.1196	0.1458	0.1003	0.1035	0.0928	****	
LOT	0.1483	0.2324	0.1467	0.1627	0.1929	0.12	0.1363	0.0959	0.1849	0.1018	0.0718	0.1029	0.1106	0.117	0.0531	0.1348	0.095	0.1034	****

CAPITOLUL 3

DIVERSITATEA GENETICĂ ȘI STRUCTURA POPULAȚIILOR DE PIN SILVESTRU (*PINUS SYLVESTRIS* L.) ÎN SIBERIA CENTRALĂ

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în revista *Forests*, cu modificări minore (Sheller, M.; Tóth, E.G.; Ciocîrlan, E.; Mikhaylov, P.; Kulakov, S.; Kulakova, N.; Melnichenko, N.; Ibe, A.; Sukhikh, T.; Curtu, A.L. Genetic Diversity and Population Structure of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in Middle Siberia. *Forests* 2023, 14, 119. Q1, Impact Factor – 2.9. <https://doi.org/10.3390/f14010119>)

3.1 Introducere

Diversitatea genetică este importantă pentru supraviețuirea pe termen lung a speciilor și joacă un rol cheie în conservarea lor (Spielman et al. 2004). Poate contribui la adaptabilitatea speciilor și poate crește șansele ca cel puțin o parte din indivizii dintr-o populație să fie capabili să reziste schimbărilor condițiilor de mediu (Radu et al. 2014). Astfel, pentru a conserva eficient diversitatea genetică a unei specii, ar trebui definit nivelul diversității genetice (Graudal et al. 2020).

Pinul silvestru este una dintre cele mai răspândite specii de arbori din pădurea boreală din Eurasia. Are o mare importanță ecologică, economică și socială (Șofletea et al. 2020, Sheller et al. 2021, Vasilyeva și colab. 2021, Przybylski și colab. 2022). În Rusia, pădurile de pin silvestru sunt pe primul loc în ceea ce privește producția de lemn, iar pentru regenerarea acestora tratamentul tăierilor rase este utilizat pe scară largă (Markatyuk et al. 2013). În același timp, procesele de reîmpădurire sunt întârziate, cu o succesiune nedorită de specii de arbori (Markatyuk et al. 2013). Din cauza perturbărilor naturale (în principal incendii forestiere), exploatare excesivă și gestionare defectuoasă, suprafața pădurilor de pin din Rusia a scăzut cu două milioane ha în ultimii zece ani (Jurnalul Parlamentului 2022). Prin urmare, studiul resurselor genetice ale pinului silvestru în Rusia este foarte relevant pentru o utilizare durabilă în programele de ameliorare și conservare (Ilyinov și Raevsky 2016, torbik et al. 2019).

În acest studiu, s-a analizat diversitatea genetică și structura populației pentru 17 populații de pin silvestru din Rusia, din diferite zone ale arealului natural, folosind markeri nucleari de tipul microsateleților. Au fost abordate următoarele întrebări: (i) care este nivelul actual de diversitate

genetică și diferențiere în cadrul și între populațiile de pin silvestru din Rusia? (ii) există o structură genetică în rândul populațiilor studiate?

3.2. Material și metode

3.2.1. Material vegetal

Materialul vegetal s-a colectat de la 17 populații naturale de pin silvestru. Dintre acestea, 14 populații s-au selectat din Siberia Centrală (BAR, VAN 2, VAN1, CHU, BORZ, SUK2, SUK1, ZEL, NAR, KOS, SAR, SHAT, YRB, BAL1) și trei populații din: partea europeană a Rusiei (SHAT), una din Siberia de Vest (ARO) și una din Extremul Orient al Rusiei (SVO) (figura 1.5). Distanțele geografice între populații au variat de la 14 km (VIN2 și VIN1) până la 9656 km (SHAT și SVO). Inițial, 510 arbori au fost eșantionați, dar ulterior din cauza erorilor PCR numărul de arbori analizați a fost redus la 406.

3.2.2. Extragerea ADN-ului și genotiparea microsateliților

Extragerea ADN-ului s-a realizat prin metoda CTAB (Doyle și Doyle 1990). Pentru analiză s-au utilizat 10 perechi de markeri SSR: Pysl16, Pysl17, Pysl42, Pysl44, Pysl57 (Sebastiani et al. 2012); PtTX2146 (Elsik et al. 2000); PtTX4001 (Zhou et al. 2002); lw_isotig04195, lw_isotig04306, lw_isotig07383 (Fang și colab. 2014). Markerii au fost grupați în 3 multiplexe de analiză: setul 1 format din Pysl44, Pysl57 și Lw_isotig04306; setul 2 format din Pysl16, PtTX2146 și lw_isotig07383; setul 3 format din Pysl17, Pysl42, lw_isotig04195 și PtTX4001. Genotiparea indivizilor a fost efectuată utilizând software-ul GenomeLab GeXP (versiunea 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA, SUA).

3.2.3. Analiza datelor

Parametrii diversității și structurii genetice au fost calculați utilizând următoarele programe: Micro-Checker (Van Oosterhout et al. 2006), GenAlex v.6.5 (Peakall și Smouse 2006), R (R Core Team 2013),

STRUCTURE V.2.3.4 (Pritchard et al. 2000), CLUMPP v.1.1.2. (Jakobsson și Rosenberg 2007), BARRIER V.2.2 (Manni și colab. 2004).

3.3. Rezultate

Numărul mediu de alele identificate a avut valori cuprinse între 4,0 (SUK1) și 5,5 (BOR), cu o medie la nivelul populațiilor analizate de 4,6. Numărul efectiv de alele (M_e) a înregistrat valori de la 2.045 în populația SVO până la 2.869 în populația SHAT, cu o medie de 2.494. Indicele Shannon (H) a avut valori de la 0,822 (SVO) la 1,133 (SHAT). Cea mai mică valoare a bogăției alelice ($A_R = 3,505$) a fost înregistrată în populația SVO, iar cea mai mare valoare în populația VAN2 ($A_R = 4,764$). Heterozigoția așteptată (H_e) a avut valori cuprinse între 0,433 (SVO) și 0,580 (SHAT). Coeficientul de consangvinizare (F_{IS}) a indicat un exces de homozigoți în populațiile BOR, VAN2, SUK1, NAR și KOS.

Analiza varianței moleculare (AMOVA) arată o diferențiere genetică ridicată în interiorul populațiilor (95%) și o diferențiere scăzută între populații (5%). Testul Mantel reliefează o corelație semnificativă între distanța genetică și geografică în populațiile analizate ($R^2 = 0,43$, $p = 0,01$). De asemenea, s-a constatat că numărul de migranți pe generație (Nm) este de 2,331 și că există un nivel mai ridicat de diferențiere genetică între cele mai distanțate populații (SHAT și SVO) ($F_{ST} = 0,097$, $p = 0,001$).

Cea mai mare valoare ΔK a fost observată pentru $K = 2$, dar a fost identificat un al doilea vârf ΔK mai mic pentru $K = 5$, indicând existența unor subcluster în setul de date (figura 3.1 A, B). Populațiile au fost grupate mai întâi pentru $K = 2$, apoi pentru $K = 5$ (Figura 3.1 C). Pentru $K = 2$, un grup corespunde în mod clar populației SHAT (culoare portocalie) și unul celor 15 populații siberiene (culoare albastră). Indivizii din populația BOR prezintă genotipuri intermediare. La nivel de subcluster cele mai îndepărtate populații SHAT, SVO, BAL, BOR și ARO au format cluster distincte, în timp ce indivizii din populațiile rămase au prezentat genotipuri intermediare. Pentru $K = 5$, populațiile SHAT, BOR, BAL și SVO au fost clar separate de restul populațiilor de pin silvestru (figura 3.1 D).

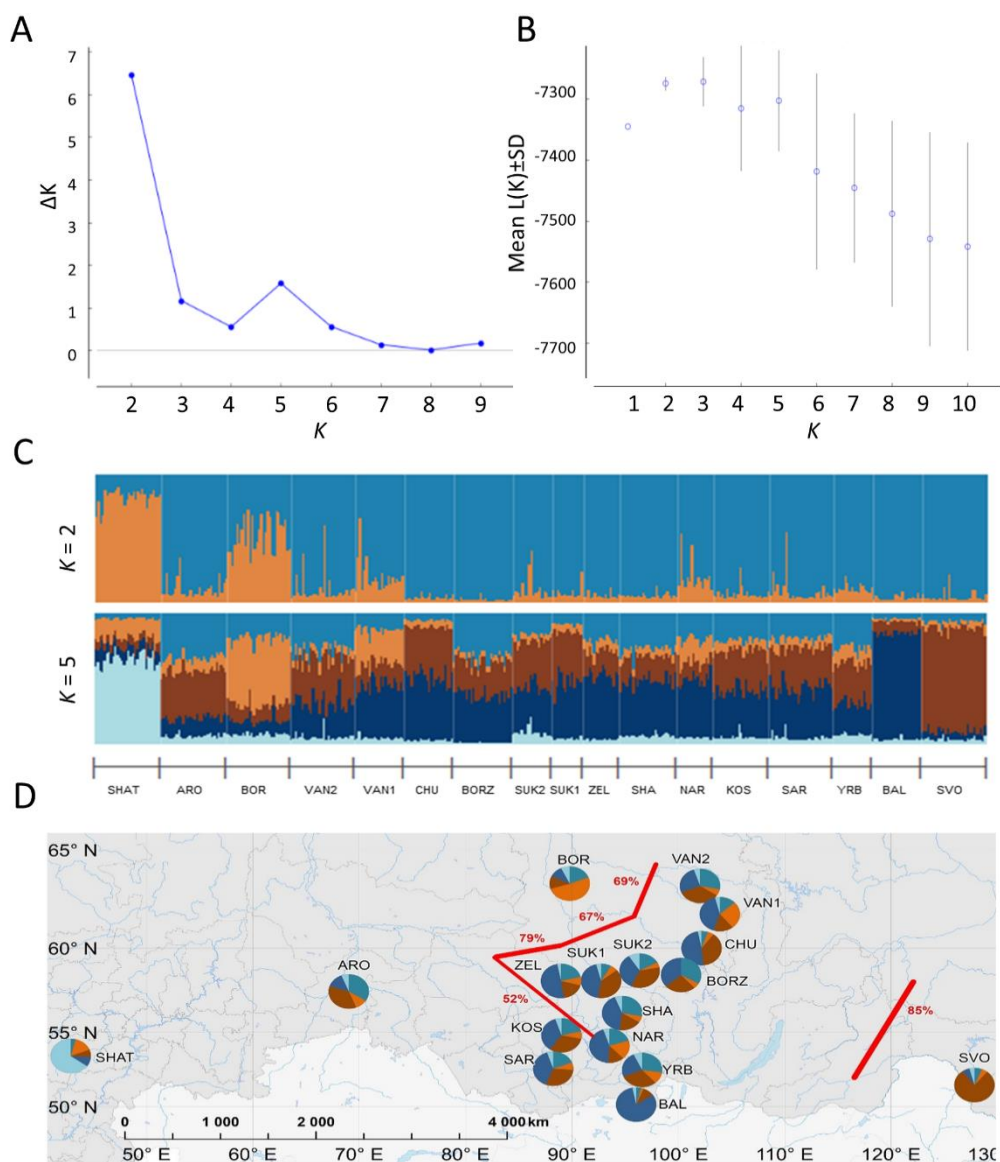


Figura 3.1. Rezultatele analizei structurii genetice pentru cele 17 populații de pin silvestru. (A) structura populației pentru $K = 2$ și $K = 5$. (B) estimarea numărului de cluster pe baza valorilor ΔK și $L(K) \pm SD$. (C) Diagrama structurii genetice pentru $K = 2$ și $K = 5$. Culoarea albastru deschis, albastru, albastru închis, portocaliu și maro corespund clusterelor identificate. (D) distribuția geografică a celor cinci cluster genetice și a celor două bariere identificate (barierele sunt prezentate cu linii roșii și cu valori bootstrap).

Au fost detectate două bariere cu valori bootstrap între 50% și 90%, utilizând software-ul Barrier (figura 3.1 D). Prima barieră cu cea mai mare valoare bootstrap (85%) separă populația cea mai estică (SVO) de celelalte. A doua barieră, cu valori bootstrap între 52% și 79%, delimitează populațiile SHAT, ARO, BOR, KOS și SAR. Toate celelalte bariere dintre populații au fost slabe și au prezentat o separare nesemnificativă cu valori bootstrap $< 50\%$.

Analiza UPGMA a confirmat rezultatele analizei bayesiene pentru $K=2$, separând populația SHAT de toate celelalte (figura 3.2 a). De asemenea, a arătat asemănări cu analiza de structură pentru $K=5$ în care populațiile SHAT, ARO, BOR, KOS și SAR s-au diferențiat de restul populațiilor. Concordanțele au fost de asemenea evidente pe matricea indicelui de diferențiere F_{ST} , unde cele mai mari valori au fost detectate pentru acele populații care au fost separate în cadrul dendrogramei UPGMA (figura 3.2 B).

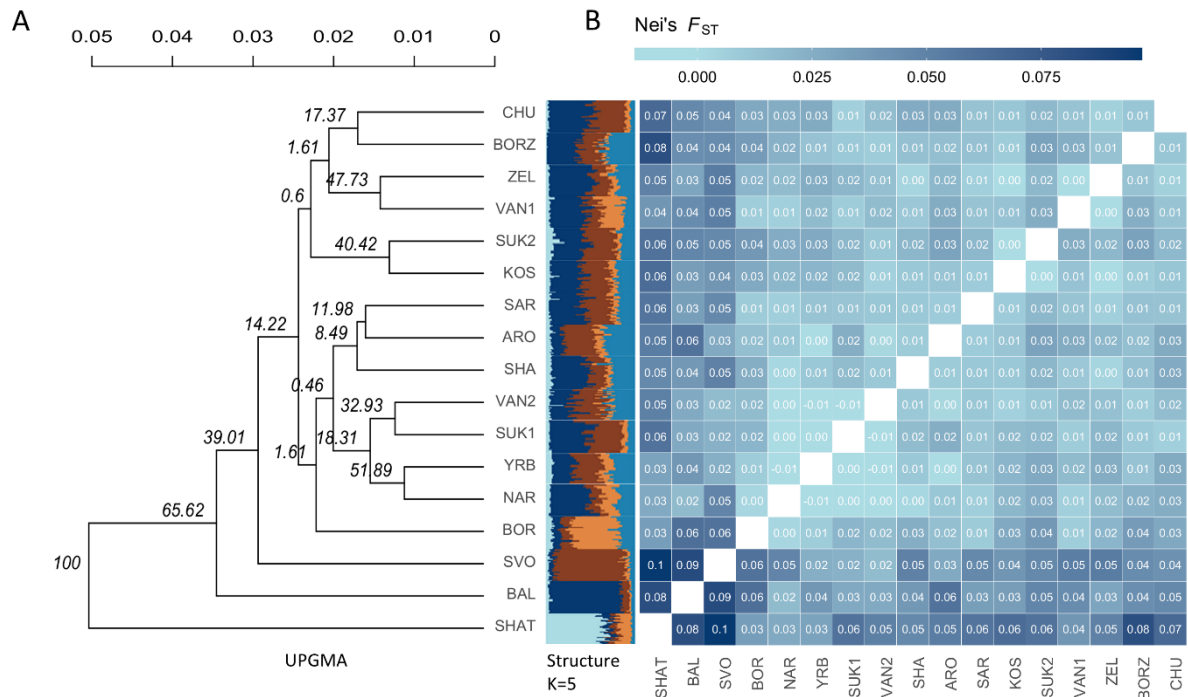


Figura 3.2. Dendrograma UPGMA cu valori bootstrap (A), alocarea indivizilor la cele 5 cluster - $K=5$ (culorile albastru deschis, albastru, albastru închis, portocaliu și maro corespund diferitelor cluster) și matricea de diferențiere a indicilor F_{ST} între cele 17 populații de pin silvestru investigate (culoarea albastră mai închisă înseamnă nivelul mai ridicat de diferențiere genetică între populații) (B).

Primele trei axe ale analizei coordonatelor principale (PCoA) au reprezentat 76,93% din variabilitatea cumulată (figura 3.3). Clusterelor distinse prin analiza PCoA s-au dovedit a fi similare cu rezultatele analizei structurii la $K=5$. La primele două axe, care au explicat 63,12% din variabilitatea totală, populația din partea europeană a Rusiei (SHAT), populația celei mai estice (SVO) și cea mai sudică (BAL) au fost separate. Acest model a fost confirmat de a doua și a treia axă. Populațiile rămase din partea centrală a Siberiei și din partea asiatică a Rusiei nu au fost separate.

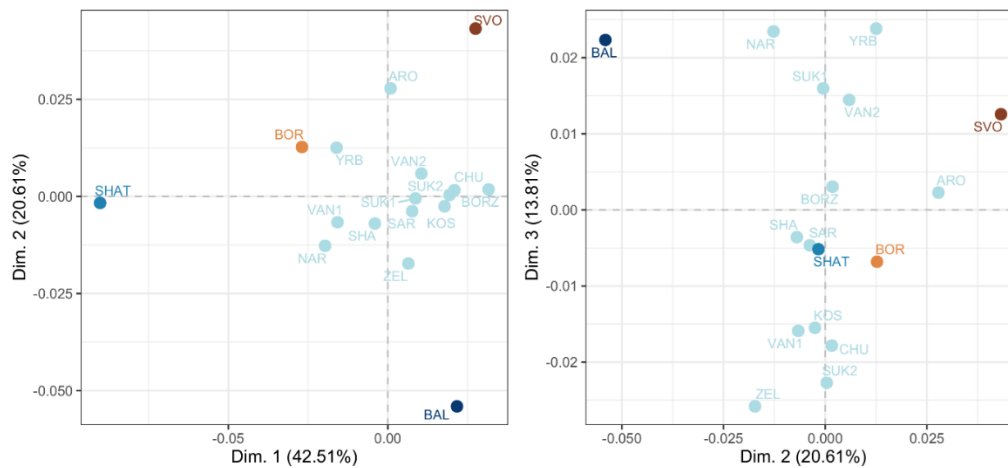


Figura 3.3. Graficul bidimensional al celor trei componente principale și procentul din variabilitatea totală utilizând analiza coordonatelor principale (PCoA). Prima și a doua coordonată principală au reprezentat 63,12% din variabilitatea totală (A). A doua și a treia coordonată principală au reprezentat 34,42% din variabilitatea totală (B).

Testul Mantel a identificat o corelație semnificativă între indicii de diferențiere F_{ST} și distanțele geografice dintre populații ($R_2 = 0,429$, $p = 0,008$), indicând faptul că diferențierea genetică între populații crește semnificativ odată cu distanța geografică. Cu toate acestea, estimarea indicelui de densitate kernel 2D a indicat pete în loc de un nor continuu, sugerând discontinuitate genetică. Populația SHAT, fiind cea mai îndepărtată populație din punct de vedere geografic, a prezentat discontinuitate în ceea ce privește diferențierea genetică și segregarea spațială.

3.4. Discuție

Diversitatea genetică și structura populațiilor de pin silvestru din diferite părți ale Rusiei au fost evaluate pe baza polimorfismului a opt markeri nucleari de tipul microsateliților. Cea mai mare diversitate genetică a fost observată la populația situată în partea europeană a Rusiei SHAT ($H_E = 0,580$), iar ce cea mai mică diversitate genetică a fost detectată la populația din Extremul Orient al Rusiei SVO ($H_E = 0,433$). Studiile anterioare efectuate la pinul silvestru pe baza markerilor ADN mitocondrial și cloroplastic indică, de asemenea, o scădere a diversității genetice în populațiile de pin silvestru din Asia în comparație cu cele europene (Semerikov et al. 2014; Semerikov et al. 2018). Semerikov et al. (2014) a sugerat că acest fapt ar putea fi rezultatul pierderii variabilității genetice din cauza unor blocaje de tip bottleneck în timpul distribuției spre est a speciilor.

AMOVA a arătat că doar 5% din variația genetică totală este datorată diferențelor între populații, chiar dacă acestea sunt distribuite la distanțe de până la 9656 km. Probabil, fluxul de gene pe distanțe mari fără bariere geografice semnificative poate avea un efect de omogenizare asupra fondului genetic al populațiilor de pin silvestru.

Programul STRUCTURE, a permis identificare a două sau cinci cluster genetice. Pentru $K = 2$, toate populațiile siberiene, cu excepția populației BOR, au fost grupate într-un singur cluster, în timp ce o populație din partea europeană a Rusiei (SHAT) s-a individualizat. Prezența a două grupuri genetice în populațiile de pin silvestru studiate a fost, de asemenea, confirmată prin analiza UPGMA. Gruparea populațiilor siberiene studiate într-un singur grup ar putea indica originea lor comună. Cu toate acestea, pe baza rezultatelor structurii pentru $K = 5$, populațiile de pin silvestru studiate au fost separate în cinci grupuri genetice distincte, după cum urmează: partea europeană a Rusiei (SHAT), sudul Siberiei mijlocii (BAL), nord-vestul Siberiei mijlocii (BOR), Siberia de Vest și Centrală (13 populații) și Extremul Orient al Rusiei (SVO).

Rezultatele indică faptul că, în ciuda diversității genetice echilibrate și a fluxului genetic substanțial în rândul populațiilor de pin silvestru din Rusia, există dovezi ale diferențierii genetice la nivel nuclear. Principalul factor care contribuie la aceasta este cel mai probabil separarea spațială a populațiilor datorită distanțelor geografice mari, ceea ce a fost confirmat de ipoteza noastră semnificativă de izolare prin distanță, precum și de valorile F_{ST} ridicate pentru populațiile SHAT, BOR, BAL, SVO. Acesta ar putea fi un posibil mecanism care modelează distribuția actuală a diversității genetice. De asemenea, ar trebui luată în considerare posibilitatea ca populațiile îndepărtate să fi provenit din refugii glaciare diferite și, prin urmare, să aibă origini diferite.

3.5. Concluzii

Studiul arată faptul că populațiile siberiene de pin silvestru adăpostesc o diversitate genetică mare, în ciuda faptului că au un nivel scăzut de diferențiere genetică la nivelul arelului mare de distribuție în partea Eurasiatică. Diversitatea genetică a scăzut de la vest la est, iar populația cea mai estică a prezentat cel mai scăzut nivel de diversitate genetică și bogăție alelică. Modelele de diferențiere au indicat grupuri genetice separate pentru populațiile de pin silvestru din partea europeană a Rusiei,

sudul Siberiei Centrale, nord-vestul Siberiei Centrale, Siberia de Vest și Centrală și Extremul Orient al Rusiei. În aceste regiuni, pe lângă separarea spațială care a indicat restricții privind fluxul de gene, evenimentele demografice din trecut au afectat, de asemenea, variația genetică. Rezultatele cercetării pot fi utilizate în monitorizarea pe termen lung a stării resurselor genetice de pin silvestru din Rusia și pot oferi directive pentru studiile viitoare de genetică populațională. În plus, studii suplimentare în care să fie incluse mai multe populații din aceste regiuni ar putea oferi informații privind principală sursă de variație genetică și pot oferi informații despre variația genetică adaptativă a populațiilor de pin silvestru.

3.6. Referințe

1. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12,13–15.
2. Elsik, C.G., Minihan, V.T., Hall, S.E., Scarpa, A.M., Williams, C.G. (2000) Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43, 550–555.
3. Fang, P., Niu, S., Yuan, H., Li, Z., Zhang, Y., Yuan, L. and Li, W. (2014). Development and characterization of 25 454 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*). *Appl. Plant Sci.* 2, 455.
4. Graudal, L., Loo, J., Fady, B., Vendramin, G., Aravanopoulos, F.A., Baldinelli, G., Bennadji, Z., Ramamonjisoa, L., Changtragoon, S. and Kjær, E.D. (2020) Indicators of the genetic diversity of trees—State, Pressure, benefit and response. In *State of the World’s Forest Genetic Resources—Thematic Study*; FAO: Rome, Italy, p. 92.
5. Ilyinov, A. A., Raevsky, B.V. (2016). The current state of *Pinus sylvestris* L. gene pool in Karelia. *Sib. J. For. Sci.* 5, 45–54.
6. Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801–1806.

7. Manni, F., Guérard, E., Heyer, E. (2004). Geographic Patterns of (Genetic, Morphologic, Linguistic) Variation: How Barriers Can Be Detected by Using Monmonier's Algorithm. *Hum. Biol.* 76, 173–190.
8. Markatyuk, A.A., Runova, E.M., Gavrilin, I.I., Vedernikov, I.B. (2013). Current state of East Siberian boreal forests in the aspect of natural *Pinus sylvestris* L. regeneration Systems. *Methods. Technol.* 1, 163–169.
9. Parliamentary newspaper. Available online: <https://www.pnp.ru/> (accessed on 14 December 2022).
10. Peakall, R., Smouse, P.E. (2006). GenAIEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288–295.
11. Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
12. Przybylski, P., Tereba, A., Meger, J., Szyg-Borowska, I., Tyburski, Ł. (2022). Conservation of Genetic Diversity of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in a Central European National Park Based on cpDNA Studies. *Diversity* 2022, 14, 93.
13. Radu, R.G., Curtu, L.A., Spârchez, G., Șofletea, N. (2014). Genetic diversity of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] in Romanian Carpathians. *Ann. For. Res.* 57, 19–29.
14. R Core Team (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
15. Sebastiani, F., Pinzauti, F., Kujala, S.T., González-Martínez, S.C., Vendramin, G.G. (2012). Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conserv Genet Resour* 4, 231–234.
16. Semerikov, V.L., Semerikova, S.A., Dymshakova, O.S., Zatsepina, K.G., Tarakanov, V.V., Tikhonova, I.V., Ekart, A.K., Vidyakin, A.I., Jamiyansuren, S., Rogovtsev, R.V., et al. (2014). Microsatellite loci polymorphism of chloroplast DNA of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Asia and Eastern Europe. *Russ. J. Genet.* 50, 577–585.

17. Semerikov, V., Semerikova, S., Putintseva, J., Tarakanov, V., Tikhonova, I., Vidyakin, A., Oreshkova, N., Krutovsky, K. (2018). Colonization history of Scots pine in Eastern Europe and North Asia based on mitochondrial DNA variation. *Tree Genetics & Genomes*. 14.
18. Sheller, M., Ciocîrlan, E., Mikhaylov, P., Kulakov, S., Kulakova, N., Ibe, A., Sukhikh, T., Curtu, A.L. (2021). Chloroplast DNA Diversity in Populations of *P. sylvestris* L. from Middle Siberia and the Romanian Carpathians. *Forests*. 12, 1757.
19. Şofletea, N., Mihai, G., Ciocîrlan, E., Curtu, A.L. (2020). Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure in Isolated Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Populations Native to Eastern and Southern Carpathians. *Forests* 11,1047.
20. Spielman, D., Brook, B.W., Frankham, R. (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15261–15264.
21. Torbik, D.N., Bedrickaya, T.V., Vlasova, M.M., Sinelnikov, I.G. (2019). Genetic diversity of natural populations of *Pinus sylvestris* L. In Proceedings of the Federal Budget Institution «Northern Research Institute of Forestry»; Demidova, N.A., Ed.; Arkhangelsk, Russia, pp. 91–99.
22. Van Oosterhout, C., Weetman, D., Hutchinson, W.F. (2006). Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Mol. Ecol. Notes* 6, 255–256.
23. Vasilyeva, Y., Chertov, N., Nechaeva, Y., Sboeva, Y., Pystogova, N., Boronnikova, S., Kalendar, R. (2021). Genetic Structure, Differentiation and Originality of *Pinus sylvestris* L. Populations in the East of the East European Plain. *Forests* 12, 999.
24. Zhou, Y., Bui, T., Auckland, L.D., Williams, C.G. (2002). Undermethylated DNA as a source of microsatellites from a conifer genome. *Genome* 45, 91–99.

Capitolul 4

STUDIUL GENETIC AL POPULAȚIILOR DE PIN SILVESTRU (*PINUS SYLVESTRIS* L.) DIN MUNȚII ȘI PODIȘURILE DIN SUDUL SIBERIEI CENTRALE: DIVERSITATE ȘI DIFERENȚIERE

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în jurnalul *Frontiers in Forests and Global Change* cu câteva îmbunătățiri (Sheller, M.; Tóth, E.G.; Ciocîrlan, E.; Mikhaylov, P.; Tatarintsev A.; Kulakov, S.; Kulakova, N.; Melnichenko, N.; Ibe, A.; Sukhikh, T. and Curtu, A.L. Genetic legacy of southern Middle Siberian mountain and foothill populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): Diversity and differentiation. *Front. For. Glob. Change* 6:1152850. doi: 10.3389/ffgc.2023.1152850 Q1, Impact Factor – 3.2.)

4.1. Introducere

Diversitatea genetică este recunoscută ca unul dintre cele trei elemente de bază ale biodiversității (Hoban et al. 2020). Aceasta joacă un rol important în adaptarea speciilor la schimbările climatice și de mediu, precum și la interacțiunile biotice (Spielman et al. 2004). Caracterizarea modelului de diversitate genetică în cadrul speciilor și între populații este o cerință fundamentală pentru stabilirea de programe care vizează conservarea biodiversității (Belletti et al. 2017).

Pinul silvestru (*Pinus sylvestris* L.) este una dintre cele mai răspândite specii de conifere din lume și are o mare importanță economică și ecologică (Floran et al. 2011). În cadrul distribuției sale vaste, pinul silvestru crește în diferite condiții de sol și climă. Formează peste 20 de rase geografice și aproximativ 100 de forme și varietăți (Ekart et al. 2014). În sudul Siberiei, pădurile de pini sunt clasificate ca obiecte naturale deosebit de valoroase care stabilizează condițiile de mediu. Spectrul maxim de variații adaptive pentru pinul silvestru este observat în această parte a regiunii. În sudul Siberiei pot fi încă păstrate relice morfologice și genotipice ale pinului silvestru (Pimenov 2015).

În acest studiu, s-au utilizat markeri nucleari SSR pentru a explora diversitatea genetică și structura populațiilor de pin silvestru din sudul Siberiei Centrale. În mod specific, obiectivele propuse sunt: (a) evaluarea tiparelor diversității genetice în interiorul și între populații (b) verificarea ipotezei conform careia diferențierea genetică este legată de variabilele climatice.

4.2. Material și metode

4.2.1 Material biologic

Inițial, 210 arbori de pin silvestru au fost eșantionați din opt populații (SAR-1, SAR-2, PER-1, PER-2, KER, TOD, BAL-1, BAL-2) situate în sudul Siberiei Centrale pe un teritoriu vast din zona montană și de podiș a Munților Sayan de Vest, Kuznetsk Alatau și din zona de stepă și silvostepă a bazinelor Minusinsk, Todzha și Tuva (figura 1.5). Din cauza erorilor de amplificare, numărul arborilor analizați a fost redus la 169.

4.2.2. Extracția ADN-ului și analiza microsateliților

ADN-ul genomic total a fost izolat conform metodei CTAB (Doyle și Doyle, 1990). Au fost selectați șapte markeri nucleari de tipul microsateliților: Pysl16, Pysl42, Pysl44, Pysl57 (Sebastiani et al. 2012); PtTX2146 (Elsik et al. 2000); lw_isotig04306, lw_isotig07383 (Fang et al. 2014). Aceștia au fost grupați în două multiplexe: multiplexul 1 - Pysl44, Pysl57 și lw_isotig04306; multiplexul 2 - Pysl16, Pysl42, PtTX2146 și lw_isotig07383. Markerii au fost marcați fluorescent. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) s-a efectuat într-un volum de reacție de 10 μ L folosind kitul PCR Multiplex Qiagen (Qiagen, Germania) în condițiile recomandate de producător. Fragmentele amplificate au fost rulate pe un analizor genetic Beckman Coulter (Fullerton, CA) utilizând protocolul recomandat de producător. Genotiparea s-a realizat cu ajutorul software-ului GenomeLab GeXP (versiunea 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA).

4.2.3. Analiza datelor

Parametrii diversității și structurii genetice au fost calculați utilizând următoarele programe: GenAlEx v. 6.5 (Peakall & Smouse 2006), R (R Core Team 2013), Micro-Checker (Van Oosterhout et al. 2006), BOTTLENECK v.1.2.02 (Piry et al. 1999), R (R 2013), STRUCTURE V.2.3.4 (Pritchard et al. 2000), SAMOVA V.2.0 (Dupanloup et al. 2002).

Pentru a testa dacă variația climatică a contribuit la modelele de diferențiere genetică, adică pentru a testa ipoteza de izolare prin mediu (IBE) (Wang și Bradburd, 2014), s-au formulat trei abordări diferite. În primul rând, pe lângă distanțele genetice și geografice calculate pentru IBD, au fost calculate distanțele climatice euclidiene folosind 19 variabile bioclimatice (Tabelul S4.1) extrase din baza de date WorldClim v.1.4.1. Apoi, distanțele genetice, geografice și climatice s-au utilizat în analizele de regresie Mantel, parțial-Mantel și MMRR. Pentru analiza testului parțial-Mantel s-a utilizat pachetul "vegan" (Oksanen et al., 2022), iar pentru analiza MMRR scriptul elaborat Wang (2013). Scriptul R pentru analiza MMRR se regăsește în baza de date -Dryad Data Repository cu DOI:10.5061/dryad.kt71r.

4.3. Rezultate

Pe baza celor 7 microsateliți analizați, s-a identificat 49 de allele pentru cei 169 de indivizi eșantionați (tabelul S4.2). Numărul mediu de alele prezente pe populație variază de la 3,571 (BAL-2) la 5,143 (PER-1 și SAR-1). Numărul efectiv de alele (N_E) este cuprins între 2,191 în populația KER și 2,910 în populația PER-2, cu o medie de 2,517. Indicele Shannon (H) prezintă valori de la 0,891 (BAL-1) la 1,118 (PER-2). În ceea ce privește bogăția alelică are cea mai mică valoare ($A_R = 3,571$) în populația BAL - 2 și cea mai mare valoare ($A_R = 4,764$) în populația PER-1. Valorile heterozigoției așteptate (H_E) sunt cuprinse între 0,472 (BAL-1) și 0,565 (PER-2). Valorile coeficientului de consangvinizare (F_{IS}) sunt cuprinse între -0,161 și 0,229, dar în general are valori apropiate de zero în majoritatea populațiilor. Valoarea numărului de migranți pe generație este mare ($M_m = 5.690$), iar aceasta indică un flux mare de gene între populații. Raportul dintre heterozigoția observată și așteptată este echilibrat (media $H_0 : H_E = 0,510 : 0,518$).

Analiza stabilității populației nu a evidențiat existența unor efecte "gât de sticlă" în populațiile studiate. Rezultatele analizei AMOVA sugerează faptul că variația genetică între populații este de 7%, în timp ce variația în interiorul populațiilor este de 93% (tabelul S4.3).

Matricea perechilor F_{ST} (figura 4.1 a) reliefează faptul că cea mai mare diferențiere este între populațiile KER, PER-1, PER-2 și SAR-1, SAR-2 și BAL-1, iar cea mai mică între populațiile KER, PER-1, PER-2. Analiza UPGMA indică existența a două grupuri. Primul grup format din populațiile PER-1, PER-2 și KER și cel de-al doilea grup format din cele cinci populații rămase (figura 4.1 B).

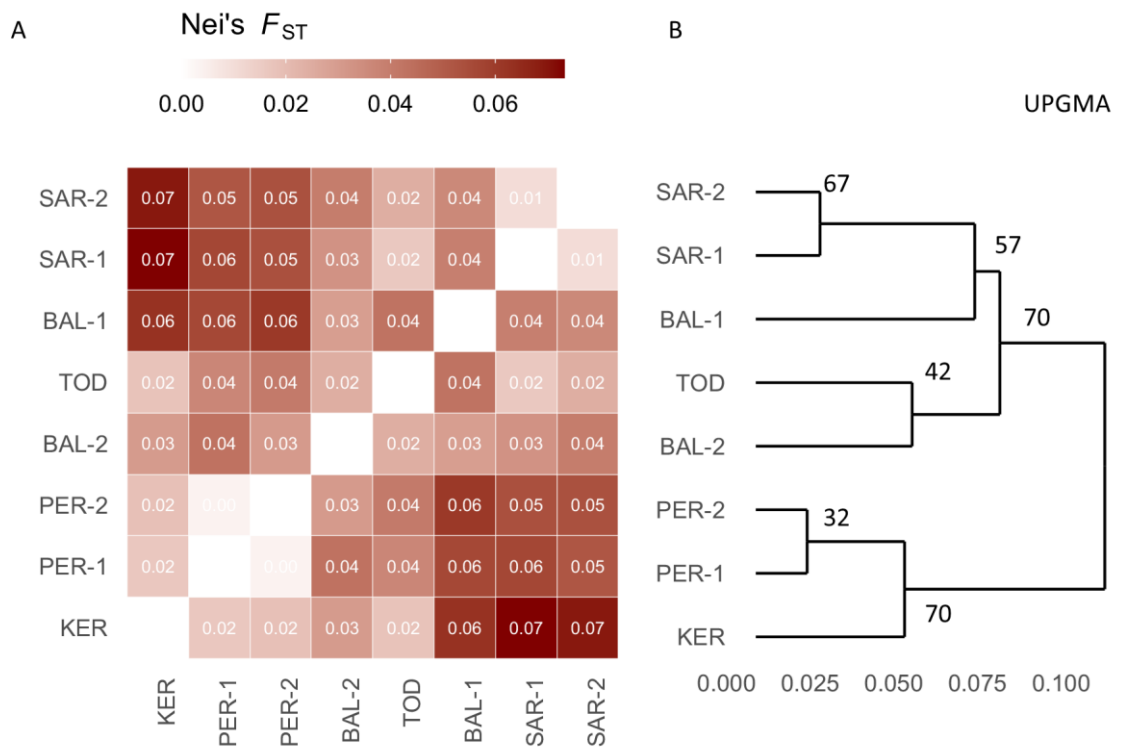


Figura 4.1. Matricea indicelui de diferențiere F_{ST} (Nei, 1978) și dendrograma UPGMA

Analiza structurii Bayesiene sugerează existența a două bazine genetice de pin silvestru în sudul Siberiei Centrale (figura 4.2). Acestea au fost identificate pe baza valorii medii pentru $L(K)$ (SD) și ΔK . Grupul I include populațiile PER-1, PER-2 și KER, iar grupul II include toate populațiile rămase.

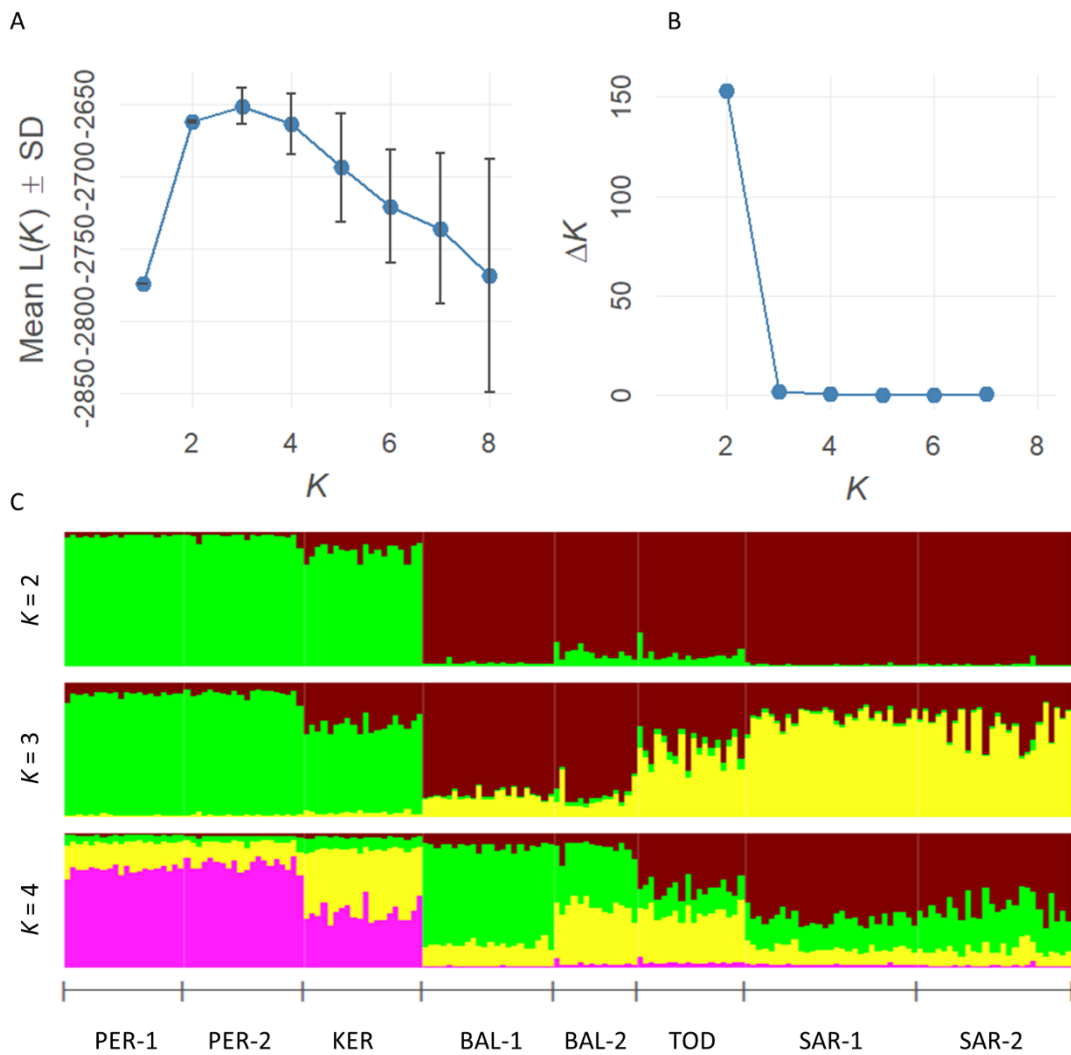


Figura 4.2. Estimarea celei mai bune alocări pe baza valorilor medii $L(K)$ (SD) și ΔK (A) and (B). Structura genetică pentru cele 8 populații analizate (C).

Analiza coordonatelor principale (PCoA) realizată pe baza valorilor F_{ST} separă populațiile în 2 grupuri majore (figura S4.1). Coordonatele principale 1 și 2, explică împreună 56,99% din variabilitatea totală. Un grup include populații din bazinul Minusinsk (PER-1 și PER-2) și din vestul Munților Sayan (KER). Al doilea grup include cinci populații din: Munții Kuznetsk Alatau (SAR - 1 și SAR-2), bazinul Central Tuva (BAL-1 și BAL-2) și bazinul Todzha (TOD).

Analiza Spațială a Peisajului Genetic a identificat o barieră semnificativă în calea fluxului de gene sub forma unei discontinuități genetice în zona de contact dintre liniile genetice din această regiune (Figura 4.3).

Estimarea contribuției genotipurilor în fiecare populație a arătat că populațiile PER-1, PER-2 și KER dețin o proporție mai mare de genotipuri originare din bazinul Minusinsk, comparativ cu alte probe din Munții Alatau Kuznetsk (SAR-1 și SAR-2), bazinul Central Tuva (BAL-1 și BAL-2) și bazinul Todzha (TOD).

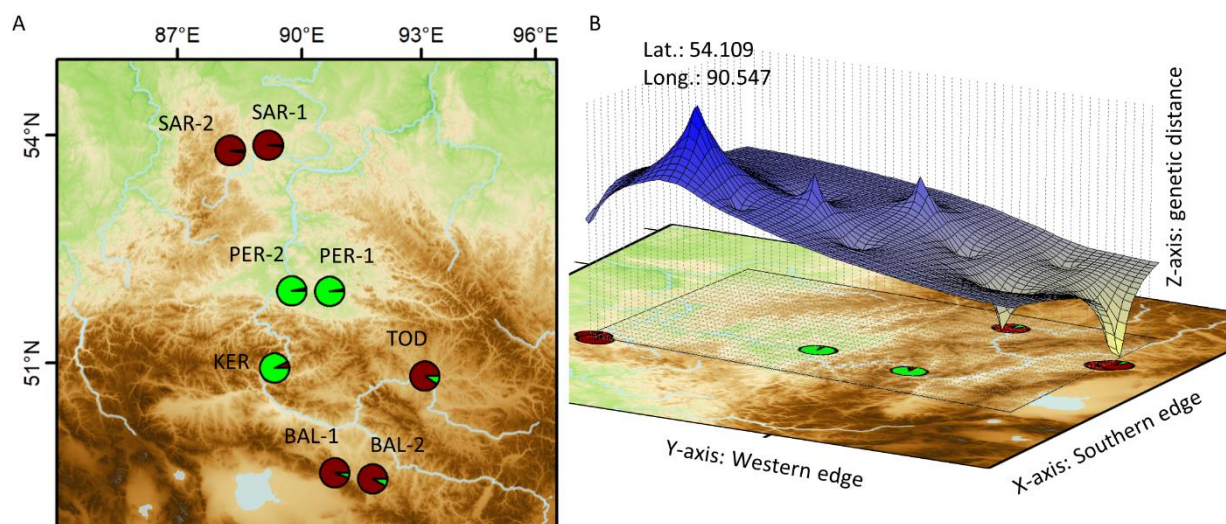


Figura 4.3. Extinderea spațială a clusterelor genetice detectate (a) și discontinuitatea genetică dezvăluită de analiza interpolării formei peisajului genetic (B).

În cadrul analizei spațiale a varianței moleculare (SAMOVA) F_{CT} are valori cuprinse între 0,0305 (K=3) și 0,03336 (K=6), ceea ce sugerează faptul că se disting 6 cluster omogene din punct de vedere genetic (tabelul S4.4). Acestea sunt: (I) PER-1 și PER-2; (II) BAL-1; (III) BAL-2; (IV) SAR-1 și SAR-2; (V) KER; (VI) TOD.

Testul Mantel indică faptul că nu există o corelație între diferențierea genetică și distanța geografică pentru populațiile de pin analizate ($R_2 = 0,043$, $p = 0,163$). În plus, pentru niciuna dintre abordările de regresie matricială (Mantel, parțial-Mantel și MMRR) nu s-au identificat corelații semnificative între distanțele genetice, geografice și climatice (tabelul S4.5).

4.4. Discuții

Rezultatele arată faptul că în ciuda efectelor detectabile ale fragmentării, nivelul diversității genetice la populațiile de pin silvestru din sudul Siberiei Centrală este ridicat ($H_E = 0,518$) și este similar cu celelalte

populații de pin silvestru din Siberia Centrală ($H_E = 0,514$) (Sheller et al., 2023). Cel mai mare nivel de diversitate genetică și bogăție alelică a fost detectat în populațiile PER-2 și PER-1 ($H_E = 0,565$ și $A_R=4,764$ respectiv) situate în bazinul Minusinsk. Populațiile PER-1 și PER-2 reprezintă păduri de pin izolate geografic, care sunt unice din punctul de vedere al originii și funcțiilor lor ecologice. (Tatarintsev et al., 2015, Polyakova, 2008). În studiul lui Ekart et al. 2014 cele mai mari valori ale heterozigoției (H_O și H_E) au fost găsite în populația de pin silvestru din bazinul Minusinsk. Spre sud, modelul diversității genetice se schimbă, diversitate genetică având valori considerabil mai scăzute. Heterozigoția așteptată și bogăția alelică în cele mai sudice populații, BAL-1 și BAL-2, au fost $H_E = 0,472$ și $A_R=3,571$, respectiv. Aceste populații sunt situate în bazinul Central Tuva și aparțin pădurii relictice Balgazyn. Este posibil ca efectele adverse ale climatului extrem de continental din Asia Centrală și factorii antropici din zona pădurii de pin Balgazyn, care se restrânge constant, să fi contribuit la scăderea diversității. Estimarea privind variația genetică totală între populații a arătat o valoare de 7% -analiza AMOVA. Acest procent poate fi considerat relativ mare, dacă se iau în considerare distanțele geografice relativ mici între unele dintre populații (de la 3 km la 593 km). În studii similare cu microsatețiți, dar la o scară geografică mai mare, Shuvaev et al. (2022) s-au înregistrat valori F_{ST} de doar 0,026 în populațiile de pin silvestru din regiunea Krasnoyarsk (Siberia de Mijloc); Sheller et al. (2023) au găsit o valoare F_{ST} de 0,097 între populații îndepărtate din Rusia. Pe baza analizei alozimelor, Sannikov și Petrova (2012) au arătat că diferențierea genetică a populațiilor de pin silvestru din partea sudică a arealului (la sud de 52° - 53° latitudine) în Siberia Centrală și de Est este de 2-4 ori mai mare decât în zona forestieră învecinată. Prin descompunerea valorii F_{ST} în rândul populațiilor, pe baza estimărilor în perechi, s-a constatat că cea mai mare diferențiere este între populațiile situate în Munții Kuznetsk Alatau (SAR-1 și SAR-2), bazinul Minusinsk (PER-1 și PER-2) și partea de Vest a munților Sayan (KER).

Analiza Bayesiană și analiza spațială a varianței (STRUCTURE și SAMOVA) sunt în concordanță cu estimările F_{ST} . Analiza STRUCTURE a împărțit populațiile studiate în două grupuri principale ($K = 2$), primul grup format din: PER-1, PER-2 și KER și cel de-al doilea grup format din celelalte cinci populații. Populațiile din Bazinul Minusinsk și Vestul Munților Sayan (PER-1, PER-2 și KER) s-au plasat între cei din celălalt grup genetic. Cu toate acestea, spre sud, ele s-au amestecat, deși într-o proporție extrem de redusă. Acest lucru a fost evident, de asemenea, în estimările F_{ST} pe perechi, deoarece aici au fost valori F_{ST} mai mici decât spre nord, în direcția Câmpiei Siberiene de Vest. Presupunem că această

diferențiere genetică în întregul peisaj a oferit dovezi ale unei zone de contact a unor linii genetice distincte și o limită clară care limitează fluxul genetic, a unui grup de populație înclinat.

Structura și SAMOVA au fost în concordanță cu estimările F_{ST} . Analiza structurii a împărțit populațiile studiate în două grupe principale ($K = 2$), cu PER-1, PER-2 și KER formând un grup, iar celelalte cinci populații formând un alt grup. Bazinul Minusinsk și populațiile Sayan de Vest (PER-1, PER-2 și KER) s-au regăsit printre membrii celui alt grup genetic. Cu toate acestea, spre sud au arătat amestecare, deși într-o proporție extrem de mică. Acest lucru a fost evident și în estimările noastre F_{ST} în perechi, deoarece valorile F_{ST} mai mici erau tipice aici decât spre nord, în direcția Câmpiei Siberiei de vest. Presupunem că această diferențiere genetică a oferit dovezi ale unei zone de contact a unor linii genetice distincte și o barieră clară care limitează fluxul genetic.

Trebuie remarcat faptul că SAMOVA a indicat prezența a șase grupuri diferite și a separat grupurile în aceeași ordine în care scade F_{ST} . Mai întâi s-au separat populațiile din bazinul Minusinsk și populațiile din vestul munților Sayan (PER-1, PER-2 și KER), de celelalte populații, și așa mai departe. Acest lucru arată că aici se află principala barieră de restricție a fluxului genetic. Interpolarea noastră spațială a peisajului genetic este în concordanță cu acest lucru, după ce a identificat o barieră semnificativă în calea fluxului genetic sub forma unei discontinuități genetice în zona de contact dintre liniile genetice din această regiune.

4.5. Concluzii

În cadrul studiului s-a evaluat diversitatea genetică și structura populației pentru opt populații de pin silvestru din sudul Siberiei Centrale utilizând șapte markeri nucleari SSR. Studiul a evidențiat eterogenitatea genetică a populațiilor de pin silvestru din apropierea limitelor sudice ale distribuției speciei în Siberia Centrală. În ciuda fragmentării, populațiile studiate au păstrat o diversitate genetică ridicată. Cel mai înalt nivel de diversitate genetică și de bogăție alelică a fost detectat în două populații din bazinul Minusinsk, în timp ce cel mai scăzut nivel de diversitate genetică și de bogăție alelică a fost găsit în două populații mai sudice, care aparțin unei păduri relictice de pin - Balgazyn din bazinul central Tuva. Cu toate acestea, pentru a confirma statutul relictic al pădurii de pin Balgazyn ar trebui efectuate

studii suplimentare. Două metode de grupare au arătat că populațiile din bazinul Minusinsk și cele din vestul Sayan au format un grup genetic distinct. Modelul diversității genetice sugerează o origine diferită a populațiilor de pin silvestru studiate. Cu toate acestea, sunt necesare investigații suplimentare pentru a studia istoria evolutivă a populațiilor de pin silvestru din sudul Siberiei. evolutivă a populațiilor de pin scoțian din sudul Siberiei.

4.6. Referințe bibliografice

1. Belletti, P., Ferrazzini, D., Ducci, F., De Rogatis, A., Mucciarelli, M. (2017). Genetic diversity of Italian populations of *Abies alba*. *Dendrobiology*. 77, 147-159.
2. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12, 13-15.
3. Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol*. 11, 2571-2581.
4. Ekart, A. K., Larionova, A. Y., Kravchenko, A. N., Tikhonova, I. V., Zatsepina, K. G., Tarakanov, V.V., Zhamyansuren, S. (2014). Genetic diversity and differentiation of Scots pine populations in Southern Siberia and Mongolia. *Contemp. Probl. Ecol*. 7(1), 52-59.
5. Elsik, C. G., Minihan, V. T., Hall, S. E., Scarpa, A. M., Williams, C. G. (2000). Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*. 43, 550-555.
6. Fang, P., Niu, S., Yuan, H., Li, Z., Zhang, Y., Yuan, L. and Li, W. (2014). Development and characterization of 25 454 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*). *Appl. Plant Sci*. 2, 455.
7. Floran, V., Sestras, R. E., Garcia-Gil, M. R. (2011). Organelle Genetic Diversity and Phylogeography of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 39, 317-322.
8. Hoban, S., Bruford, M., D'Urban, Jackson, J., Lopes-Fernandes, M., Heuertz, M., Hohenlohe, P. A., Paz-Vinas, I., Sjögren-Gulve, P., Segelbacher, G., Vernesi, C., et al. (2020). Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biol. Conserv*. 248, 108654.
9. Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2022). Package 'vegan': community ecology package.

10. Peakall, R. and Smouse, P. E. (2006). GenAIEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 288-295.
11. Pimenov, A.V. (2015). Biodiversity of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in contrasting ecotopes of the south of Siberia. [dissertation/Doctoral thesis]. [Krasnoyarsk]: Sukachev Forest Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.
12. Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90, 502-503.
13. Polyakova, M. A. (2008). Vegetation of ribbon forests of the Minusinsk basin. [dissertation/PhD thesis]. [Novosibirsk]: Central Botanical Garden SB RAS.
14. Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155, 945-959.
15. R Core Team. (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
16. Sannikov, S. N., Petrova, I. V. (2012). Phylogenogeography and genotaxonomy of *Pinus sylvestris* L. populations. *Ecology.* 4, 252-260.
17. Sebastiani, F., Pinzauti, F., Kujala, S. T., González-Martínez, S. C., Vendramin, G. G. (2012). Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 231-234.
18. Sheller, M., Tóth, E. G., Ciocîrlan, E., Mikhaylov, P., Kulakov, S., Kulakova, N., Melnichenko, N., Ibe, A., Sukhikh, T., Curtu, A. L. (2023). Genetic Diversity and Population Structure of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in Middle Siberia. *Forests.* 14, 119.
19. Shuvaev, D. N., Ibe, A. A., Shcherba, Yu. E., Sukhikh, T. V., Shilkina, E. A., Sheller, M. A., Usova, E. A., Lisotova, E. V., Repyakh, M. V., Stupakova, O. M. (2022). Molecular genetic characteristics of Scots pine populations in Krasnoyarsk region by panel of 15 nuclear microsatellite loci. *Forestry.* 5, 530-539.
20. Spielman, D., Brook, B. W., Frankham, R. (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15261-15264.
21. Tatarintsev, A. I., Kalenskaya, O. P., Bublikov, A. G. (2015). On the issue of root rot infestation of pine forests of the Minusinsk basin. *Conifers of the Boreal zone, XXXIII* 5(6), 240-247.

22. Van Oosterhout, C., Weetman, D., Hutchinson, W. F. (2006). Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 255–256.
23. Wang, I. J. (2013). Examining the full effects of landscape heterogeneity on spatial genetic variation: A multiple matrix regression approach for quantifying geographic and ecological isolation. *Evolution* 67, 3403–3411. Wang, I. J., and Bradburd, G. S. (2014). Isolation by environment. *Mol. Ecol.* 23, 5649–5662.

4.7. Material suplimentar

Tabelul S4. 1. Variabile bioclimatice descărcate de la WorldClim (<http://www.worldclim.org/>) și utilizate în analiza MMRR

Variabilă	Descriere
Bio 1	Temperatura Medie Anuală
Bio 2	Media intervalului Diurnal (media lunară (temperatura maximă - temperatura minimă))
Bio 3	Izotermă (Bio 2 / Bio 7) (*100)
Bio 4	Temperatura sezonieră (abaterea standard *100)
Bio 5	Temperatura maximă a celei mai calde luni
Bio 6	Temperatura minimă a celei mai reci luni
Bio 7	Intervalul anual de temperatură (BIO5-BIO6)
Bio 8	Temperatura medie a celui mai umed trimestru
Bio 9	Temperatura medie a celui mai uscat trimestru
Bio 10	Temperatura medie a celui mai cald trimestru
Bio 11	Temperatura medie a celui mai rece trimestru
Bio 12	Precipitații Anuale
Bio 13	Precipitații în cea mai umedă lună
Bio 14	Precipitații în luna cea mai uscată
Bio 15	Sezonalitatea precipitațiilor (Coeficient de variație)
Bio 16	Precipitații în cel mai umed cartier
Bio 17	Precipitații în cel mai uscat cartier
Bio 18	Precipitarea celui mai cald trimestru
Bio 19	Precipitații în cel mai rece trimestru

Tabelul S4. 2. Parametrii diversității genetice pentru cei șapte markeri nucleari

Locus	N_A	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Psyl44	3	0.249	0.281	0.043
Psyl42	8	-0.055	0.063	0.111
Psyl57	5	0.095	0.121	0.029
Psyl16	7	0.013	0.054	0.042
lw_isotig04306	9	0.006	0.049	0.044
lw_isotig07383	5	0.058	0.084	0.028
PtTX2146	12	-0.004	0.056	0.060
Mean	7	0.052	0.101	0.051
SD	1.225	0.037	0.031	0.011

Notă: numărul de alele (N_A); coeficientul de consangvinizare în raport cu subpopulația (F_{IS}); coeficientul de consangvinizare în raport cu populația totală (F_{IT}); coeficientul de diferențiere genetică (F_{ST}); deviația standard (SD).

Tabelul S4. 3. Rezultate analiză AMOVA

Sursa	df	SS	MS	Est. Var.	%
În rândul populațiilor	7	72.238	10.320	0.308	7***
În cadrul populațiilor	161	621.596	3.861	3.861	93
Total	168	693.834		4.168	100

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

Tabelul S4. 4. Grupuri de populații identificate de SAMOVA pentru opt populații de pin silvestru

Număr de grupuri (K)	F_{CT}	Gruparea populației
$K=2$	0.03114	{PER-1/PER-2/KER} {BAL-1/BAL-2/SAR-1/SAR-2/TOD}
$K=3$	0.0305	{PER-1/PER-2/KER} {BAL-1/BAL-2} {SAR-1/SAR-2/TOD}
$K=4$	0.03132	{PER-1/PER-2/KER} {BAL-1} {BAL-2} {SAR-1/SAR-2/TOD}
$K=5$	0.03215	{PER-1/PER-2} {BAL-1} {BAL-2} {SAR-1/SAR-2} {KER/TOD}
$K=6$	0.03336	{PER-1/PER-2} {BAL-1} {BAL-2} {SAR-1/SAR-2} {KER} {TOD}
$K=7$	0.03216	{PER-1/PER-2} {BAL-1} {BAL-2} {SAR-1} {SAR-2} {KER} {TOD}
$K=8$	-	-

Notă: F_{CT} : indicele diferențierii genetice în perechi

Tabelul S4. 5. Rezultatele testelor standard Mantel, testelor parțiale Mantel și MMRR.

Test	Parametrii		R	β	p
Mantel	Gen vs. Geo		0.217	-	0.131 ^{ns}
	Gen vs. Clim		0.267	-	0.091 ^{ns}
parțial-Mantel	Gen vs. Geo (Clim)		-0.033	-	0.543 ^{ns}
	Gen vs. Clim (Geo)		0.163	-	0.203 ^{ns}
MMRR	Gen vs. Geo + Clim		0.268	Geo: -5.691	0.870 ^{ns}
				Clim: 4.178	0.377 ^{ns}

* semnificație calculată cu 999 permutări: ns; nesemnificativ

Gen, distanța genetică (F_{ST}); Geo, distanța geografică; Clim, distanța climatică

teste parțiale-Mantel: $X \sim Y(Z)$ este corelația dintre matricele X și Y, controlând pentru Z

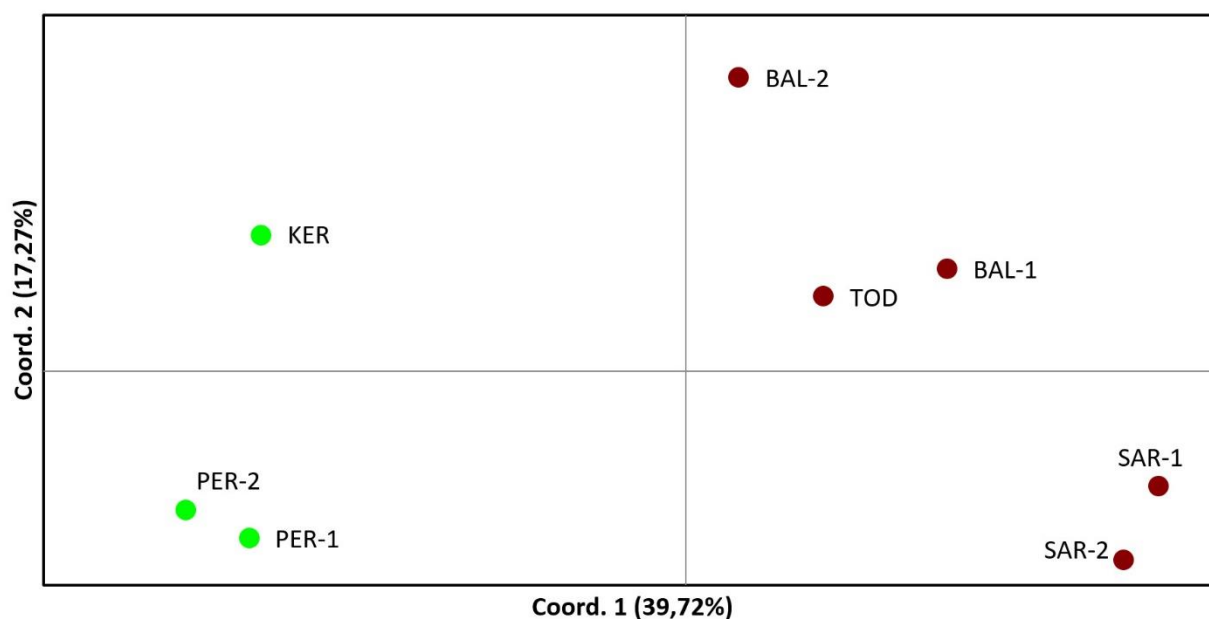


Figura S4. 1. Analiza coordonatelor principale (PCoA) și partea lor din variabilitatea totală în procente (%), pentru cele opt populații analizate.

CAPITOLUL 5. CONCLUZII. CONTRIBUȚII ORIGINALE. DISEMINAREA REZULTATELOR

5.1. Concluzii

Teza de doctorat se concentrează asupra unei specii importante de arbori, atât din punct de vedere ecologic, cât și economic, pinul silvestru (*Pinus sylvestris* L.), fiind totodată considerată una dintre principalele specii de arbori din pădurile Siberiei Centrale. Scopul cercetărilor a fost de a evalua diversitatea genetică la nivel nuclear și cloroplastic a populațiilor naturale de pin silvestru din Siberia Centrală. Rezultatele obținute au arătat niveluri ridicate de diversitate genetică în populațiile de pin silvestru din Siberia Centrală, atât pentru markerii nucleari, cât și pentru cei cloroplastici. Principalele concluzii sunt redată în cele ce urmează.

1. Studiul diversității ADN-ului cloroplastic în 19 populații naturale de pin silvestru din Siberia Centrală și Carpații României a arătat niveluri ridicate de diversitate genetică în toate populațiile studiate. S-au găsit trei haplotipuri de ADN cloroplastic comune între populațiile de pin silvestru din Carpați și cele din Siberia, ceea ce poate fi explicat printr-un flux genetic foarte eficient pe distanțe lungi sau prin originea comună a populațiilor actuale. A fost detectată o structură geografică slabă a populațiilor de pin silvestru din Siberia Centrală și din Carpații României.

2. Polimorfismul regiunilor de ADN de tip nSSR a permis identificarea unor valori ridicate ale diversității genetice și bogăției alelice pentru populațiile de pin silvestru din întreaga Rusie. S-a constatat că diversitatea genetică a scăzut de la vest la est, iar populația cea mai estică, luată în analiză, a prezentat cel mai scăzut nivel de diversitate genetică și bogăție alelică. Au putut fi detectate cinci grupuri genetice care corespund: părții europene a Rusiei, sudului Siberiei Centrale, nord-vestului Siberiei Centrale, Vestul și Centrul Siberiei și Extremului Orient rusesc. Cu toate acestea, populația europeană a fost cea mai distinctă din punct de vedere genetic.

3. Studiul a opt populații de pin silvestru din sudul Siberiei Centrale a arătat un nivel ridicat de diversitate genetică și prezența a două clusteruri genetice. Două populații din bazinul Minusink și o populație din vestul Munților Sayan au format primul grup genetic, iar cel de-al doilea grup genetic a fost alcătuit din celelalte populații din Munții Kuznetsk Alatau, bazinul Tuva și bazinul Todzha. Constatările noastre

sugerează că populațiile de pin silvestru studiate provin din fonduri genetice diferite, diferențiate probabil pe parcursul ultimei glaciațiuni.

5.2 Contribuții originale

Această cercetare este una dintre primele studii bazate pe markeri ADN de tip SSR privind structura genetică a populației de pin silvestru (*Pinus sylvestris* L.) din Siberia Centrală la nivelul ADN-ului nuclear și cloroplastic. Prezentul studiu se concentrează pe populații de pin silvestru din diferite ecosisteme și regiuni geografice și compară modelele de diversitate genetică pentru populații din diferite părți ale arealului natural de distribuție. Datele privind diversitatea și diferențierea genetică a populațiilor de pin silvestru din Siberia Centrală pot fi utilizate pentru elaborarea programelor de conservare a resurselor genetice de pin silvestru și în continuarea studiilor de genetică a populațiilor. În plus, datele obținute pot fi integrate într-o bază de date de referință a resurselor genetice de pin silvestru pentru identificarea originii geografice a materialelor forestiere de reproducere.

5.3. Diseminarea rezultatelor

Rezultatele cercetărilor efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au fost diseminate prin intermediul a trei articole științifice și prezentate în cadrul a patru conferințe internaționale.

Publicații științifice bazate pe materialul tezei:

1. **Sheller**, M.; Ciocîrlan, E.; Mikhaylov, P.; Kulakov, S.; Kulakova, N.; Ibe, A.; Sukhikh, T.; Curtu, A.L. Chloroplast DNA Diversity in Populations of *P. sylvestris* L. from Middle Siberia and the Romanian Carpathians. *Forests* 2021, 12, 1757. <https://doi.org/10.3390/f12121757>
2. **Sheller**, M.; Tóth, E.G.; Ciocîrlan, E.; Mikhaylov, P.; Kulakov, S.; Kulakova, N.; Melnichenko, N.; Ibe, A.; Sukhikh, T.; Curtu, A.L. Genetic Diversity and Population Structure of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in Middle Siberia. *Forests* 2023, 14, 119. <https://doi.org/10.3390/f14010119>

3. **Sheller**, M.; Tóth, E.G.; Ciocîrlan, E.; Mikhaylov, P.; Tatarintsev A.; Kulakov, S.; Kulakova, N.; Melnichenko, N.; Ibe, A.; Sukhikh, T. and Curtu, A.L. Genetic legacy of southern Middle Siberian mountain and foothill populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): Diversity and differentiation. *Front. For. Glob. Change* 6:1152850. doi: 10.3389/ffgc.2023.1152850

Participarea la conferințe științifice internaționale:

1. **Sheller** M., Ciocîrlan E., Mikhaylov P., Kulakov S., Kulakova N., Ibe A., Sukhikh T., Curtu A. L. Genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations from Southern mountain forest zone in Middle Siberia. 7th International Meeting "Conservation of Forest Genetic Resources" 20-22 September 2022, Pushkino, Russia.
2. **Sheller** M., Ciocîrlan E., Mikhaylov P., Kulakov S., Kulakova N., Ibe A., Sukhikh T., Curtu A. L. Genetic diversity of *Pinus sylvestris* L. populations in Middle Siberia by Chloroplast Microsatellite Markers. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference "Conservation and Rational Use of Biological Resources in the System of Sustainable Forest Management". 27-29 September 2022, Gomel, Republic of Belarus.
3. **Sheller** M., Ciocîrlan E., Mikhaylov P., Kulakov S., Kulakova N., Ibe A., Sukhikh T., Curtu A. L. Genetic diversity of Siberian Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations. International Symposium "Forest and Sustainable Development". 14-15 October 2022, Brasov, Romania.
4. **Sheller** M., Tóth E.G., Ciocîrlan E., Mikhaylov P., Tatarintsev A., Kulakov S., Kulakova N., Melnichenko N., Ibe A., Sukhikh T. and Curtu A.L. Genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in the south of Middle Siberia. VII International Scientific Conference "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology (PlantGen 2023)". 10-15 July 2023, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia.

SCURT REZUMAT

Diversitatea genetică joacă un rol important în adaptarea speciilor la schimbările climatice, de habitat și la interacțiunile biotice. Ea contribuie la menținerea funcțiilor, stabilității și serviciilor ecosistemice. Caracterizarea modelului de diversitate genetică în cadrul speciilor și între populații este o cerință fundamentală pentru stabilirea unor programe care vizează conservarea biodiversității. În această teză de doctorat este abordată problema studierii diversității genetice în populațiile naturale de pin silvestru (*Pinus sylvestris* L.) din Siberia Centrală. Pinul silvestru este una dintre principalele specii de arbori din pădurile Siberiei Centrale și are o mare importanță ecologică și economică. Teza are ca scop principal evaluarea variației genetice a pinului silvestru la nivel cloroplastic și nuclear. Studiul diversității genetice la nivel cloroplastic pentru 19 populații naturale de pin silvestru din Siberia Centrală și din Carpații României a arătat niveluri ridicate de diversitate genetică în toate populațiile studiate. Au fost identificate trei haplotipuri comune între populațiile din Siberia și Carpați, ceea ce poate fi explicat prin fluxul genetic pe distanțe lungi sau prin strămoși comuni. Polimorfismul markerilor nucleari a permis identificarea unor valori ridicate ale diversității genetice și ale bogăției alelice pentru populațiile de pin silvestru din Rusia. Modelele de diferențiere au indicat grupuri genetice distincte pentru populațiile de pin silvestru analizate, grupuri care corespund: părții europene a Rusiei, sudului Siberiei Centrale, nord-vestului Siberiei Centrale, Vestul și Centrul Siberiei și Extremului Orient rusesc. Studiul a opt populații de pin silvestru din sudul Siberiei Centrale a evidențiat existența a două grupuri genetice. Două populații din bazinul Minusink și o populație din vestul Munții Sayan au format primul grup, iar cel de-al doilea grup a fost compus din celelalte populații din Munții Kuznetsk Alatau, bazinul Tuva și bazinul Todzha. Rezultatele sugerează că populațiile de pin silvestru studiate provin din fonduri genetice diferite. Modelele de diversitate genetică identificate pot fi utile pentru studii genetice ulterioare ale populațiilor de pin silvestru din Siberia și pentru elaborarea de măsuri de conservare a resurselor genetice de pin silvestru din Siberia Centrală.