

Diversitatea genetică în plantaje clonale de primă generație de brad (*Abies alba* Mill.) din România

M. Teodosiu, G. Mihai, E. Ciocîrlan

Teodosiu M., Mihai G., Ciocîrlan E., 2023. Genetic diversity in first generation of Silver fir seed orchards (*Abies alba* Mill.) in Romania. Bucov. For. 23(1): 85-95

Abstract. Silver fir (*Abies alba* Mill.) is the most productive coniferous species in Romania and represents about 4% of the Romanian forests. During the last centuries, Silver fir forests from Romanian Carpathians have been intensively exploited, which has led to a substantial reduction of the area, from 10-15% in the 19th century to th present cover. Although the natural regeneration of Silver fir is dominant, the artificial regeneration is used especially for increasing the stability of mixed stands (e.g. with Norway spruce). Due to the good fructification of Silver fir seed orchards and the high-quality of seeds, the forest reproductive material currently used in the reforestation works is coming also from seed orchards. In this study, we analyzed five Silver fir seed orchards of different sizes and clonal compositions located in different provenance regions of Romania. We used 13 microsatellite markers to characterize the individual clones and evaluate the genetic structure and the genetic diversity and 185 clones were successfully genotyped and the presence of foreign genotypes was verified. The results showed loss of alleles with the decreasing of the clones number in seed orchards and an increased value of genetic diversity when the number of clones is comparable, but the origin is different. The Bayesian analysis indicated that the pattern of clustering is in accordance with the origin of clones. The genetic information obtained may contribute to the establishment the new Silver fir seed orchards and to an improved seed orchards management.

Keywords: Silver fir, seed orchards, microsatellites, genetic structure, genetic diversity, breeding.

Authors. Maria Teodosiu (teodosiumaria@yahoo.com) - "Marin Drăcea" National Research-Development Institute in Forestry, Station Câmpulung Moldovenesc, 73bis, Calea Bucovinei, 725100 Câmpulung Moldovenesc, Romania; Georgeta Mihai - "Marin Drăcea" National Research-Development Institute in Forestry, Eroilor Boulevard, No. 128, 077190 -Voluntari, Romania; Elena Ciocîrlan - "Transilvania" University of Braşov, Faculty of Silviculture and Forest Engineering, Sirul Beethoven, no. 1, 500123 – Braşov, Romania

Manuscript received October 25, 2023; revised December 6, 2023; accepted December 6, 2023; online first December 8, 2023.

Introducere

Ameliorarea arborilor presupune, printre altele, asigurarea echilibrului între câştigul gene-

tic preconizat și un nivel adecvat de diversitate genetică, iar cea mai comună metodă de a asigura acest lucru este înființarea plantajelor (Tang și Ide 2001). Plantajele sau livezile se-

mincere, (engl. seed orchard) reprezintă legătura strânsă dintre activitatea de ameliorare și practica forestieră (semințele ameliorate genetic fiind utilizate pentru producerea de puieți destinați regenerării pădurii) și sunt, în cea mai mare măsură, cele mai utilizate populații de producție din lume (Funda și El-Kasaby 2012). Măsura succesului unui program de ameliorare și de conservare ex situ constă în capturarea unei cât mai largi proporții din diversitate genetică găsită în populațiile de origine și care depinde, în mare măsură, de existența unei strategii de eșantionare bazată pe cunoașterea modelului de variație genetică intra- și interpopulațională a speciei.

În ciuda importanței bradului pentru silvicultura românească și europeană, studiile privind diversitatea genetică a populațiilor din toate zonele arealului natural de distribuție sunt încă rare. Primele studii, bazate pe markeri izoenzimatici (Teodosiu 2009), sau cele mai recente (Postolache et al. 2014, Teodosiu et al. 2019, Todea Morar et al. 2020) punctează asupra considerabilei diversități genetice intrapopulaționale observate, care a permis identificarea așa numitelor hot-spot sau zone cu potențial risc de adaptare, dat fiind nivelul scăzut de diversitate genetică, precum sunt populațiile din sud-vestul Carpaților României (Teodosiu et al. 2019).

Între speciile de conifere din România, bradul ocupă locul secund, după molid, ca pondere din suprafața pădurilor și înregistrează o răspândire discontinuă, suprafața maximă ocupată fiind în Carpații Orientali și de Curbură, unde formează arborete pure sau în amestec cu molidul și fagul, condițiile prielnice întâlnite în această zonă contribuind la formarea unor arborete viguroase și de înaltă productivitate (Stănescu și Șofletea 1998). În ultimii 200 de ani, presiunea antropică a condus la reducerea suprafeței ocupate de brad atât în Europa, cât și în România: dacă la începutul secolului al XX-lea ponderea bradului era de 6,5%, în prezent ea se situează la nivelul a cca. 4% (IFN, 2018). Interesul pentru cultura bradului a crescut substanțial în ultimii ani, de unde și nece-

sitatea aprovizionării cu cantități tot mai mari de semințe a sectorului forestier, atât în țară, cât și în străinătate. În acest context, plantajele sunt o variantă la îndemână pentru a asigura acest necesar, dar și pentru conservarea ex situ a unui genofond valoros.

Diversitatea genetică a semințelor obținute din plantaje este influențată semnificativ de proveniența și numărul de părinți ce constituie plantajul, diferențele de fertilitate, gradul de rudenie între părinți, dar și de nivelul de contaminare cu polen străin, genetic inferior (Lindgren și Preshner 2005, Hansen 2008, Sønstebo et al. 2018). Se admite că, cu cât proveniențele sunt mai diferențiate din punct de vedere genetic, cu atât se așteaptă un nivel mai ridicat de diversitate genetică în semințele obținute din plantaaje comparativ cu populațiile naturale (Tong et al. 2020) sau, din contra, se poate produce o reducere a capacității de adaptare dacă proveniențele sunt adaptate la condiții de mediu diferite (Johansen-Morris și Latta 2006, Edmants 2007). Cu atât mai mult, în cazul generațiilor avansate de plantaaje, cunoașterea structurii genetice în interiorul plantajelor de primă generație este importantă mai ales în contextul cunoașterii gradului de consangvinizare.

Studiile bazate pe markeri moleculari au arătat că există o corelație pozitivă semnificativă între distanța genetică dintre părinți și performanțele de creștere și adaptare ale descendenților (Zhang et al. 2013). Utilizarea markerilor genetici moleculari este o metodă alternativă eficientă de evaluare directă a relațiilor genetice și a diversității la nivel de ADN în cadrul plantajelor. Dintre diferitele tipuri de markeri moleculari, microsateleții (SSR), s-au aplicat pe scară largă și cu succes, pentru a clarifica relațiile genetice datorită modului de expresie codominant, a gradului ridicat de polimorfism și de reproductibilitate (Zeng et al. 2023).

În România, prima generație de plantaaje de brad a fost instalată în perioada 1979-1984, prin selecția fenotipică a 550 de arbori plus din 15 regiuni de proveniență, obținerea prin altoire a copiilor vegetative și instalarea a 11 plantaaje clonale (Enescu, 1972, Mihai et al. 2014).

Aceste plantaje, pe lângă rolul de a produce semințe genetic ameliorate pentru regenerarea artificială a arboretelor, servesc și ca bază de selecție pentru trecerea la o generație avansată de plantaje de brad (Mihai 2007).

Scopul lucrării este de a verifica identitatea clonală a rameșilor, de a analiza diversitatea genetică și structura populațională a unor plantaje reprezentative de brad din România cu ajutorul markerilor microsatețiți nucleari de tip gSSR și EST-SSR.

Material și metode

Plantajele analizate

Pentru surprinderea unei variații cât mai largi a compoziției clonale, atât ca număr de clone ce alcătuiesc plantajul, cât și ca proveniență a arborilor plus, au fost alese cinci plantaje de brad din prima generație, localizate în majoritatea regiunilor de proveniență din România (Tabelul 1).

Plantajul Cărbunar (PS-BR-MM81) este localizat în nordul țării, fiind în administrarea Ocolului silvic Baia Sprie din cadrul Direcției silvice Maramureș. Plantajul are o suprafață de 10 ha și a fost înființat în anul 1981, cu 42 de clone, copiii vegetative ale arborilor plus selecționați în cadrul regiunilor de proveniență (actualele subregiuni ecologice) A1 (Carpații Orientali Nordici), în raza Ocolului silvic Strâmbu Băiuș, A2 (Ocolul silvic Marginea) și

B2 (Ocolul silvic Năruja).

Pentru regiunea estică, plantajul Gârcina (PS-BR-NT81) din Direcția silvică Neamț, are o suprafață de 5 ha și a fost constituit în anul 1981 din 40 clone, copiii ale arborilor plus selecționați din cadrul a patru regiuni de proveniență: A2 (Carpații Orientali Estici) din raza Ocolului silvic Văratec, B2 (Carpații de curbură-clina exterioară) din raza Ocolului silvic Sinaia, regiunea C1 (Carpații Meridionali Nordici) din cadrul Ocolului silvic Avrig și din regiunea D1 (Ocolul silvic Rusca Montană).

Plantajul Vâlcele (PS-BR-CV82) a fost înființat în anul 1982 și are o suprafață de 10 ha, fiind constituit din 24 de clone, obținute prin altoire din arbori plus selecționați în regiunea de proveniență B2 (Carpații de Curbură), ocoalele silvice Covasna și Azuga.

Plantajul Poiana Neamțului (PS-BR-SB79) din cadrul Ocolului silvic Avrig, Direcția silvică Sibiu a fost instalat în anul 1979 pe o suprafață de 5,0 hectare. Plantajul a fost constituit din 36 de clone, copiii vegetative ale arborilor plus selecționați în cadrul a trei regiuni de proveniență, respectiv regiunea B2 (Carpații de curbură-clina exterioară), ocoalele silvice Sinaia și Azuga, regiunea C1 (Carpații Meridionali Nordici), Ocolul silvic Avrig și regiunea D1, Ocolul silvic Rusca Montană.

Plantajul Stâncești (PS-BR-HD84) din cadrul Direcției silvice Hunedoara a fost instalat în anul 1984 și are o suprafață de 5,0 ha. Plantajul a fost constituit din 36 de clone, obținute din multiplicarea vegetativă a arborilor

Tabel 1 Caracteristici cu privire la plantajele de brad și la eșantionare
Seed orchard characteristics and sampling of the plant material

Nr.	Plantajul	Denumirea plantajului	Lat.	Long.	Număr genotipuri unice	Număr actual de rameti	Variația numărului de rameti per clonă	Mărime eșanion
1	PS-BR-MM81	Cărbunar	47°34'	23°40'	41	1394	1-55	150
2	PS-BR-NT81	Gârcina	47°03'	26°26'	46	735	2-39	144
3	PS-BR-CV825	Vâlcele	45°40'	27°00'	26	2313	55-132	96
4	PS-BR-SB79	Poiana Nemțului	45°39'	24°26'	39	1158	1-130	112
5	PS-BR-HD84	Stâncești	45°54'	22°34'	33	655	5-33	120
TOTAL					185			622

plus selecționați fenotipic din cadrul unei singure regiuni de proveniență, respectiv regiunea D1, din raza Ocolului silvic Hunedoara.

La instalare, s-a urmărit o reprezentare cât mai uniformă a clonelor prin numărul de rameți utilizați, însă atât din documentația referitoare la instalare, cât și în urma analizelor efectuate, au existat clone reprezentate de 1-3 rameți sau extragenotipuri care fie au fost incluse pentru sporirea gradului de diversitate genetică, fie au înlocuit arbori a căror altoire a eșuat. Verificarea identității clonale pentru rameții din plantajele analizate a fost un pas necesar, iar în absența probelor de referință din arbori plus, verificarea s-a efectuat prin analiza a 2-4 rameți din fiecare clonă, cu excepția clonelor reprezentate de un singur ramet. În total, din cele cinci plantaje au fost prelevate probe de la 622 arbori (Tabelul 1), care au fost apoi depozitate la -70°C până la extragerea ADN-ului.

Izolarea ADN și analiza genetică

Pentru evaluarea structurii genetice, au fost utilizați un număr de 13 markeri genetici de tipul microsateliților nucleari (nSSR) și expressed tag (EST-SSR) respectiv, NFH15, NFH3, NFF3, NFF7 (Hansen et al. 2005), Sfl, Sf78, Sfb4 (Cremer et al. 2006) și Aat01, Aag01, Aat04, Aat06, Aat11, Aat15 (Postolache et al. 2014), pentru a căror analiză au fost optimizate trei combinații multiplex. Multiplexul A a fost compus din markerii NFH3, NFF3, NFF7, markerii NFH15, Sfl, Sf78 și Sfb4 au alcătuit multiplexul B, iar multiplexul C a fost compus din markerii Aat01, Aag01, Aat04, Aat06, Aat11 și Aat15. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) a fost realizată într-un volum de reacție de 15 μl cu un conținut de 1x Qiagen Multiplex PCR MasterMix 2x, 2 μM din fiecare primer și apă ultrapură până la volumul final. Condițiile de amplificare au constat într-un pas inițial de denaturare la 95°C timp de 15 min., urmat de 30 de cicluri de 30 sec. la 94°C (denaturare), 1 min și 30 sec. la 57°C și 1 min. la 72°C (multiplex A), 27 de cicluri de 30 sec. la 94°C (denaturare), 1 min și 30 sec. la 57°C și 1 min. la

72°C (multiplex B) și 30 de cicluri de 30 sec. la 94°C (denaturare), 1 min și 30 sec. la 62°C și 1 min. la 72°C (multiplex C), urmat de un pas final de extensie timp de 30 min. la 60°C. Reacția de amplificare s-a realizat cu ajutorul termocycler-ului MiniAmpPlus (ThermoFisher Scientific). Fragmentele SRR au fost separate prin electroforeză capilară cu ajutorul analizorului automat Beckman-Coulter GeXP. Lungimea fragmentelor s-a determinat prin intermediul programului GenomLab versiunea 10.1 (Beckman-Coulter).

Analiza datelor

Principalii parametri ai diversității genetice, respectiv, AT (numărul total de alele) Ho (heterozigoția observată), He (heterozigoția așteptată), uHe (heterozigoția așteptată fără bias), FIS (indicele de fixare) și FST (indicele de diferențiere genetică) au fost estimați prin intermediul aplicației GenAlEx versiunea 6.51b2 (Peakall și Smouse 2012). Determinarea conținutului informativ și a capacității de discriminare a setului de markeri genetici a fost efectuată în versiunea CERVUS 3.0.7. (Kalinowski et al., 2007).

Pentru verificarea identității clonale, genotipurile multilocus pentru toți rameții analizați au fost comparate prin intermediul funcției "matches" implementată în programul GenAlEx (Peakall și Smouse 2012), întâi în cadrul fiecărui plantaj și apoi luând în considerare toate plantajele. Stabilirea genotipului clonal, posibilele erori de etichetare dar și identificarea genotipurilor unice a fost validată prin potrivirea la nivelul tuturor locilor analizați.

În primă fază, gruparea plantajelor a fost investigată și prin analiza coordonatelor principale (PcoA) implementată în GenAlEx versiunea 6.51b2. Structura genetică a fost determinată cu ajutorul programului STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), utilizând modelul admixture fără a include informația cu privire la plantajul analizat. Setările au constat în 50.000 de pași burn-in, 100.000 iterații Markov Chain Monte Carlo, cu 5 rulări indepen-

dente pentru fiecare valoare k (1–5). Numărul de clustere a fost estimat pe baza parametruului ΔK (Evanno et al. 2005) și a programului STRUCTURE HARVESTER (Earl și vonHoldt 2012).

Rezultate

Polimorfismul setului de markeri genetici utilizați, identificarea și caracterizarea genotipurilor clonale multilocus din plantajele de brad analizate

Cei 13 microsateliți nucleari au înregistrat un grad de polimorfism de 89,74%. În total au fost identificate 200 alele, numărul de alele pentru fiecare locus fiind cuprins între 2 (Aat06, și Aat15) și 42 pentru locusul Sf78. Heterozigoția așteptată (H_e) variază între 0,014 (locusul Aat06) și 0,904 (locusul Sf78) cu o valoare medie de 0,597 (Tabelul 2). Conținutul polimorfic de informație (PIC) este strâns legat de gradul

de heterozigozitate, cea mai ridicată valoare a acestui parametru fiind identificată pentru locusul NFF7. Pentru toți cei 13 loci SSR, avem o valoare medie a PIC de 0,587, ceea ce indică o capacitate discriminatorie moderată.

Indicele de fixare (F_{IS}) a prezentat valori cuprinse între -0,090 (Aat11) și 0,450 (Aat06). Exces de homozigoți în procent foarte ridicat s-a înregistrat și pentru locusul Aat15. Valoarea indicelui de diferențiere (F_{ST}) variază de la 0,009 (Aat11) și 0,042 (NFF3). În ceea ce privește numărul de alele recensate în fiecare din plantajele analizate, acesta este cuprins între 101 în plantajul Vâlcele și 127 în plantajul Stâncești.

După validarea setului de markeri, verificarea identității clonale pe baza analizei simultane a mai multor rameți per clonă și compararea genotipurilor multilocus s-a ajuns la identificarea în cele cinci plantaje a 185 genotipuri unice. Au fost găsite mai multe genotipuri unice decât numărul inițial de clone în plantajele Gârcina, Poiana Neamțului și Vâlcele

Tabel 2 Valorile diversității genetice pentru setul de 13 microsateliți analizați
The values of genetic diversity for the 13 analyzed microsatellites

Multiplex	Locus	Lungimea fragmentelor (bp)	A_T	PIC	H_o	H_e	F_{IS}	F_{ST}
A	NFH3	97-183	30	0,912	0,904	0,895	-0,010	0,020
	NFF3	115-153	13	0,819	0,767	0,797	0,037	0,042
	NFF7	116-174	27	0,925	0,934	0,898	-0,040	0,034
B	NFH15	98-132	17	0,803	0,783	0,810	0,032	0,018
	Sf1	209-230	5	0,413	0,447	0,481	0,070	0,025
	Sf78	163-289	42	0,924	0,910	0,904	-0,007	0,023
	Sfb4	143-193	23	0,868	0,852	0,858	0,008	0,021
C	Aat01	99-120	5	0,416	0,454	0,479	0,053	0,039
	Aag01	188-230	13	0,783	0,830	0,794	-0,046	0,018
	Aat06	207-216	2	0,013	0,008	0,014	0,451	0,016
	Aat15	364-370	2	0,022	0,014	0,023	0,391	0,029
	Aat04	156-171	5	0,264	0,250	0,261	0,043	0,030
	Aat11	263-269	3	0,469	0,614	0,563	-0,090	0,009
Media			14.38	0,587	0,597	0,598	0,069	0,025
SE					0,037	0,036	0,045	0,003

Abreveri: A_T – numărul total de alele; H_o – heterozigoția observată; H_e – heterozigoția așteptată; uH_e – heterozigoția așteptată obiectivă (engl. unbiased expected heterozygosity), F_{IS} – indicele de fixare; F_{ST} – indicele de diferențiere.

Tabel 3 Numărul de alele în plantajele de brad analizate la nivelul locilor individuali
The number of alleles in the analyzed Silver fir seed orchards, at the level of individual loci

Locus	Cărbunar	Gârcina	Vâlcele	Poiana Neamțului	Stâncești
NFH3	23	23	17	17	20
NFF3	7	7	7	12	8
NFF7	20	17	14	16	20
NFH15	12	12	14	13	11
Sf1	3	3	3	4	3
Sf78	19	18	14	17	24
Sfb4	16	15	11	13	18
Aat01	3	3	3	4	3
Aag01	10	11	8	9	9
Aat06	3	1	2	1	1
Aat15	1	1	1	2	2
Aat04	3	4	4	4	5
Aat11	3	3	3	3	3
Total	123	118	101	115	127

și mai puține în cazul plantajelor Cărbunar și Stâncești (Tabelul 1). În ceea ce privește erorile de etichetare, adică faptul că amplasarea clonei în plantaj nu corespunde numărului real, acestea sunt în jurul valorii de 5%.

Diversitatea genetică

Diversitatea genetică per ansamblu nu înregistrează diferențe majore între plantajele analizate, totuși o diferențiere notabilă se poate observa în ceea ce privește numărul mediu de alele per locus (N_a) a cărui valoare variază de la 8,15 în plantajul Vâlcele la 9,76 în plantajul Gârcina (Tabelul 6). Valorile heterozigoției observate (H_o) sunt apropiate, înregistrând valoarea maximă în plantajele Cărbunar și Poiana

Neamțului ($H_o = 0,607$) și minima în plantajul Stâncești ($H_o = 0,583$). Același trend se menține și în ceea ce privește heterozigoția așteptată (H_e), cu o valoare de $H_e = 0,617$ în plantajul Cărbunar și $H_e = 0,586$ în plantajul Stâncești. Indicele de fixare (FIS) are valori negative, corespunzătoare unui exces de heterozigoți, în plantajele Stâncești și Poiana Neamțului și o valoare foarte apropiată de echilibru (FIS = 0,003) în plantajul Gârcina (Tabelul 4).

Structura genetică

Diferențierea genetică dintre plantaje este redusă, cea mai mică valoare a indicelui FST fiind între plantajele Gârcina și Poiana Neamțului (FST = 0,0089) și cea mai mare

Tabel 4 Parametrii diversității genetice pentru plantajele de brad analizate
Genetic diversity parameters of the analyzed seed orchards

Plantajul	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F_{IS}
Cărbunar	9,15	5,19	1,48	0,607	0,617	0,016
Gârcina	9,76	5,31	1,46	0,603	0,594	0,003
Vâlcele	8,15	4,53	1,42	0,601	0,611	0,023
Poiana Neamțului	9,38	4,50	1,44	0,607	0,593	-0,030
Stâncești	9,61	5,01	1,43	0,583	0,586	-0,016
Media	9,21	4,91	1,45	0,600	0,600	0,000
SE	0,86	0,46	0,11	0,040	0,039	0,012

Abrevieri: N – număr de clone analizate; N_a – numărul mediu de alele per locus; N_e – Numărul efectiv de alele per locus; I - indicele Shannon's; H_o – heterozigoția observată; H_e – heterozigoția așteptată; uH_e – heterozigoția așteptată obiectivă (engl. unbiased expected heterozygosity), F_{IS} – indicele de fixare.

Tabel 5 Matricea F_{ST}
The F_{ST} pairwise matrix

	Cărbunar	Gârcina	Vâlcele	Poiana Neamțului	Stâncești
Cărbunar	0,0000				
Gârcina	0,0153	0,0000			
Vâlcele	0,0113	0,0137	0,0000		
Poiana Neamțului	0,0164	0,0089	0,0105	0,0000	
Stâncești	0,0153	0,0094	0,0148	0,0100	0,0000

între plantajele Cărbunar și Poiana Neamțului ($F_{ST}=0,0164$) (Tabelul 5).

Analiza coordonatelor principale (PCoA) confirmă apropierea genetică a plantajelor Gârcina și Poiana Neamțului (Figura 1) și separarea clară a plantajului Cărbunar de restul plantajelor analizate. Primele două axe explică 79,04% din totalul variației genetice observate.

Analiza STRUCTURE furnizează informații suplimentare legate de reprezentarea principalelor fonduri de gene și gradul de amestecare al genotipurilor și proveniențelor în interiorul plantajelor individuale. Așadar, cel mai probabil număr de grupe genetice este de trei ($K =$

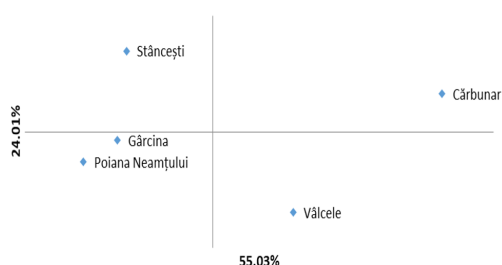


Figura 1 Analiza coordonatelor principale pentru cele cinci plantaje de brad analizate
Principal coordinates analysis for the seed orchards

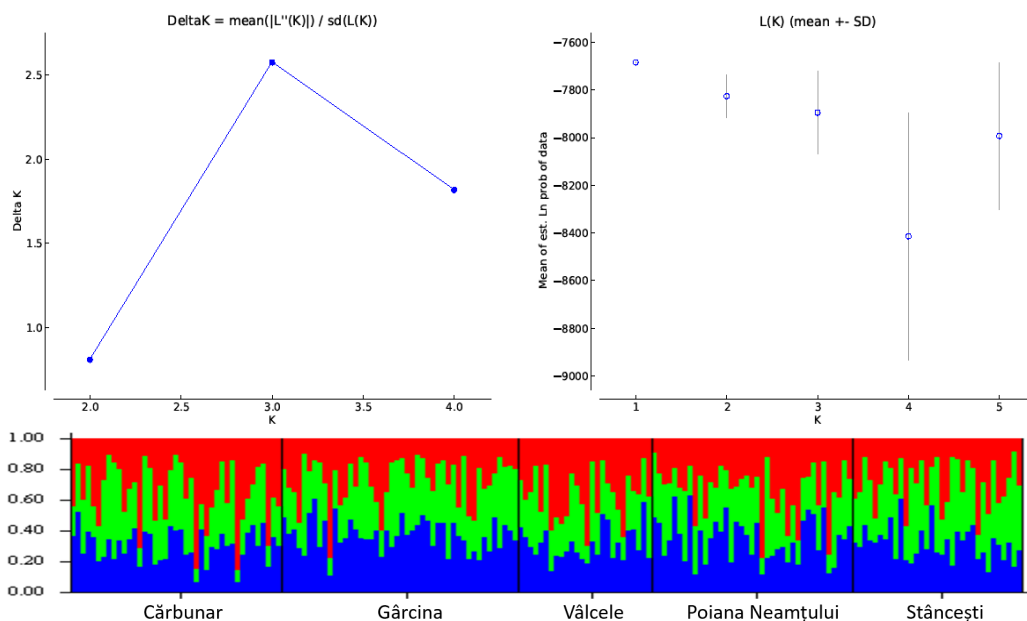


Figura 2 Rezultatul analizei STRUCTURE pentru $K=3$. Fiecare arbore este reprezentat printr-o bară verticală iar culorile corespund fiecăruia din cele trei clustere deduse
The results of the STRUCTURE analysis for $K=3$. Each tree is represented by a vertical bar, while the colors represent the three deduced clusters

3) și se observă un grad ridicat de amestecare între cele trei grupe în toate plantajele (Figura 2). Un număr redus de clone au valoarea de afiliere la unul din clustere mai mare de 0,8 și acestea se regăsesc în plantajele Cărbunar, Gârcina și Poiana Neamțului.

Discuții

Niveluri ridicate de variație genetică se găsesc în mod constant în populațiile naturale de arbori datorită trăsăturilor lor cunoscute, determinate de larga distribuție geografică, de un grad ridicat de panmixie și de modul de diseminare a semințelor (Li et al. 2022, Lv et al. 2020). Determinarea diversității genetice în populațiile de producție de semințe este un pas important, mai ales pentru că nivelul acesteia poate fi modificat prin procedee de ameliorare a arborilor, ca de exemplu selecția repetată a genotipurilor superioare. Pentru a susține demersul de trecere la generația a 2-a de plantaje de brad și chiar de a accelera procesul de ameliorare a acestei specii în România, caracterizarea din punct de vedere genetic a plantajelor, evaluarea diversității și a structurii genetice cu ajutorul markerilor moleculari (SSR) este o etapă foarte importantă. Setul de markeri utilizați în analiză prezintă un polimorfism moderat, totuși din rațiuni practice și economice, pentru evaluarea diversității genetice a bazei de ameliorare sau pentru analize de paternitate, primele două combinații de markeri care au un conținut informativ ridicat, de peste 0.800, pot fi utilizate cu succes.

Un plantaj ideal ar trebui să îndeplinească o serie de condiții, printre care panmixia și izolarea de polen străin, inferior genetic. Contaminarea cu polen străin se poate produce nu numai prin instalarea plantajelor în apropierea arboretelor și/sau arborilor din aceeași specie, ci și prin introducerea în plantaje de genotipuri străine, care de cele mai multe ori provin din creșterea portaltoiului în detrimentul altoiului. Rata de contaminare poate atinge în unele situații un procent considerabil, fiind

estimată chiar și la cca. 40%, situație raportată în cazul unui plantaj de pin silvestru (Gömöry et al. 2003). Majoritatea plantajelor de brad din prima generație sunt înființate pe baza selecției fenotipice a arborilor plus din arborete naturale și multiplicarea prin altoire a acestora. Toate etapele de lucru, de la recoltarea altoaielor la instalarea plantajelor predispuși la erori, iar dacă sunt cunoscute se poate contribui la o mai bună gestionare a plantajelor. De altfel, un control eficient bazat pe markeri genetici ar trebui să existe în toate etapele de ameliorare. Identificarea clonală corectă este o condiție prealabilă atât pentru programele de ameliorare, cât și pentru studiile privind panmixia și contaminarea. Etichetarea greșită a rameților sau omiterea unor clone ar putea influența acuratețea estimării unor parametri genetici (Kaya și Isik 2010).

Principalul scop al plantajelor este producerea de sămânță în cantități mari cu calități genetice superioare, la intervale regulate de timp și fără a îngusta nivelul de diversitate genetică regăsit în populațiile naturale (Chaloupkova et al 2019). În studiul de față, s-a urmărit evaluarea diversității și structurii genetice a cinci plantaje clonale de prima generație de brad din România, diferențiate prin numărul de clone și compoziția clonală, analizele pornind de la un plantaj cu originea clonelor în aceeași regiune de proveniență, până la unul cu originea clonelor în patru regiuni de proveniență. În general, diversitatea genetică în cele cinci plantaje este ridicată și indică o legătură între numărul și originea clonelor și valorile parametrilor diversității genetice, dar și o strânsă legătură cu nivelul diversității genetice observat în populațiile naturale, nivelul de heterozigoție din populațiile din nordul Carpaților Orientali (Teodosiu et al. 2019) regasindu-se în plantajul Cărbunar, în timp ce bogăția alelică din populațiile de pe clina estică a Carpaților Orientali (Văratec) și din populația Avrig se regăsește în plantajul Gârcina. Totuși, comparabilitatea cu populațiile naturale este limitată dat fiind setul de markeri utilizați în cele câteva studii realizate în România. Rezultatele obținute în unele

studii care au urmărit analiza comparativă a diversității genetice între populațiile naturale și plantațe au indicat un nivel comparabil dacă nu mai ridicat al diversității genetice în plantațe față de populațiile naturale (Mouna și Harju 1989, Chaisurisri și El-Kassaby 1994, Godt et al. 2001, Cengel et al. 2012, Ilinov și Raevsky 2015, Sonstebo et al. 2018, Ciocirlan et al. 2021 și în sinteză la Ivetic et al 2016), atât sub aspectul diversității alelice, cât și al heterozigotiei.

Diferențierea genetică între plantațele analizate este redusă, dar comparabilă cu cea observată între populațiile naturale (Postolache et al. 2016, Teodosiu et al. 2019). Așa cum era de așteptat, plantațele care conțin clone originare în aceeași regiune de proveniență se apropie mai mult din punct de vedere genetic. În fiecare din cele cinci plantațe se regăsesc în diferite proporții genotipuri parentale cu grade de afiliere la unul din cele trei clustere, reduse cu doar câteva excepții în plantațele Cărbunar, Gârcina și Poiana Neamțului. Pentru menținerea nivelului de diversitate genetică și în loturile de semințe, amestecarea diferitelor fonduri de gene este un mijloc eficient, deși acest aspect este condiționat de o serie de mecanisme privind sincronizarea înfloririi, unde adaptarea regională ar putea avea un rol important. Studii realizate în ceea ce privește fructificația și rata de panmixie în plantațe de brad au indicat că totuși participarea clonelor este redusă (Teodosiu et al. 2022).

Concluzii

Studiu de față arată faptul că plantațele clonale de brad din România au un nivel ridicat de diversitate genetică și se corelează direct cu nivelul de diversitate genetică din populațiile naturale: cu cât populațiile de origine de unde au fost selecționați arborii plus sunt mai diferențiate geografic și genetic, cu atât plantațele clonale captează un nivel mai ridicat de diversitate genetică. În interiorul plantațelor există un grad ridicat de amestecare strâns legat de diferențierea interpopulațională la nivelul arealului spe-

ciei în România. Stabilirea genotipului parental și verificarea identității clonale este foarte utilă și va fi folosită cu succes atât în amprentarea genetică a plantațelor și controlul materialelor forestiere de reproducere, cât și pentru selecția asistată a genotipurilor valoroase și integrarea rezultatelor în strategia de ameliorare.

Finanțare

Acest studiu a fost finanțat de Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării din România, în cadrul Programului Național Nucleu, proiectele PN19070305 și PN23090303.

Contribuția autorilor

Conceptualizare, M.T.; metodologie, M.T. și E.C.; software, M.T.; validare, M.T., G.M. și E.C.; scris - întocmirea manuscrisului original, M.T.; scris - evizuire și editare, M.T., G.M. și E.C. Toți autorii au citit și au fost de acord cu versiunea publicată a manuscrisului.

Bibliografie

- Ciocirlan E., Sofletea N., Mihai G., Teodosiu M., Curtu A. L., 2021. Comparative analysis of genetic diversity in Norway spruce (*Picea abies*) clonal seed orchards and seed stands. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(4): 12575-12575. <https://doi.org/10.15835/nbha49412575>
- Cengel B., Tayanç Y., Kandemir G., Velioglu E., Alan M., Kaya Z., 2012. Magnitude and efficiency of genetic diversity captured from seed stands of *Pinus nigra* (Arnold) subsp. *pallasiana* in established seed orchards and plantations. *New Forests* 43: 303-317. <https://doi.org/10.1007/s11056-011-9282-8>
- Cremer E., Liepelt S., Sebastiani F., Buonamici A., Michalczyk I.M., Ziegenhagen B., Vendramin G.G., 2006. Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies Alba* Mill. *Molecular Ecology Notes* 6 (2): 374-76. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01238.x>
- Chaloupková K., Stejskal J., El-Kassaby Y. A., Frampton J., Lstibůrek M., 2019. Current advances in seed orchard layouts: two case studies in conifers. *Forests* 10(2): 93. <https://doi.org/10.3390/f10020093>

- Chaisurisri K., El-Kassaby Y. A., 1994. Genetic diversity in a seed production population vs. natural populations of Sitka spruce. *Biodiversity & Conservation* 3: 512-523. <https://doi.org/10.1007/BF00115157>
- Earl D. A., von Holdt B. M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method, 2011. Saatavilla: http://taylor0. biology. ucla. edu/struct_harvest.
- Edmands S., 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* 16(3): 463-475. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03148.x>
- Enescu V., 1972. Ameliorarea arborilor. Editura Ceres București, 297p.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- Funda, T. El-Kassaby, Y.A., 2012. Parental reproductive investment and success in conifer seed orchards. În: *Seed Orchards and Breeding Theory Conference* (pp. 21-25).
- Gömöry D., Bruchanik R., Longauer R., 2003. Fertility variation and flowering asynchrony in *Pinus sylvestris*: consequences for the genetic structure of progeny in seed orchards. *Forest Ecology and Management* 174(1-3): 117-126. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00031-2).
- Godt M.J.W., Hamrick J.L., Burke M.A., Williams J.H., 2001. Comparisons of genetic diversity in white spruce (*Picea glauca*) and jack pine (*Pinus banksiana*) seed orchards with natural populations. *Canadian Journal of Forest Research* 31 (6): 943-949. <https://doi.org/10.1139/x01-024>.
- IFN, 2018. <http://roifn.ro/site/ifn-ciclul-ii> (Accesat 15 noiembrie 2023)
- Kaya N., Isik K., Adams W. T., 2006. Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. *New Forests* 31: 409-416. <https://doi.org/10.1007/s11056-005-0876-x>
- Kaya N., Isik K., 2010. Genetic identification of clones and the genetic structure of seed crops in a *Pinus brutia* seed orchard. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 34(2): 127-134. <https://doi.org/10.3906/tar-0904-11>
- Hansen O.K., Vendramin G.G., Sebastiani F., Edwards K.J., 2005. Development of microsatellite markers in *Abies Nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus." *Molecular Ecology Notes* 5 (4): 784-87. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01062.x>.
- Ilinov A. A., Raevsky B. V., 2017. Comparative evaluation of the genetic diversity of natural populations and clonal seed orchards of *Pinus sylvestris* L. and *Picea x fennica* (Regel) Kom. in Karelia. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 7: 607-616. <https://doi.org/10.1134/S2079059717060065>
- Ivetic V., Devetaković J., Nonić M., Stanković D., Šijačić-Nikolić M., 2016. Genetic diversity and forest reproductive material-from seed source selection to planting. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 9: 801-812. <https://doi.org/10.3832/ifer1577-009>
- Johansen-Morris A. D., Latta R. G., 2006. Fitness consequences of hybridization between ecotypes of *Avena barbata*: hybrid breakdown, hybrid vigor, and transgressive segregation. *Evolution* 60(8): 1585-1595. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb00503.x>
- Hansen O.K., Kjer E.D., 2006. Paternity analysis with microsatellites in a Danish *Abies nordmanniana* clonal seed orchard reveals dysfunctions. *Can. J. Forest Res.-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 36: 1054-1058. <https://doi.org/10.1139/x05-299>
- Kalinowski, Steven T, Mark L Taper, and Tristan C Marshall. 2007. "Revising How the Computer Program CERVUS Accommodates Genotyping Error Increases Success in Paternity Assignment." *Molecular Ecology* 16 (5): 1099-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
- Li N., Yang Y., Xu F., Chen X., Wei R., Li Z., WenP., Zhang, W., 2022. Genetic diversity and population structure analysis of *Castanopsis hystrix* and construction of a core collection using phenotypic traits and molecular markers. *Genes*, 13(12), 2383. <https://doi.org/10.3390/genes13122383>.
- Lv J., Li C., Zhou C., Chen J., Li F., Weng Q., Li M., Gan, S., 2020. Genetic diversity analysis of a breeding population of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.(Myrtaceae) and extraction of a core germplasm collection using microsatellite markers. *Industrial Crops and Products*, 145, 112157. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112157>
- Lindgren, D., Prescher, F., 2005. Optimal clone number for seed orchards with tested clones. *Silvae Genetica* 54, 80-92.
- Mihai G., 2007. O generație avansată de plantaje pentru brad. *Analele ICAS* 50: 45-55.
- Mihai G., Mirancea I., Duta C., 2014. Variation of the quantitative traits in a progeny test of *Abies alba* (Mill.) at the nursery stage. *Silvae Genetica* 63(6):275-284. <https://doi.org/10.1515/sg-2014-0035>.
- Muona O., Harju A., 1989. Effective population sizes, genetic variability, and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris*. *Silvae Genetica* 38(5): 221-228.
- Pârnuță Gh., Stuparu E., Budeanu M., Scărlătescu V., Marica F.M., Lalu I., Curtu A.L., 2011. *Catalogul Național Al Resurselor Genetice Forestiere* [National Catalogue of Forest Genetic Resources]. Editura Silvică, București
- Peakall R., Smouse P.E., 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research." *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 288-95. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
- Postolache D., Leonarduzzi C., Piotti A., Spanu I., Roig A., Fady B., Roschanski A., Liepelt S., Vendramin

- G.G., 2014. Transcriptome versus genomic microsatellite markers: highly informative multiplexes for genotyping *Abies Alba* Mill. and congeneric species." *Plant Mol. Biol. Rep* 3: 750–60. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0688-7>.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945–59. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- Sønstebo J. H., Tollefsrud M.M., Myking T., Steffenrem A., Nilsen A. E., Edvardsen Ø.M., El-Kassaby Y. A., 2018. Genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seed orchard crops: Effects of number of parents, seed year, and pollen contamination. *Forest Ecology and Management* 411: 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.01.009>
- Stănescu V., Șofletea N., 1998. *Silvicultura cu bazele geneticii forestiere*. Ed. Ceres, București.
- Tamura K., Stecher G. Kumar S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tang, D.Q. Ide, Y., 2001. Genetic variation in fruitfulness in a Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) seed orchard and its impact on the maintenance of genetic diversity in seedlots. *Journal of Forest Research* 6(2): 67-72. <https://doi.org/10.1007/BF02762490>
- Teodosiu, M. 2009. Evaluarea diversității genetice intra și interpopulaționale cu ajutorul markerilor genetici. In Mihai G. (ed.), *Surse de semințe testate pentru principalele specii de arbori forestieri din România*, pp. 178–84.
- Teodosiu M., Mihai G., Fussi B., Ciocîrlan E., 2019. Genetic diversity and structure of Silver fir (*Abies alba* Mill.) at the South-Eastern limit of its distribution range." *Annals of Forest Research*, 139–56. <https://doi.org/10.15287/afr.2019.1436>.
- Teodosiu M., Botezatu A., Ciocîrlan E., Mihai, G., 2022. Variation of cones production in a Silver fir (*Abies alba* Mill.) clonal seed orchard. *Forests*, 14(1): 17. <https://doi.org/10.3390/f14010017>
- Todea Morar I.M., Rensen S., Vilanova S., Boscaiu M., Holonec L., Sestras A.F., Vicente O., Prohens J., Sestras R.E., Plazas M., 2020. Genetic relationships and reproductive traits of Romanian populations of Silver fir (*Abies alba*): implications for the sustainable management of local populations. *Sustainability* 12(10): 4199. <https://doi.org/10.3390/su12104199>.
- Tong Y., Durka W., Zhou W., Zhou L., Yu D., Dai L., 2020. Ex situ conservation of *Pinus koraiensis* can preserve genetic diversity but homogenizes population structure. *Forest Ecology and Management* 465, 117820. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117820>
- Zeng W., Su Y., Huang R., Hu D., Huang S. Zheng H., 2023. Insight into the complex genetic relationship of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) advanced parent trees based on SSR and SNP datasets. *Forests* 14(2): 347. <https://doi.org/10.3390/f14020347>
- Zhang Y., Yang Q., Zhou Z., Jin G., 2013. Divergence among masson pine parents revealed by geographical origins and SSR markers and their relationships with progeny performance. *New Forests* 44: 341-355. <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9340-x>