

Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca
Facultatea de Biologie și Geologie

Macalik Kunigunda

STRUCTURA GENETICĂ A POPULAȚIILOR
DE *ERYTHRONIUM DENS-CANIS* L. ȘI *SCILLA BIFOLIA* L.
DIN BAZINUL CARPATIC DE EST – ASPECTE DE FILOGEOGRAFIE
ȘI CONSERVARE

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător:
prof.dr. Octavian Popescu

Cluj-Napoca

2015

CUPRINS

CUVINTE CHEIE	4
INTRODUCERE	4
1. CONSIDERAȚII TEORETICE	5
1.1. Prezentarea generală a speciilor	5
1.1.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	5
1.1.2 <i>Scilla bifolia</i>	6
1.2. Studiile de filogenie și filogeografie	7
1.2.1. Considerații teoretice/Generalități	7
1.2.2. Tehnici și markeri moleculari folosiți în analizele de filogenie și filogeografie ale plantelor	9
1.3. Genetica conservării – o ramură de știință aplicativă	10
2. OBIECTIVE	11
3. MATERIAL ȘI METODE	11
3.1. Prelevarea și conservarea probelor	11
3.2. Izolarea ADN	13
3.3. Markerii moleculari folosiți	13
3.4. Amplificarea prin PCR	14
3.5. Secvențializarea	14
3.6. Analize filogenetice și filogeografice	15
3.6.1. Alinierea secvențelor ADN	15
3.6.2. Generarea rețelei de haplotipuri	15
3.6.3. Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale	15
3.6.4. Calculul indicilor de diversitate ai cladelor în cazul speciei <i>Erythronium dens-canis</i>	15

4. REZULTATE	16
4.1. Rezultatele izolării ADN, ale amplificării secvențelor țintă, secvențializării și alinierii fragmentelor	16
4.1.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	16
4.1.1.1. ADN plastidial	16
4.1.1.2. ADN nuclear	16
4.1.2. <i>Scilla bifolia</i>	16
4.2. Numărul, structura, distribuția și rețeaua de haplotipuri la <i>Erythronium dens-canis</i>	16
4.3. Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale	19
4.3.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	19
4.3.2. <i>Scilla bifolia</i>	21
4.4. Indici de diversitate genetică ai cladelor de <i>Erythronium dens-canis</i>	24
5. DISCUȚII	24
5.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	24
5.2. <i>Scilla bifolia</i>	27
6. CONCLUZII	27
7. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	29
8. CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT	34

CUVINTE CHEIE

ADN plastidial

Bazinul Carpatic de Est

conservare genetică

Erythronium dens-canis

filogeografie

filogenie

refugii criptice

rpl32-trnL

rps15-ycf1

Scilla bifolia s.l.

INTRODUCERE

Lucrarea de față prezintă cele mai importante rezultate ale autorului din ultimii trei ani, legate de filogenia/filogeografia a două specii de monocotiledonate: *Erythronium dens canis* L. (LILIACEAE) și *Scilla bifolia* L. (ASPARAGACEAE) pe aria lor de răspândire, și în special în Bazinul Carpatic de Est.

În prezent, cercetările privind biologia plantelor, chiar și cele cu caracter ecologic nu mai sunt complete fără aplicarea tehnicilor moderne de biologie moleculară.

Biogeografia organismelor din Bazinul Carpatic a stârnit interesul cercetătorilor încă din anii 1970 (Bănărescu și Boșcaiu, 1973), când cercetările din acest domeniu s-au bazat pe studii paleontologice (fosile) și palinologice, pe de o parte și pe date biogeografice, pe de altă parte. Cercetările actuale vin în sprijinul teoriilor vechi și adaugă unele noi, folosind argumente clare, bazate pe rezultatele obținute prin tehnici moleculare. Tehnicile actuale uzuale de izolare a ADN-ului genomic, de amplificare a fragmentelor țintă și secvențializarea acestora au permis obținerea de date noi (bazate pe gradul de înrudire) care prin metode computaționale pot fi folosite la studii de taxonomie moleculară, completând astfel taxonomia clasică (bazată pe caractere morfologice) și ajutând astfel la clarificarea poziției taxonilor incerti. De asemenea, la scară mai fină, aceste date ajută la descifrarea gradului de înrudire al diferitelor populații aparținând aceleași specii, în acest fel fiind de mare ajutor la

studii de filogeografie. Totodată, pe baza acestor date se poate calcula gradul de diversitate genetică a populațiilor, ceea ce este de mare folos în programele de conservare ecologică, în selectarea populațiilor a căror conservare poate fi efectuată cu succes (*conservation genetics* - genetica conservării).

Autoarea a căutat în primul rând răspunsul la întrebarea dacă în Carpați au existat refugii criptice, unde o serie de organisme au reușit să supraviețuiască glaciațiunilor și de unde după glaciațiuni s-au extins, ajungând la arealele actualmente cunoscute.

Cele două specii țintă au fost alese din următoarele motive:

– la *Erythronium dens-canis* există studii anterioare care arată existența unei clade transilvane, foarte diverse, cu o arie de răspândire restrânsă, alături de clada non-transilvană, mult mai uniformă, larg răspândită în arealul actual al speciei. Ne-am propus analiza structurării acestei linii transilvane.

– am căutat o a doua specie, care poate fi eșantionată împreună cu prima (tot un geofit de primăvară timpurie) și în cazul căreia poate fi aplicat același marker ca la specia precedentă. Alegerea a căzut pe *Scilla bifolia*, specie care cu ocazia testării prealabile a arătat o variabilitate ridicată.

1. CONSIDERAȚII TEORETICE

1.1. Prezentarea generală a speciilor

1.1.1. *Erythronium dens-canis*

Specia *Erythronium dens-canis* L. aparține subfamiliei LILIOIDEAE, familia LILIACEAE din ordinul LILIALES (Bremer și colab., 2009).

În ceea ce privește vârsta genului *Erythronium*, acesta a apărut acum aproximativ 12 milioane ani în urmă în Asia de Est, de unde ulterior genul a populat și s-a diversificat în Europa, estul și vestul Americii de Nord (Patterson și Givnish, 2002).

Genul prezintă o distribuție disjunctă accentuată: dintre cele 28 de specii de pe Glob, 17 apar în partea de vest a Americii de Nord, 6 în estul Americii de Nord și 5 în Eurasia (Allen și colab., 2003; Bartha și colab., 2015b). Genul este morfologic omogen, ușor de recunoscut. Dintre cele 5 specii din Eurasia doar una este prezentă în Europa, și anume *Erythronium dens-*

canis (Săvulescu, 1966), speciile *E. sajanense*, *E. sibiricum*, *E. japonicum* și *E. caucasicum* fiind răspândite în Asia.

În România *Erythronium dens-canis* a fost recunoscut în mod tradițional ca fiind prezent cu două subspecii, *E. dens-canis* ssp. *dens-canis* și *E. dens-canis* ssp. *niveum* (Baumg) Buia et Păun (Ciocârlan, 2009). Statutul taxonomic al subspeciilor nu a fost evidențiat la nivel molecular. În Flora Europaea (Richardson, 1980) acești taxoni apar ca și varietăți. Numărul de cromosomi ai speciei este de $2n=24$ (Moore, 1982; Ciocârlan, 2009), dar se cunosc și populații tetraploide (Siljak-Yakovlev și colab., 2010).

Erythronium dens-canis este larg răspândit în Europa de Sud (în Munții Pirinei, Franța, Italia, Ungaria, Cehia, Slovacia, Peninsula Balcanică de Nord) (Richardson, 1980).

Planta este frecventă în toate regiunile țării, vegetează prin poieni, pajiști, rărituri, păduri, margini de păduri, din zona pădurilor de stejar până în subetajul fagului (Săvulescu, 1966; Ciocârlan, 2009).

Erythronium dens-canis este un geofit eurasiatic, specie mezofită, mezotermă, mezotrofă, slab acid-neutrofilă, caracteristică alianței Carpinion (Sanda și colab., 1983).

Erythronium dens-canis este o specie mirmecocoră, dispersia secundară fiind realizată de furnici. Ca urmare specia prezintă o capacitate limitată de dispersie a semințelor.

Filogenia genului *Erythronium* este destul de bine studiată. Filogeniile bazate pe caractere morfologice, și analize moleculare (*matK*, nrITS, intronul *rps16* și intronul 5' *trnK*, excluzând exonul *matK*) arată *Erythronium*, *Amana* și *Tulipa* în aceeași cladă, bine suportată, cu *Gagea* ca grupă-soră (*sister group*). În cadrul genului *Erythronium* toate grupele filogeografice (eurasiatică, est-nordamericană și vest-nordamericană) formează subclade bine suportate (Allen și colab., 2003; Clennett și colab., 2012).

Pentru speciile de *Erythronium* non-europene există informații vaste, însă biologia speciei *Erythronium dens-canis* este foarte puțin cunoscută (Guitián și colab., 1999; Guitián și colab., 2003).

1.1.2 *Scilla bifolia*

Genul *Scilla* aparține familiei ASPARAGACEAE, din ordinul ASPARAGALES (Bremer și colab., 2009). Este un gen extrem de eterogen, foarte variabil și în ceea ce privește caracterele cariologice (Speta, 1979). Genul cuprinde în jur de 100 de specii, distribuite în Europa de Sud, regiunea mediteraneană și Asia Centrală și de Vest (Ghavami și colab., 2009).

Populațiile indigene ale genului *Scilla* din Europa Centrală și de Vest erau incluse până în anii 1970 în general într-o singură specie larg definită, *Scilla bifolia* s.l. Studii detaliate de taxonomie au arătat existența unei grupe de specii – o serie poliploidă de taxoni cu un număr de cromosomi $x=9$ și $2n=18, 36, 54$, asociate cu câteva caractere morfologice și ecologice.

Ciocârlan (2009) prezintă specia ca fiind prezentă în România cu 2 subspecii: ssp. *drunensis* Speta și ssp. *bifolia*.

Scilla bifolia L. este o plantă larg răspândită în Europa, comună în toată România, crește prin păduri, pajiști și tufărișuri din zona de câmpie până în cea montană. Este un geofit eurasiatic, specie mezofită, mezotermă și mezotrofă, slab acid-neutrofilă caracteristică clasei Querco-Fagetea, alianței Carpinion, Alno-Padion (Sanda și colab., 1983).

1.2. Studiile de filogenie și filogeografie

1.2.1. Considerații teoretice/Generalități

Filogenia se ocupă de descifrarea istoricului evolutiv al unui grup de organisme, al unui taxon, ne arată relațiile evolutive între diferite grupe de taxoni. Principiul care stă la baza filogeniei este faptul că membrii unui grup sau o cladă au o istorie evolutivă comună, fiind mult mai apropiați unii de ceilalți, decât cu membrii altor grupe. Actualmente pentru descifrarea gradului de înrudire a taxonilor pe lângă caracterele morfologice se folosesc informații legate de macromolecule (ADN, proteine).

Studiile de filogeografie au ca scop principal înțelegerea evenimentelor istorice care au dus la dispersia curentă a genelor, populațiilor și speciilor. Termenul de filogeografie (*phylogeography*) a fost introdus de Avise, în 1987 (Avise și colab., 1987). Filogeografia poate fi definită ca „știința care se ocupă de principiile și procesele care guvernează distribuția geografică a liniilor genealogice, mai ales în interiorul speciilor sau între specii strâns înrudite” (Avise, 2000). Avansarea atât a metodologiei (tehnologia ADN), cât și a abordării analitice în filogeografie permite aprecierea distribuției postglaciare cronologice și geografice a liniilor genetice.

Vaste sunt studiile privind elucidarea istoriei postglaciare ale unor specii din anumite zone ale Europei. Istoria cuaternară a florei Alpilor este destul de bine cunoscută (Tribisch și Schönswetter, 2003; Schönswetter și colab., 2005; Ehrlich și colab., 2007; Schneeweiss și Schönswetter, 2011).

Sunt relativ puține studiile recente privind biogeografia Bazinului Carpatic (Schmitt și colab., 2006; Provan și Bennett, 2008; Varga, 2010; Bálint și colab., 2011; Ronikier, 2011; Ujvárosi și Markó, 2011; Schmitt și Varga, 2012), mai ales cele care vizează studiul angiospermelor. Studiile de filogeografie din Carpați privind diferitele specii de plante sunt cunoscute mai ales pentru specii alpine (Schönswetter și colab., 2005; Pușcaș și colab., 2008; Ronikier și colab., 2008; Csergő și colab., 2009; Ronikier și colab., 2012).

Teoriile clasice privind istoria cuaternară a speciilor din Europa temperată susțin că refugiile glaciare erau în peninsulele din sudul Europei (Peninsula Iberică, Peninsula Balcanică și Peninsula Apenină). Conform acestei teorii o serie de specii au supraviețuit perioadele de glaciațiuni din timpul Pleistocenului în aceste zone, unde diversitatea lor a crescut (Ibrahim și colab., 1996; Taberlet și colab., 1998; Hewitt, 1999; Schmitt, 2007). Cu retragerea ghețarilor spre nord, speciile s-au extins și ele spre nord, recolonizând noile areale eliberate de sub acțiunea ghețarilor: modelul de expansiune-contrație (*Expansion-Contraction model* - EC). Recent, studiile de filogeografie bazate pe analize moleculare au furnizat date noi legate de istoria unor specii în timpul glaciațiunilor. În anii 2000 a apărut o nouă teorie, conform căreia o serie de specii au supraviețuit în așa numitele refugii criptice, localizate în diferite zone mai la nord (Stewart și Lister, 2001; Bhagwat și Willis, 2008; Provan și Bennett, 2008). Aceste refugii se găsesc în diferite zone ale Europei, în Europa de Vest (Valtueña și colab., 2012), Europa Centrală (Michl și colab., 2010) și în Carpați.

Refugii extra-mediteraneene în Europa au fost confirmate pentru o serie de specii (Stewart și Lister, 2001; Kotlík și colab., 2006; Sommer și Nadachowski, 2006; Schmitt, 2007; Bhagwat și Willis, 2008; Birks și Willis, 2008; Provan și Bennett, 2008; Svenning și colab., 2008; Stewart și colab., 2010; Varga, 2010). Majoritatea studiilor pun accent pe taxoni tereștri, dar sunt date și asupra faunei acvatice și chiar marine, care atestă existența unor refugii criptice în Europa și în aceste medii (Provan și al., 2005; Sedivá și colab., 2008; Pauls și colab., 2009; Bálint și colab., 2011).

Studiile de filogeografie pe lângă latura teoretică au și o latură importantă ca știință aplicată, fiind folosite în conservare:

1. Prin identificarea populațiilor cu diversitate genetică ridicată, identificarea posibilelor refugii ale acestei diversități: diversitatea genetică regională poate fi foarte importantă pentru supraviețuirea pe termen lung a multor specii, deci este relevantă pentru conservarea speciilor și habitatelor (Frankham, 1995). Cunoașterea schimbărilor în distribuția diversității genetice în timp ajută la identificarea unităților de conservare (Hampe și Petit, 2005).

2. În contextul actual al schimbărilor climatice: cunoscând trecutul diferitelor specii în condițiile climatice trecute, putem face predicții privind supraviețuirea și distribuția lor în viitor (Provan și Bennett, 2008).

1.2.2. Tehnici și markeri moleculari folosiți în analizele de filogenie și filogeografie ale plantelor

Markerii moleculari folosiți în studiile de filogenie și filogeografie aparțin la două categorii mari: proteine (studiul izoenzimelor) și ADN. Markerii moleculari ADN sunt SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), microsateliți (SSR – *Simple Sequence Repeats* sau STR – *Short Tandem Repeats*), gene specifice, regiuni necodificatoare ale diferitelor gene, spațiatori intergenici.

În studiile de filogenia și filogeografia plantelor se utilizează informațiile referitoare la cele trei genomuri: nuclear, plastidial și mitocondrial.

Distingem două mari grupe de markeri ADN folosiți în analizele de filogenie și filogeografie: markeri nucleari și non-nucleari. Cea mai importantă diferență între cele două tipuri constă în modul de moștenire. La organismele cu înmulțire sexuală, genomul nuclear prezintă a moștenire biparentală, iar cel non-nuclear, din organite (mitocondrial și plastidial) se transmite doar pe o linie maternă.

Dintre markerii nucleari regiunea nrITS este cel mai des utilizată în studiile de filogenie. În ultimii ani pe lângă regiunea nrITS se utilizează tot mai des markeri nucleari *single-copy* sau *low-copy* (*single/low-copy nuclear gene*).

După selectarea și aplicarea markerilor și în consecință a obținerii setului de date, urmează alinierea secvențelor, generarea și evaluarea arborilor.

Metodele, tehnicile utilizate sunt cele bazate pe secvențializare, genotipare, tehnicile RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) și RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Metodele prin care din datele genetice se pot reconstrui filogenii sunt multiple, majoritatea lor pot fi grupate în una dintre următoarele categorii: metode de distanță, metode bazate pe principiul parcimoniei și metode bazate pe probabilitate.

Testarea arborilor filogenetici se poate face de asemenea prin mai multe modalități. Cele mai larg utilizate dintre acestea sunt testele statistice, testul *bootstrap* (Felsenstein, 1985) fiind pe primul loc.

1.3. Genetica conservării – o ramură de știință aplicativă

Conservarea diversității genetice, una dintre aspectele biodiversității, este o latură fundamentală în biologia conservării, deoarece oferă materialul de bază pentru procesele evolutive, adică potențialul adaptării asupra mediului schimbat.

Genetica conservării utilizează cunoștințele teoretice și tehnicile genetice pentru reducerea riscului de dispariție a speciilor periclitare. Scopul ei pe termen lung este conservarea speciilor ca entități dinamice capabile de a face față schimbărilor mediului. Actualmente accentul se pune pe consecințele care apar în urma reducerii populațiilor mari de odinioară, în care predominau încrucișările între rude îndepărtate (*outbreeding*), la populații mici, în care domină factorii stohastici și endogamia (*inbreeding effects*).

Datele moleculare furnizează cunoștințe asupra istoricului evolutiv și diferențierii genetice ale speciilor, ceea ce ne ajută în luarea de decizii corecte referitoare la prioritățile de conservare. Ca urmare, genetica conservării constituie o aplicație foarte importantă a biologiei moleculare. (Freeland, 2005).

Alături de speciile rare, și speciile comune necesită activități de conservare. Conservarea diversității speciilor comune are alte obiective față de cele în cazul speciilor rare. Deoarece existența speciei nu este periclitată, *fitness*-ul evolutiv al speciei trebuie menținut.

Acest fapt atrage atenția asupra necesității acțiunilor de conservare înainte ca un taxon să ajungă la punctul critic. Probabil, aceasta este cea mai mare provocare pe termen lung a geneticii conservării: nu numai de a salva speciile periclitare, dar și de a preveni taxonii actualmente comuni de a deveni vreodată periclități. Scopul acțiunilor de conservare în cazul speciilor comune este de a păstra variabilitatea genetică a speciilor. Pentru desemnarea populațiilor țintă avem nevoie de studii la nivel de genetica populațiilor. Ca prim pas în cazul conservării speciilor comune este necesar studiul variabilității genetice a speciei țintă (Millar și Libby, 1991).

2. OBIECTIVE

Erythronium dens-canis:

- Studii de filogeografie ale speciei *Erythronium dens-canis* în Bazinul Carpatic de Est cu o prelevare a probelor mai densă decât Bartha și colab. (2015a), concentrate în Munții Apuseni.
- Evaluarea rolului de partiționare a liniilor transilvane de către Munții Apuseni.
- Găsirea unui marker nuclear adecvat și folosirea acestuia în studiul diversității genetice intrapopulaționale.

Scilla bifolia:

- Studii de filogeografie cuprinzând pe cât se poate toată aria de răspândire a speciei în Europa.
- Studiul structurării populațiilor din Bazinul Carpatic.

Ambele specii:

- Determinarea unităților de conservare filogenetică (linii unice, subclade și distribuția lor geografică).
- Determinarea ariilor/populațiilor cu diversitate genetică ridicată (cu valoare conservativă ridicată).
- Înțelegerea originii liniilor, stabilirea posibilelor microrefugii glaciare pentru înțelegerea biogeografiei Bazinului Carpatic.

3. MATERIAL ȘI METODE

3.1. Prelevarea și conservarea probelor

Materialul vegetal a fost colectat în martie-mai 2014 și 2015. Au fost folosite și datele colectărilor din 2013 obținute de Bartha și colab. (2015a), precum și exemplare obținute din herbare și colecții din străinătate (în cazul speciei *Scilla bifolia*). Materialul biologic folosit (o bucată de frunză proaspătă) a fost colectat și conservat până la prelucrare în silicagel.

Ținând cont de obiective, la prelevarea probelor pentru studiul speciei *Erythronium dens-canis* ne-am concentrat asupra Munților Apuseni. Au fost prelevate probe din 107 de

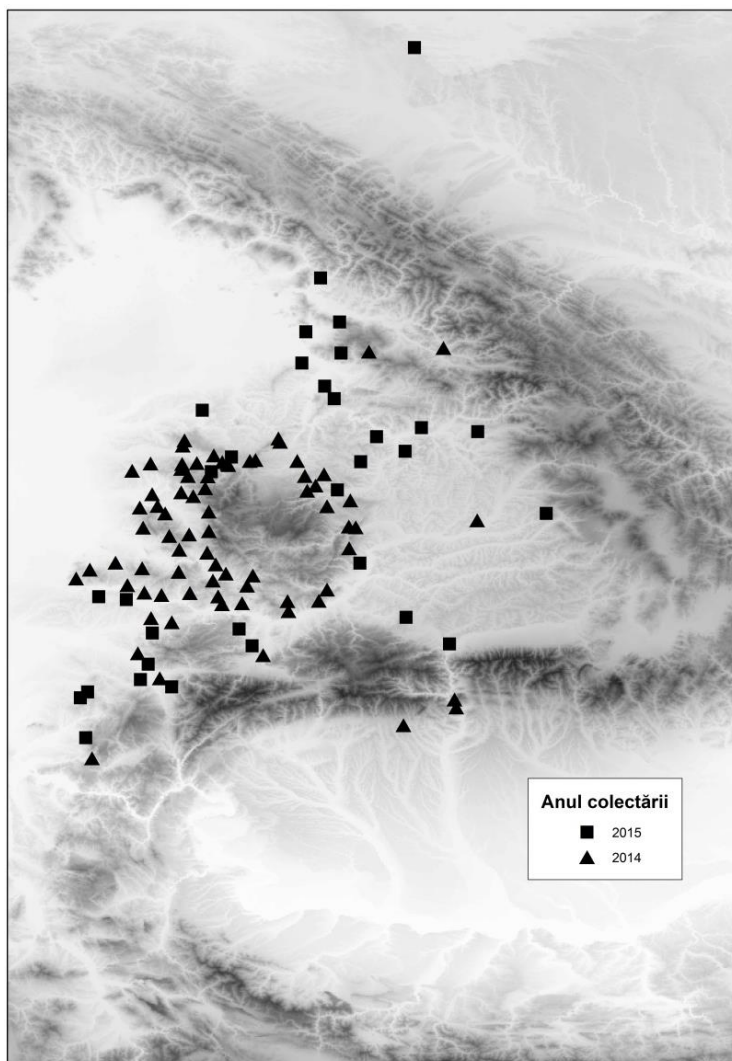


Fig.1. Poziția geografică a populațiilor de *E. dens-canis* luate în studiu

populații (Fig. 1.) la care se adaugă încă 27 de probe din studiul Bartha și colab. (2015a). S-au folosit ca *outgroup*-uri *Erythronium sibiricum* (Fisch. et C.A.Mey.) Krylov, *Erythronium japonicum* Decne. și *Amana edulis* (Miq.) Honda.

În cazul speciei *Scilla bifolia* au fost colectate probe acoperind pe cât posibil arealul total al speciei, cu o prelevare mai densă în Bazinul Carpatic. Un total de 127 de populații de *S.bifolia* au fost eșantionate (Fig. 2.), alături de care în analize s-au introdus specii potențial strâns înrudite, majoritatea din Anatolia, puse la dispoziție de către Hasan Yildirim: *Scilla ingradae*, *S. vardaria*, *S. sardensis*, *S. siehei*, *S.luciliae*, *S. sibirica* ssp. *armena*, *Puschkinia scilloides*, *S. × allenii*. S-au folosit ca *outgroup*-uri *Hyacinthoides italica*, *Hyacinthella heldreichii*, *Scilla leepii*, *Bellevalia koyuncui* și *Muscari mirum*.

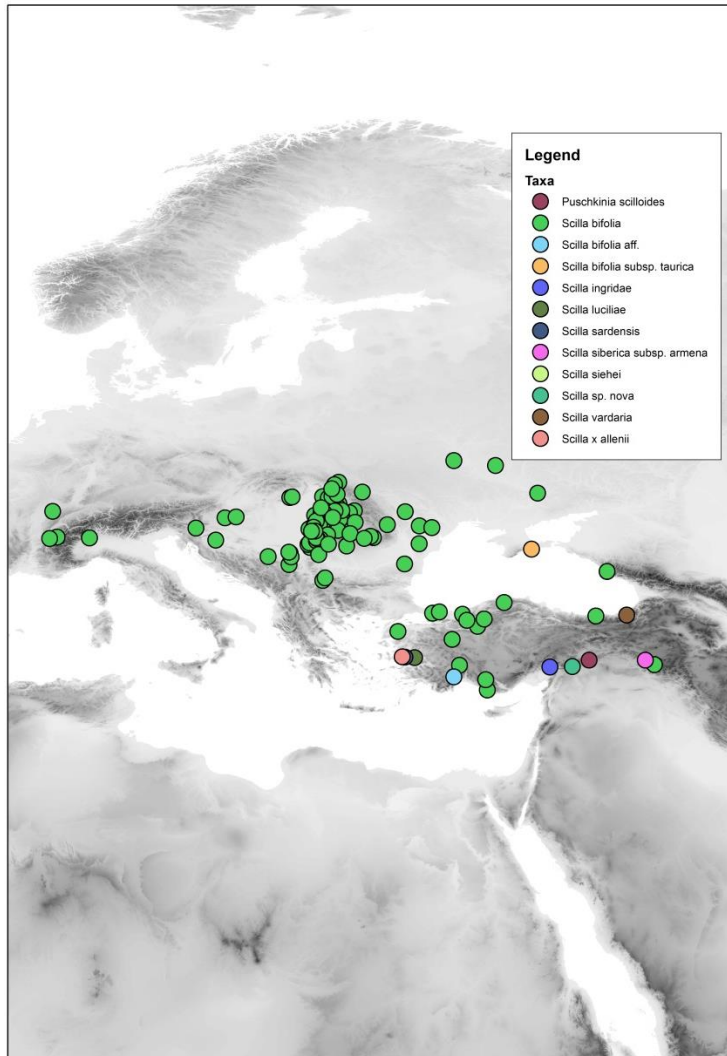


Fig. 2. Poziția geografică a probelor utilizate în studiul speciei *Scilla bifolia* s.l.

3.2. Izolarea ADN

Izolarea ADN s-a făcut dintr-un singur exemplar/populație, cu kitul Analytik Jena, conform protocolului.

3.3. Markerii moleculari folosiți

În cazul speciei *Erythronium dens-canis* s-au folosit regiunile plastidiale *rpl32-trnL* și *rps15-ycf1*. Acestea s-au dovedit a fi unele dintre cele mai variabile locusuri din regiunea plastidială SSC. Pentru analiza variabilității intrapopulaționale am testat markeri nucleari (*low copy*

nuclear gene) din literatură (Denton și colab., 1998; Roncal și colab., 2005; Day și colab., 2014), cât și amorse proiectate în laborator.

În cazul speciei *Scilla bifolia* s-a folosit markerul plastidial *rpl32-trnL*.

3.4. Amplificarea prin PCR

În cazul speciei *Erythronium dens canis* s-a făcut amplificarea a două regiuni plastidiale: *rpl32-trnL* și *rps15-ycf1*, iar la *Scilla bifolia* s-a amplificat regiunea plastidială *rpl32-trnL*.

Reacția de polimerizare în lanț (PCR) s-a efectuat în tuburi Eppendorf de 25μl, cu următoarea compoziție: 12.5 μl 2× MyTaq Red Mix (Bioline, Luckenwalde, Germania), 9.5 μl apă dd, câte 1 μl din cele două amorse (10 μM, Macrogen, Olanda) și 1 μl ADN matriță (*template*) de concentrație necunoscută. Amorsele folosite au fost: *rpl32-F* – *trnL*^(UAG) (în cazul regiunii *rpl32-trnL*) și M1F - M1R (pentru regiunea *rps15-ycf1*).

Amplificarea ADN s-a efectuat într-un Gradient Palm-Cycler™ (Corbett Research, Sidney, Australia), în următoarele condiții: 94°C/4 min., 40 x (94°C/45 sec., 61°C/45 sec., 72°C /45 sec) 72°C/7 min. Succesul reacției a fost verificat prin electroforeză pe gel de agaroză (1%). Produsele PCR au fost purificate pe coloană, folosind Kitul de Purificare PCR (Jena Bioscience, Jena, Germania) pentru secvențializare în tub.

La *Erythronium dens-canis* pentru testarea unor markeri nucleari s-a încercat amplificarea unor regiuni ale unor gene nucleare (*low copy nuclear gene*). Și în acest caz reacția de polimerizare în lanț (PCR) s-a efectuat în tuburi Eppendorf de 25μl, cu compoziția ca și în cazul markerilor plastidiali.

3.5. Secvențializarea

Secvențializarea a fost efectuată prin metoda Sanger la Macrogen Inc. (Olanda), folosind amorsa *reverse* (*trnL*^(UAG)) pentru regiunea *rpl32-trnL* și cea *forward* (M₁) în cazul regiunii *rps15-ycf1*.

3.6. Analize filogenetice și filogeografice

3.6.1. Alinierea secvențelor ADN

Secvențele *rpl32-trnL* și *rps15-ycf1* au fost exportate direct din cromatograme în fișiere de format FASTA folosind ChromasLite v.2.01 (Technelysium Pty).

Secvențele au fost aliniate în MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) pe baza algoritmului ClustalW, urmat de editări manuale.

3.6.2. Generarea rețelei de haplotipuri

Definirea haplotipurilor și generarea rețelei de haplotipuri s-a făcut utilizând TCS (Clement și colab., 2000) la limita de conexiune de 95%, fără luarea în considerare a breșelor.

3.6.3. Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale

S-a folosit analiza *Maximum Likelihood* (ML), bazat pe RA×ML (Stamatakis, 2006) folosind programul Ra×MLGUI v. 1.2 (Silvestro și Michalak, 2012) utilizând modelul GTR + Γ a evoluției secvențelor (după recomandarea manualului RA×ML). Suportul nodurilor pentru topologia ML a fost calculat prin algoritmul rapid bootstrap implementat în RA×ML folosind 500 de replicare (Stamatakis și colab., 2008).

Arborii filogenetici au fost vizualizați și editați în TreeView (Page, 1996), FigTree ver. 1.3.1 (A. Rambaut; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), MrEnt (Zuccon și Zuccon, 2006) și CorelDRAW X3.

3.6.4. Calculul indicilor de diversitate ai cladelor în cazul speciei *Erythronium dens-canis*

În cazul speciei *Erythronium dens-canis* s-au calculat indicii de diversitate genetică ale diferitelor clade, folosind Dna SP v.5.(Librado și Rozas, 2009).

4. REZULTATE

4.1. Rezultatele izolării ADN, ale amplificării secvențelor țintă, secvențializării și alinierii fragmentelor

Prin metoda utilizată s-a reușit izolarea ADN din toate probele. Concentrațiile de ADN genomic obținute sunt cuprinse între 100 și 400 ng/μl.

4.1.1. *Erythronium dens-canis*

4.1.1.1. ADN plastidial

Amplificarea și secvențializarea regiunilor plastidiale *rpl32-trnL* și *rps15-ycf1* au fost făcute cu succes în cazul fiecărui specimen al speciei țintă *Erythronium dens-canis*. Un total de 156 secvențe *rpl32-trnL* și *rps15-ycf1* sunt folosite în prezentul studiu, dintre care un număr de 107 sunt nou-generate.

4.1.1.2. ADN nuclear

Nu s-a reușit amplificarea regiunilor nucleare alese. Ca urmare, din cauza lipsei secvențelor am renunțat la folosirea markerilor nucleari pentru testarea semnalului de filogeografie dintre populații.

4.1.2. *Scilla bifolia*

Amplificarea regiunii *rpl32-trnL* a eșuat în cazul a 10 probe. Majoritatea acestora sunt exemplare de herbar, colectate cu mai mulți ani în urmă. În 4 cazuri nu s-a reușit secvențializarea, iar în 6 cazuri am obținut doar secvențe parțiale. Ca urmare, aceste probe au fost excluse din analize.

4.2. Numărul, structura, distribuția și rețeaua de haplotipuri la *Erythronium dens-canis*

Prin analiza TCS am identificat 63 de haplotipuri de *Erythronium dens-canis* și 3 haplotipuri de *E. caucasicum* (Fig. 3.). Rețeaua de haplotipuri prezintă o structurare clară. Combinând informațiile referitoare la originea geografică a haplotipurilor și topologia rețelei, 7 mari grupe pot fi identificate:

– o grupă caucaziană – care cuprinde cele trei probe de *E. caucasicum* din studiul Bartha și colab. (2015a)

– o grupă non-transilvană (grupa colorată în galben) – care conține haplotipuri din aproape toată aria de răspândire a speciei, de la coastele Oceanului Atlantic până la versanții de sud ai Carpaților Meridionali, excepție făcând majoritatea probelor din Transilvania. (Grupa cuprinde probe mai ales din studiul Bartha și colab. (2015a)

– o grupă transilvană care cuprinde următoarele subgrupe: patru sugbrupe care conțin probe din Transilvania, corespunzătoare celor 4 clade identificate prin reconstrucția arborilor filogenetici (vezi mai jos). Acestea sunt t1 (grupa colorată în albastru), t2 (grupa colorată în roșu), t3 (grupa colorată în verde) și t5 (grupa colorată în portocaliu) și o subgrupă (t4) de care aparțin cele două probe dintr-o populație din Croația din studiul Bartha și colab. (2015a)

Grupa non-transilvană prezintă formă de stea, în centrul ei fiind cel mai frecvent haplotip, care însumează 22 de probe. Acesta prezintă și o arie de distribuție largă. De acest haplotip central se leagă cu una-până la câțiva pași mutaționali 16 haplotipuri mai rare, majoritatea lor fiind reprezentate de o singură probă.

Probele din Transilvania, deși provin dintr-un spațiu geografic mai restrâns, prezintă o structurare mult mai complexă.

Dintre cele 4 grupe transilvane, t1 este cea mai numeroasă. Se structurează în două subgrupe: una are în centru un haplotip larg răspândit, care însumează 23 de probe. De acest haplotip central se leagă la o distanță de o singură mutație 8 haplotipuri rare, iar la câțiva pași de mutații încă 6 haplotipuri. Cealaltă subgrupă este mai puțin numeroasă, se leagă de prealabilă cu un haplotip central alcătuit din 8 probe, de acesta fiind legate mai strâns sau mai lax 7 haplotipuri, una dintre acestea fiind reprezentat de 6 probe, restul sunt haplotipuri rare.

Grupa t2 prezintă o structurare mai puțin evidentă, însumând un total de 13 haplotipuri. Dintre aceștia unul este mai numeros (7 probe), unul de trei și unul de două probe, restul haplotipurilor fiind formate doar de o singură probă.

Grupa t3 are două haplotipuri mai mari, cu 8, respectiv 7 probe, alături de două haplotipuri reprezentate de o singură probă. De una dintre acestea se leagă la un pas un haplotip cu 2 probe, iar de acesta altul, de asemenea cu 2 probe.

Grupa t5 este compusă dintr-un singur haplotip, cu 3 probe.

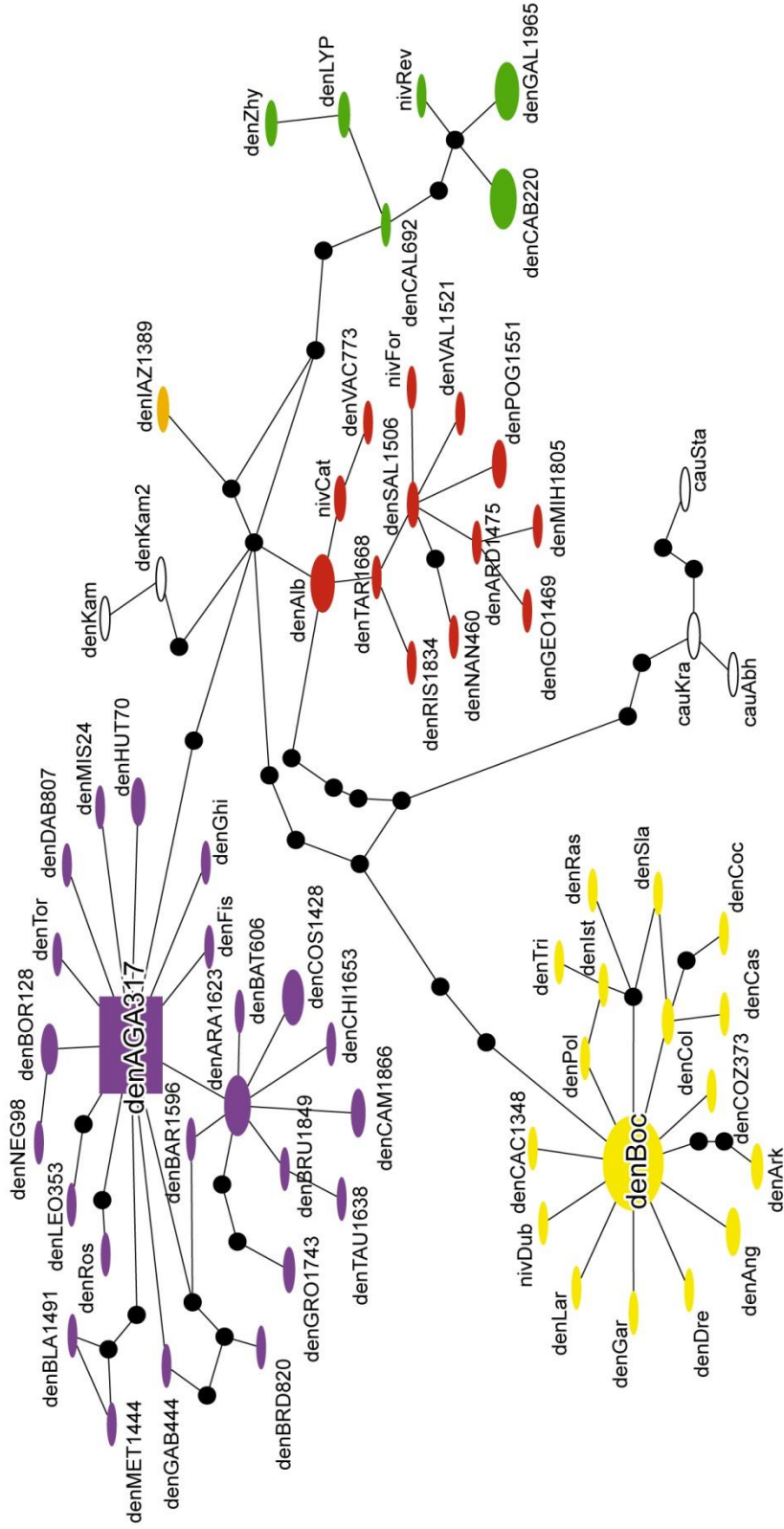


Fig. 3. Rețeaua de haplotipuri a speciei *Erythronium dens-canis*. Culorile corespund cladelor de pe Fig. 5. Dimensiunea cercurilor este proporțională cu numărul probelor care aparțin haplotipului respectiv. Punctele reprezintă haplotipurile neșantionate.

4.3. Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale

4.3.1. *Erythronium dens-canis*

Analiza arborelui filogenetic generat prin metoda ML (Fig. 4.) ne arată existența a trei linii majore: o linie non-transilvană (nT-18 probe din România), o linie caucaziană și o linie transilvană, cu mai multe clade: t1, t2, t3, t4 și t5.

Erythronium sibiricum, folosit ca *outgroup* apare ca și cladă soră cu o grupă trihotomică bine suportată (*bootstrap* 90%), formată din cele trei clade (caucaziană, non-transilvană și transilvană bine suportate – valori *bootstrap* 99, 91 și 89). Clada transilvană prezintă o politomie, alcătuită din 5 clade moderat până la bine suportate: valori *bootstrap* 53-96.

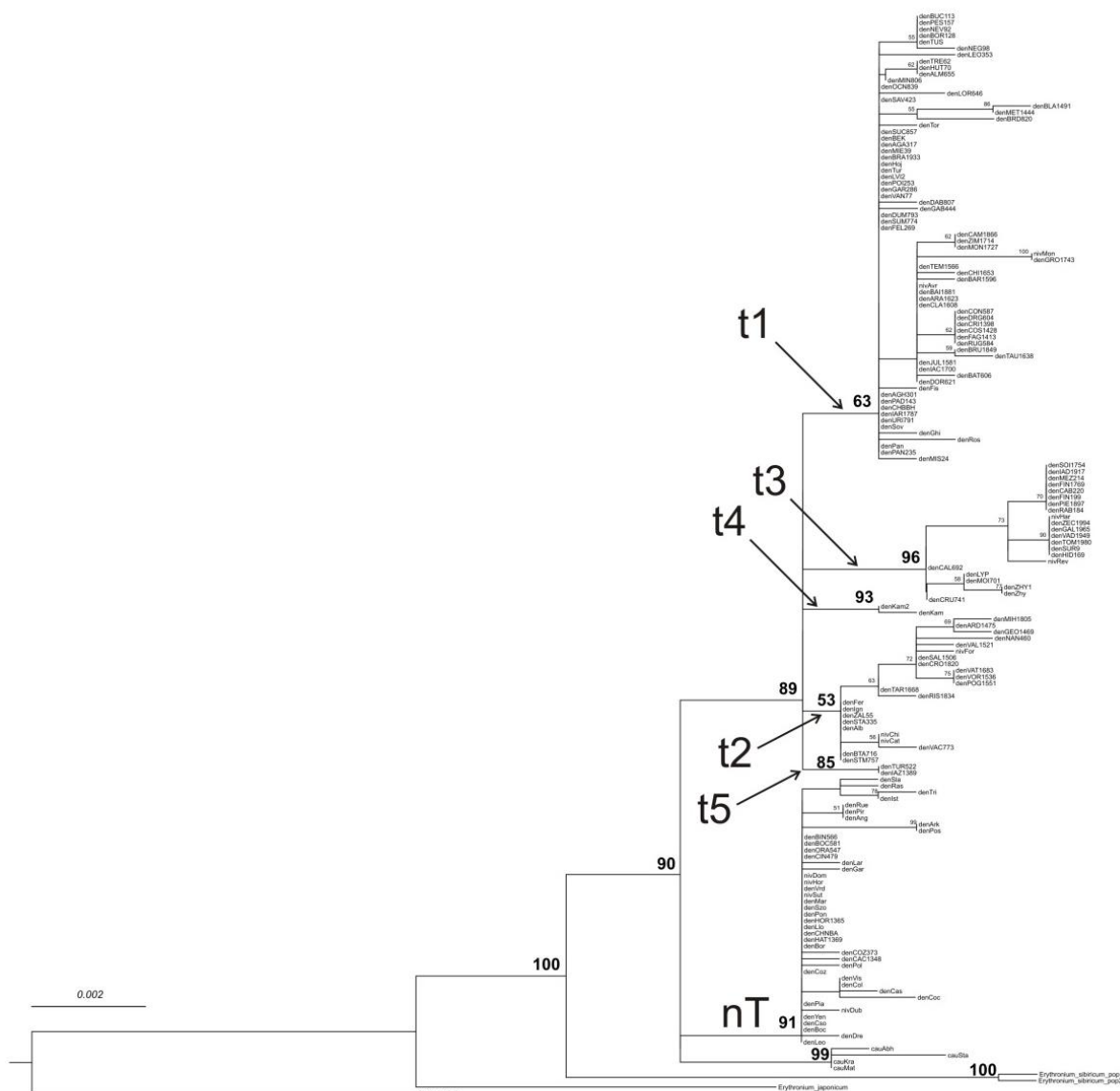


Fig. 4. Arborele generat prin metoda ML folosind secvențele plastidiale *rpl32-trnL* și *rps15-ycf1* de *Erythronium dens-canis*

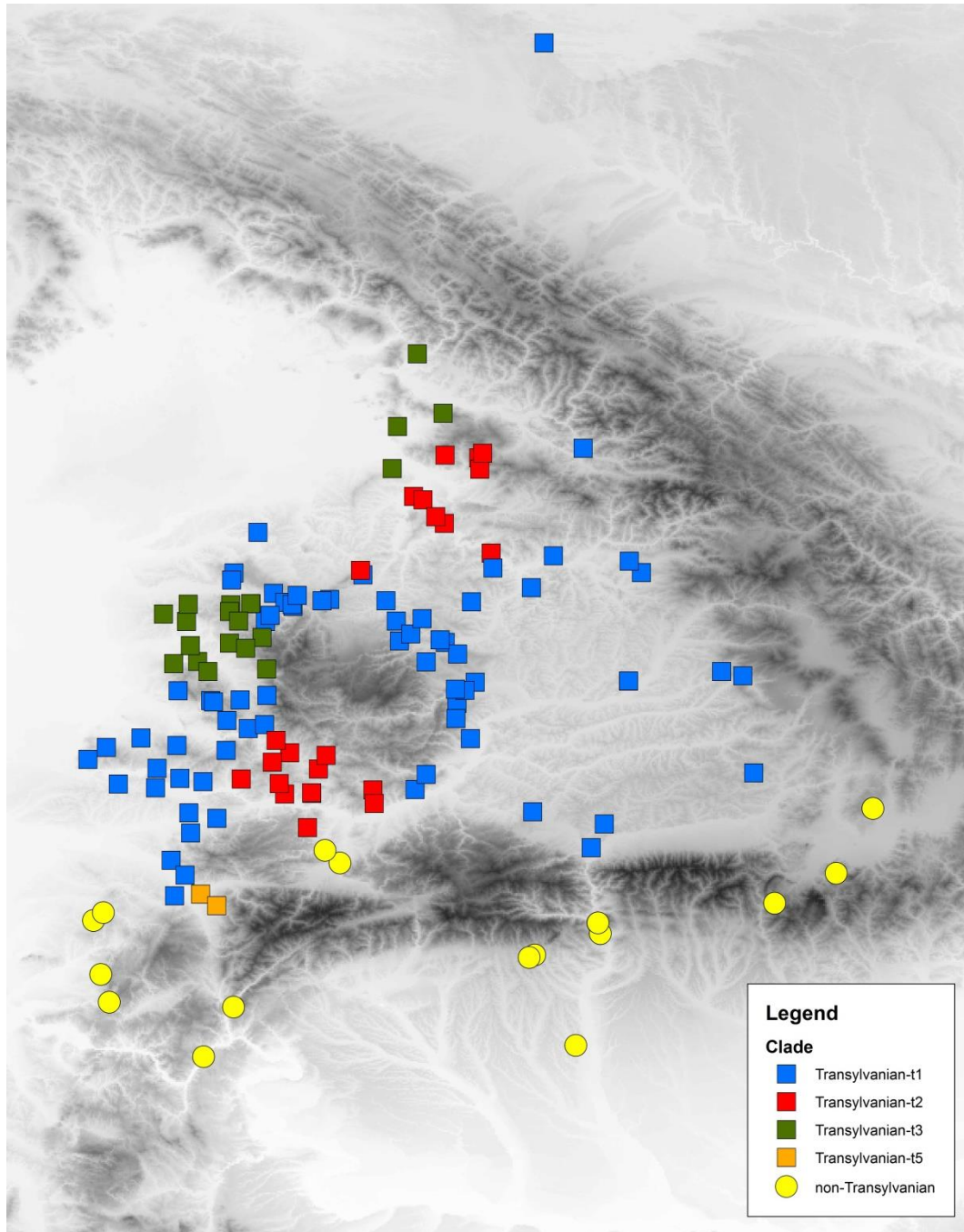


Fig. 5. Poziția geografică a probelor de *Erythronium dens-canis* analizate aparținând diferitelor clade

Examinarea atentă a cladelor luând în considerare distribuția geografică a probelor, (Fig. 5.) duce la concluzia că linia non-transilvană, chiar dacă cuprinde mai puține probe, este destul de larg răspândită. Probele aparținând acestei clade sunt răspândite în Carpații Meridionali și Orientali.

Liniei caucaziene aparțin probe din studiul Bartha și colab. (2015a).

Linia transilvană este puternic structurată:

– în clada t1 putem identifica o subcladă inserată între celelalte probe. Probele aparținând acestei subclade au o distribuție îndepărtată față de majoritatea probelor distribuite în Transilvania. Ele se situează la sud-vest de Munții Apuseni, în timp ce restul probelor provin din estul și nordul Munților Apuseni.

– în cazul cladei t2 întâlnim o situație similară, dar cu poziționare geografică diferită. Aici subclada are o poziție terminală în clada t2, iar probele care-i aparțin se găsesc în sudul Munților Apuseni, în timp ce restul probelor din clada t2 se găsesc în nordul Munților Apuseni.

– cladei t3 aparțin puține probe, dar și aici putem identifica două subclade. Probele care aparțin subcladei bazale se găsesc în partea de nord a Arcului Carpat, în Ucraina, în timp ce probele care aparțin subcladei distanțe sunt prezente doar pe o arie restrânsă a Munților Apuseni, în Văile Crișului Negru și Crișului Repede.

– clada t4 cuprinde două probe din Croația, probele provin din studiul lui Bartha și colab. (2015a).

– clada t5 este una compusă doar din două probe provenite din două populații din Banat.

4.3.2. *Scilla bifolia*

Patru linii plastidiale majore au fost identificate după generarea arborelui filogenetic prin metoda ML în cadrul probelor analizate, notate A, B, C și D.(Fig. 6.): o presupusă cladă ancestrală (clada A), care apare ca și cladă soră cu o grupă politomică, compusă din cladele B, C și D.

Analizând distribuția geografică a cladelor (Fig. 7.), se poate concluziona că și în acest caz, ca și în cazul speciei *Erythronium dens-canis*, clada B are origine transilvană. Clada C este una caucaziană, iar clada D cea non-transilvană.

Clada A cuprinde doar 4 probe, dintre care 3 apar la sud de Marea Neagră iar cea de-a patra în Peninsula Crimeea.

Clada B cuprinde toate cele 37 de probe din interiorul Arcului Carpat, această cladă are o arie de distribuție restrânsă. Clada B are o subcladă anatoliană inserată între probele din Transilvania. Această subcladă cuprinde mai ales speciile înrudite cu *S. bifolia*, dar și 3 probe de *S. bifolia*.

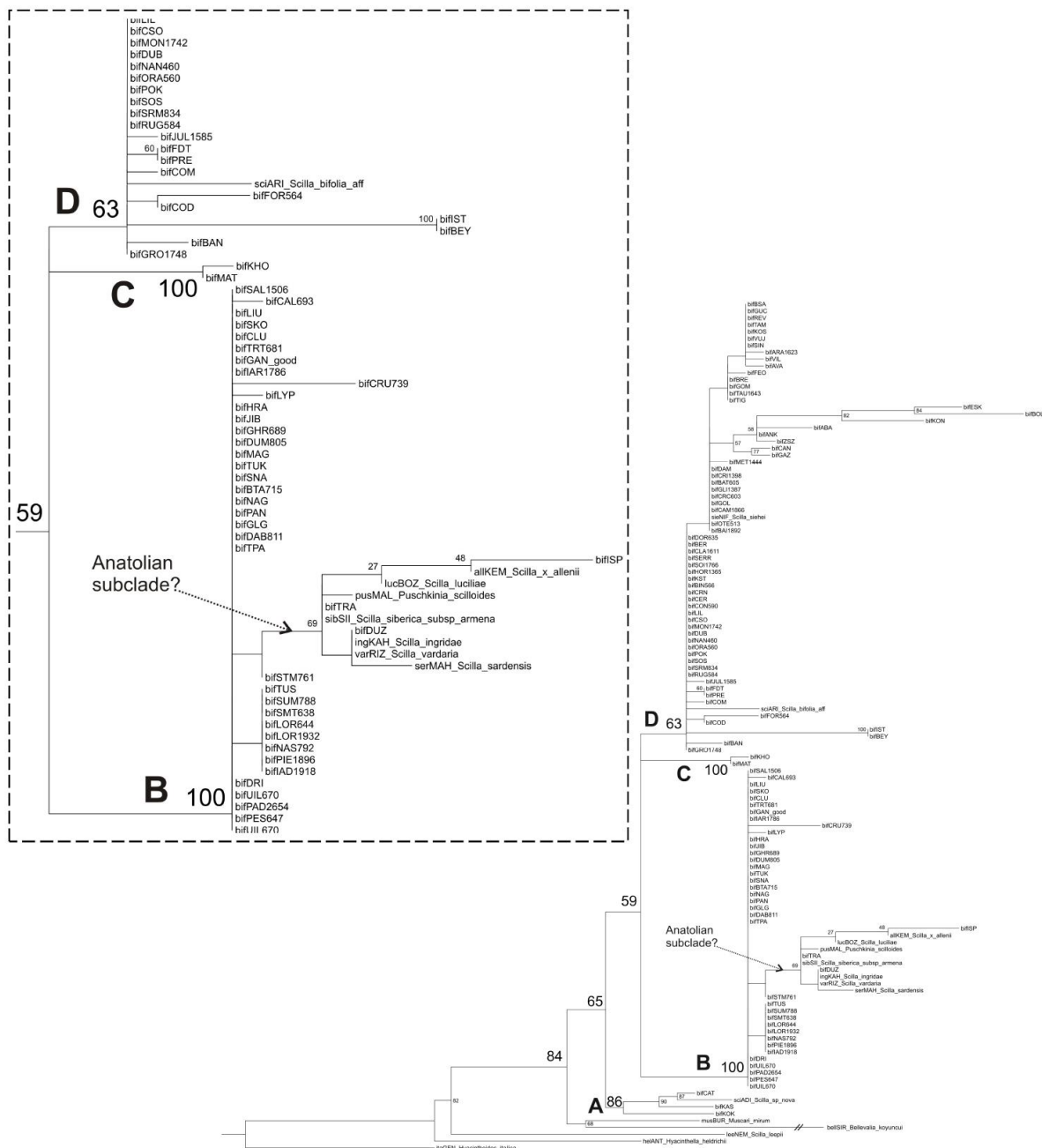


Fig. 6. Arborele generat prin metoda ML folosind secvențele plastidiale *rpl32-trnL* la *Scilla bifolia* s.l. și speciile înrudite

Clada C, cea cauzasiană cuprinde doar două probe din Rusia.

Clada D este clada cea mai mare, cuprinde cele mai multe probe (64 *S. bifolia* și două specii înrudite) și în același timp este clada cu aria de distribuție cea mai largă.

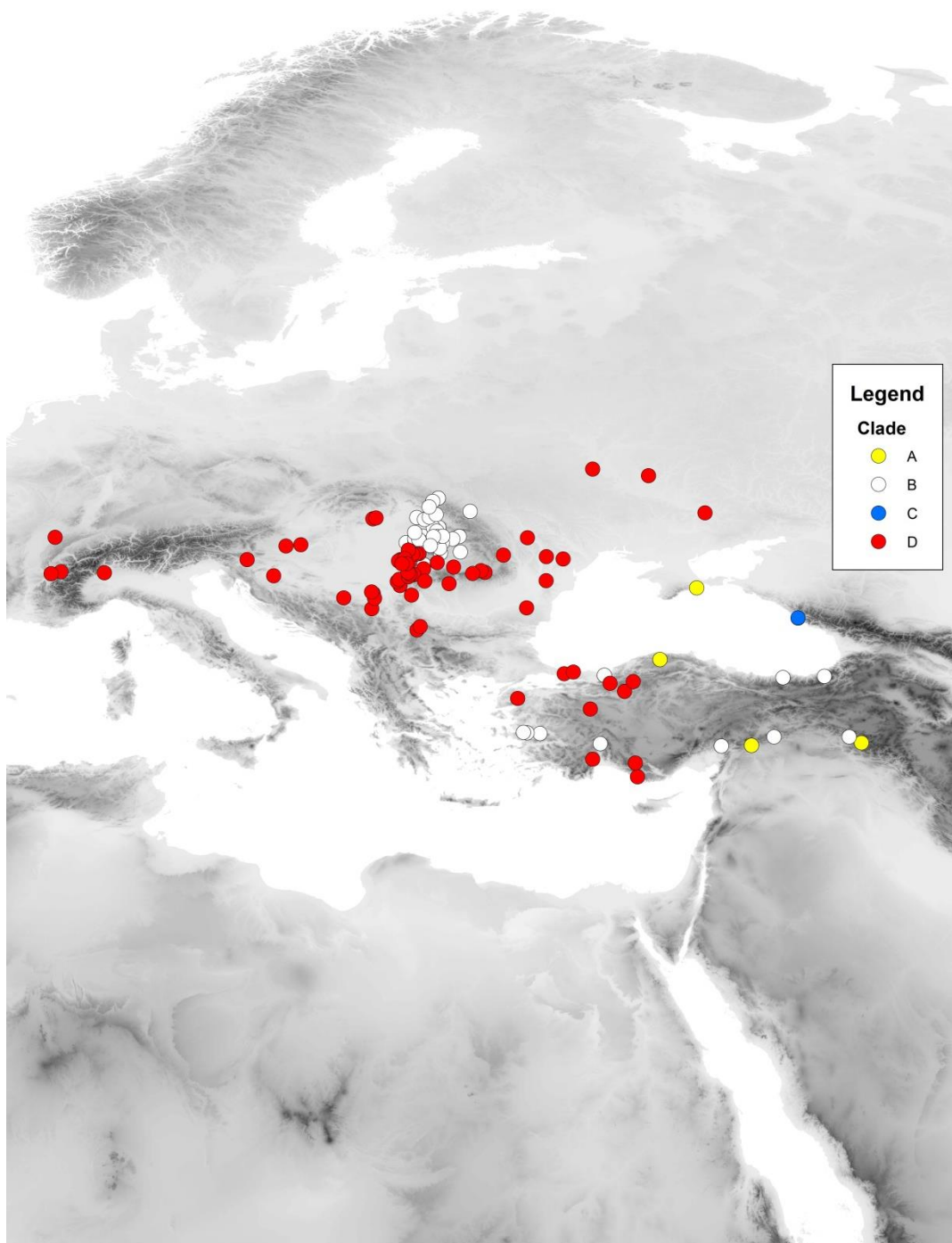


Fig. 7. Poziția geografică a probelor de *Scilla bifolia* s.l. și speciilor înrudite analizate aparținând diferitelor clade

4.4. Indici de diversitate genetică ai cladelor de *Erythronium dens-canis*

În Tabelul 1 sunt prezentați indicii de diversitate genetică calculați în cazul celor patru clade specifice filogeografiei *Erythronium dens-canis*. Nu s-au făcut calcule pentru clada caucaziană și cladele t4 și t5, deoarece aceștia însumează un număr prea mic de probe.

Tab. 1. Valorile indicilor de diversitate genetică ai cladelor la *E.dens-canis*

Indici de diversitate	Clade			
	nT	t1	t2	t3
Numărul secvențelor	42	66	23	21
Numărul pozițiilor polimorfe (S)	17	26	13	7
Numărul haplotipurilor (h)	16	24	13	6
Diversitatea haplotipurilor (Hd)	0.7	0.856	0.897	0.757
Diversitatea nucleotidelor (Pi)	0.00105	0.00136	0.00168	0.00166

5. DISCUȚII

5.1. *Erythronium dens-canis*

Structurarea liniilor și cladelor identificate poate fi explicată prin vicarianță sau dispersia speciei pe distanțe lungi.

În formarea liniei transilvane vicarianța a avut rol important, linia fiind rezultatul divergenței alopatrice (Bartha și colab. , 2015a). Barierele geografice care au contribuit la formarea acestei linii sunt Câmpia Panonică în vest, Carpații Meridionali în sud și Carpații Orientali în est.

În cazul cladelor t1-t4, în absența barierelor geografice, dispersia pe distanțe lungi (*long distance dispersal*) poate da explicația structurării lor.

Poziționarea derivată (*nested*) a liniei genetice în cadrul cladei t1 cu distribuție la sud-vest de Munții Apuseni ne arată că această subcladă s-a format mai târziu. Ca urmare, luând în considerare poziționarea geografică a subcladelor putem afirma că clada t1 s-a format la est de Munții Apuseni, într-un posibil refugiu glaciatic criptic în Bazinul Transilvan, apoi datorită unor procese de dispersie pe distanță lungă (*long-distance dispersal*) s-a stabilit și răspândit la sud-vest de Munții Apuseni (Fig. 8).

În clada t2 la fel, avem de a face cu refugii criptice, dar cu această ocazie în nordul Munților Apuseni, urmată de o dispersie pe distanță lungă la sud de Munții Apuseni (Fig. 9).

În clada t3 populațiile din partea de nord ale Carpaților Orientali sunt cele ancestrale, cele din Văile Crișului Repede și Crișului Negru s-au stabilit probabil mai târziu, datorită tot a dispersiei pe distanțe lungi (Fig. 10).

Putem afirma deci, că în cazul speciei *Erythronium dens-canis* conform teoriei refugiu în cadrul refugiului (*refugia within refugia*, (Gómez și Lunt, 2007)) avem de-a face cu un refugiu glaciatic extra-mediteranean în Bazinul Carpatic de Est, cu microrefugii de poziție exactă necunoscută, localizate în estul și nordul Munților Apuseni, precum și în nordul Carpaților Orientali.

Diversitatea haplotipurilor mai mare în cladele t1 și t2 (Tabelul 1) ne arată că aceste clade erau prezente cu populații mai mari în LGM. Totodată distribuția actuală restrânsă a cladei t3, cât și probabil mărimea mică a populației în LGM este subliniată și de diversitatea genetică mai scăzută față de cele ale cladelor t1 și t2 (Tabelul 1).

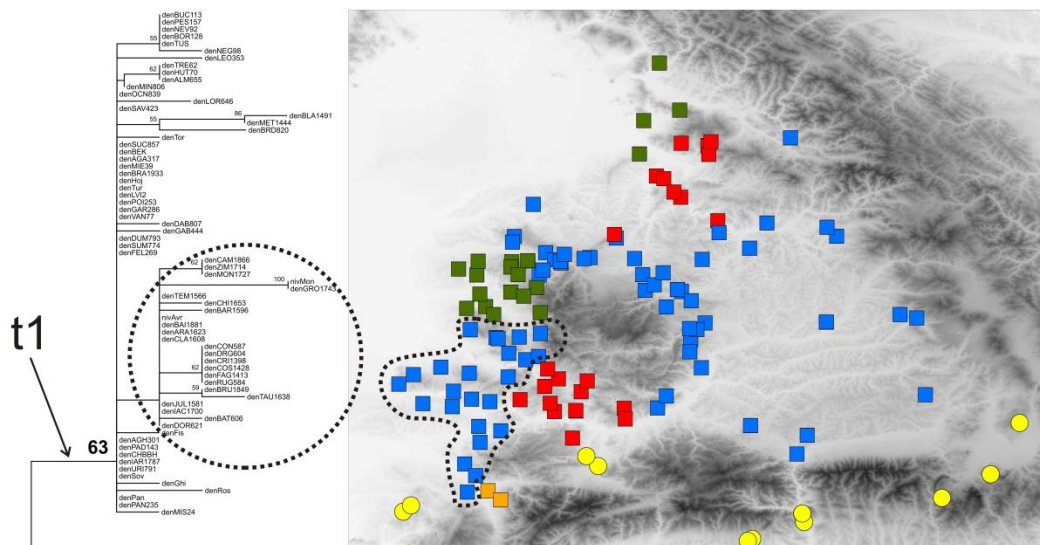


Fig. 8. Poziția subcladelor t1 pe filogramă și poziționarea lor geografică

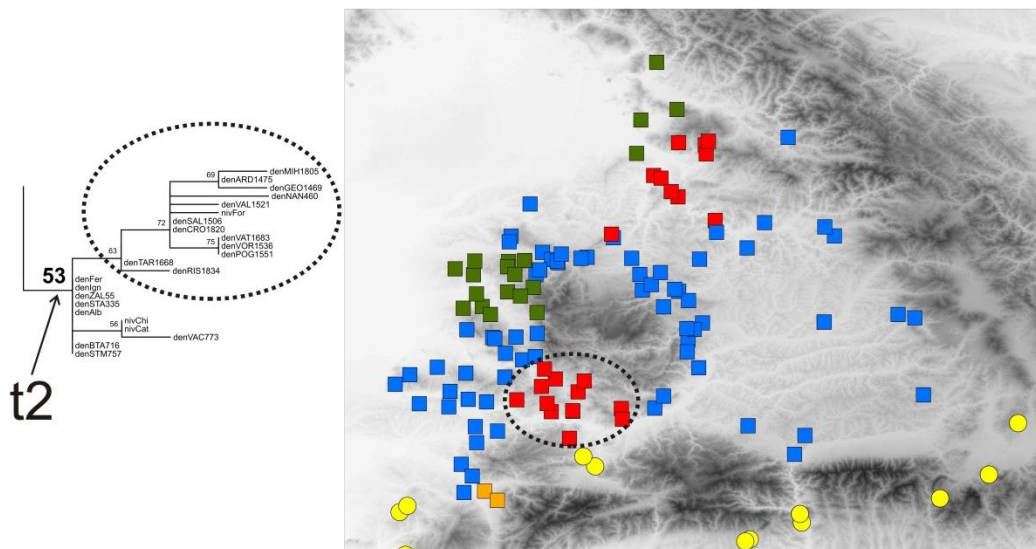


Fig. 9. Poziția subcladelor t2 pe filogramă și poziționarea lor geografică

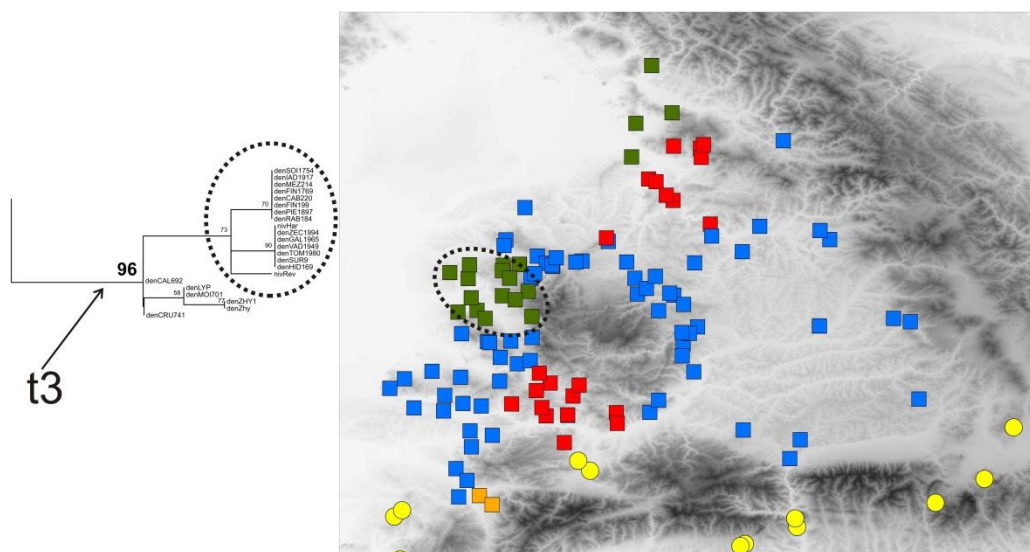


Fig. 10. Poziția subcladelor t3 pe filogramă și poziționarea lor geografică

Probele din clada t4 provin dintr-o populație din Croația – interesant este prezența lor în linia transilvană. Bartha și colab. (2015a) consideră această cladă o unitate evolutivă distinctă și ca urmare de valoare conservativă ridicată.

Toate cladele identificate reprezintă linii genetice unice și ca urmare servesc ca unități filogenetice de conservare. Cladele t1 și t2 au diversitatea genetică cea mai mare. Areele cu diversitate genetică crescută au un rol important în conservarea unei proporții semnificative a

diversității unei specii și a potențialului său evolutiv (Taberlet și Cheddadi, 2002). Ca urmare, aceste două clade au valoare conservativă ridicată.

Deoarece clada t5 are aria de distribuție cea mai restrânsă, la limita de sud a liniei transilvane, exemplarele acestei populații au o valoare conservativă ridicată, la fel ca și populațiile din Văile Crișului Negru și Crișului Repede.

5.2. *Scilla bifolia*

Factorii care explică structurarea cladelor la specia *Scilla bifolia* sunt cele prezentate la specia anterioară: factori biogeografici (bariere, refugii criptice) și evenimente stohastice. Clada transilvană este foarte exact delimitată – și în acest caz specia a supraviețuit LGM în refugii criptice extra-mediteraneene în Bazinul Carpatic de Est.

Clada B are inserată între probele din Transilvania o subcladă anatoliană, de origine secundară în Asia Mică. Pot exista două explicații pentru formarea acestor taxoni diferiți în Anatolia: 1. procese de evoluție radiativă după stabilirea exemplarelor în Anatolia sau 2. acești taxoni noi au suferit *introgressive chloroplast capture*. La stadiul actual al cercetărilor asupra *Scilla bifolia* s.l. nu putem decide care dintre aceste două explicații este cea corectă.

6. CONCLUZII

- Structurarea filogeografică a celor două specii este clară.
- Cele două specii studiate prezintă aceeași structurare. În cazul ambelor specii topologia ne arată existența clară a unei linii transilvane, cu arie de răspândire bine conturată, limitată în Bazinul Carpatic de Est. Această linie atestă existența unor refugii criptice extra-mediteraneene în această zonă.
- În cazul speciei *E. dens-canis* linia transilvană prezintă 4 clade distincte. Existența acestora indică conform teoriei refugiului în cadrul refugiului (*refugia within refugia*) existența unor microrefugii cu poziție exactă necunoscută. Acestea se localizează în cazul cladei t1 la est, în cazul cladei t2 la nord de Munții Apuseni, iar în cazul cladei t3 în partea de nord a Carpaților Orientali, în Ucraina. Din aceste microrefugii s-au format liniile genetice (subcladele) din sud-vestul (subclada t1) și sudul (subclada t2) Munților Apuseni,

cât și cele din Văile Crișului Negru și Repede (subclada t3), prin procesul de dispersie pe distanțe lungi (*long distance dispersal*).

- Istoria cuaternară a speciei *E. dens-canis* în Bazinul Carpatic a fost afectată atât de factori biogeografici (microrefugii, bariere – formarea liniei transilvane) cât și de evenimente stohastice (dispersie pe distanță lungă – *long distance dispersal* – formarea subcladelor).
- În cazul speciei *Scilla bifolia* au fost identificate patru linii genetice: o cladă ancestrală, una de origine transilvană (cu arie de răspândire restrânsă), o cladă caucaziană și o cladă non-transilvană, cu aria de distribuție largă.
- Clada de origine transilvană are inserată între probele din Transilvania o subcladă anatoliană, de origine secundară în Asia Mică. Pot exista două explicații pentru formarea acestor taxoni diferiți în Anatolia:
 1. Procese de evoluție radiativă după stabilirea exemplarelor în Anatolia sau
 2. Acești taxoni noi au suferit *introgressive chloroplast capture*. În stadiul actual al cercetărilor asupra *Scilla bifolia* s.l. nu putem decide care dintre aceste două explicații este cea corectă.
- Toate cladele identificate sunt unice și ca urmare servesc ca unități filogenetice de conservare.
- Cladele t1 și t2 au diversitatea genetică cea mai mare. Ca urmare aceste clade au cea mai mare șansă de a avea potențial evolutiv și capacitate de adaptare în condițiile schimbărilor climatice viitoare. Din aceste considerente populațiile aparținând acestor clade au valoare conservativă ridicată.
- Clada t5 din sudul Banatului este o cladă foarte mică și se situează la limita de sud a liniei transilvane. Ca urmare, aceste populații sunt probabil cele mai periclitare în condițiile schimbărilor climatice viitoare.
- Populațiile din Văile Crișului Negru și Repede din clada t3 au o distribuție foarte restrânsă și, ca urmare, au o valoare conservativă ridicată.
- În prezent, populațiile de pe câmpie au devenit rare, datorită înlocuirii vastelor habitate împădurite cu terenuri agricole. Defrișarea în masă a pădurilor de la zonele de câmpie până în cele montane poate duce la fragmentarea populațiilor, scăderea dimensiunii lor (cu toate consecințele negative asupra geneticii populațiilor) și în cele din urmă la extincția lor.

7. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Allen, G. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S. 2003. Phylogeny and biogeography of *Erythronium* (LILIACEAE) inferred from chloroplast matK and nuclear rDNA ITS sequences. *Systematic Botany*. **28**(3): 512-523.
- Avice, J. C. 2000. Phylogeography. The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball Jr., R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **18**: 489-522.
- Bálint, M., Ujvárosi, L., Theissinger, K., Lehrian, S., Mészáros, N., Pauls, S. U. 2011. The Carpathians as a Major Diversity Hotspot in Europe. *In Biodiversity Hotspots. Edited by Zachos, F. E., and Habel, J. C. Springer Verlag, Berlin Heidelberg*. pp. 189-205.
- Bănărescu, P., Boşcaiu, N. 1973. Biogeografie. Perspectivă genetică și istorică. Editura științifică, București.
- Bartha, L., Sramkó, G., Volkova, P., Surina, B., Ivanov, A., Banciu, H. 2015a. Patterns of plastid DNA differentiation in *Erythronium* (Liliaceae) are consistent with allopatric lineage divergence in Europe across longitude and latitude. *Plant Systematics and Evolution*. **301**(6): 1747-1758.
- Bartha, L., Stepanov, N., Rukšāns, J., Banciu, H., Keresztes, L. 2015b. Non-monophyly of Siberian *Erythronium* (Liliaceae) leads to the recognition of the formerly neglected *Erythronium sajanense*. *Journal of Plant Research*. 1-9.
- Bhagwat, S. A., Willis, K. J. 2008. Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits? *Journal of Biogeography*. **35**(3): 464-482.
- Birks, H. J. B., Willis, K. J. 2008. Alpines, trees and refugia in Europe. *Plant Ecol Divers*. **1**: 147-160.
- Bremer, B., colab., ș. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **161**(2): 105-121.
- Ciocârlan, V. 2009. Flora ilustrată a României: Pteridophyta et Spermatophyta. Editura Ceres, București.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. **9**: 1657-1659.
- Clennett, J. C. B., Chase, M. W., Forest, F., Maurin, O., Wilkin, P. 2012. Phylogenetic systematics of *Erythronium* (LILIACEAE): morphological and molecular analyses. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **170**(4): 504-528.
- Csergő, A.-M., Schönswetter, P., Mara, G., Deák, T., Boşcaiu, N., Höhn, M. 2009. Genetic structure of peripheral, island-like populations: a case study from *Saponaria bellidifolia* Sm. (Caryophyllaceae) in the Romanian Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*. **278**: 33-41.

- Day, P. D., Berger, M., L., H., Fay, M. F., Leitch, A. R., I.J., L., L.J., K. 2014. Evolutionary relationships in the medicinally important genus *Fritillaria* L. (LILIACEAE). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **80**: 11-19.
- Denton, A. L., McConaughy, B. L., Hall, B. D. 1998. Usefulness of RNA Polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*. **15**: 1082-1085.
- Ehrlich, D., Gaudeul, M., Assefa, A., Koch, M. A., Mummenhof, K., Nemomissa, S., Intrabiodiv-Consortium1, Brochmann, C. 2007. Genetic consequences of Pleistocene range shifts: Contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology*. **16**: 2542–2559.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**(4): 783-791.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Rev Genet*. **29**: 305-327.
- Freeland, J. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sond Ltd.
- Ghavami, E., Jamzad, Z., Tavasoli, A. 2009. Evaluation of pollen morphology as a taxonomic character for generic delimitation in *Scilla* s.l. (HYACINTHACEAE). *Nordic Journal of Botany*. **27**(6): 510-515.
- Gómez, A., Lunt, D. H. 2007. Refugia within refugia: Patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In *Phylogeography of southern European refugia*. Edited by Weiss, S., and Ferrand, N. Springer, Dordrecht. pp. 155–188.
- Guitián, J., Guitián, P., Medrano, M., Sanchez, J. M. 1999. Variation in floral morphology and individual fecundity in *Erythronium dens-canis* (LILIACEAE). *Ecography*. **22**: 708-714.
- Guitián, P., Medrano, M., Guitián, J. 2003. Seed dispersal in *Erythronium dens-canis* L. (LILIACEAE): variation among habitats in a myrmecochorous plant. *Plant Ecology*. **169**(2): 171-177.
- Hampe, A., Petit, R. J. 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*. **8**(5): 461-467.
- Hewitt, G. M. 1999. Post-glacial recolonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*. **68**(1-2): 87-112.
- Ibrahim, K. M., Nichols, R. A., Hewitt, G. M. 1996. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity*. **77**(3): 282-291.
- Kotlík, P., Deffontaine, V., Mascheretti, S., Zima, J., Michaux, J. R., Searle, J. B. 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **103**(40): 14860-14864.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. **25**: 1451-1452.
- Michl, T., Huck, S., Schmitt, T., Liebrich, A., Haase, P., Büdel, B. 2010. The molecular population structure of the tall forb *Cicerbita alpina* (Asteraceae) supports the idea of cryptic glacial refugia in central Europe. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **164**(2): 142-154.

- Millar, C. I., Libby, W. J. 1991. Strategies for Conserving Clinal, Ecotypic, and Disjunct Population Diversity in Widespread Species. *In Genetics and Conservation of Rare Plants. Edited by Falk, D. A., and Holsinger, K.* Oxford University Press.
- Moore, D. M. 1982. Flora Europaea check-list and chromosome index. Cambridge University Press.
- Page, R. D. M. 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. **12**(4): 357–358.
- Patterson, T. B., Givnish, T. J. 2002. Phylogeny, concerted convergence and phylogenetic niche conservatism in the core Liliales: insights from *rbcL* and *ndhF* sequence data. *Evolution*. **56**: 233-252.
- Pauls, S. U., Theissinger, K., Ujvárosi, L., Bálint, M., Haase, P. 2009. Patterns of population structure in two closely related, sympatric caddisflies in Eastern Europe: historic introgression, limited dispersal and cryptic diversity. *J North Am Benthol Soc*. **28**: 517-536.
- Provan, J., al., e. 2005. Phylogenetic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology*. **14**: 793-803.
- Provan, J., Bennett, K. D. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution*. **23**(10): 564-571.
- Puşcaş, M., Choler, P., Tribsch, A., Gielly, L., Rioux, D., Gaudeul, M., Taberlet, P. 2008. Post-glacial history of the dominant alpine sedge *Carex curvula* in the European Alpine System inferred from nuclear and chloroplast markers. *Molecular Ecology*. **17**(10): 2417-2429.
- Richardson, I. B. K. 1980. *Erythronium* L. *In Flora Europaea V. Edited by T.G., T., V.H., H., N.A., B., D.H., V., S.M, W., and Webb, D. A.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Roncal, J., Francisco-Ortega, J., Asmussen, C. B., Lewis, C. E. 2005. Molecular phylogenetics of tribe Geonomeae (ARECACEAE) using nuclear DNA sequences of phosphoribulokinase and RNA polymerase II. *Systematic Botany*. **30**: 275-283.
- Ronikier, M. 2011. Biogeography of high-mountain plants in the Carpathians: An emerging phylogeographical perspective. *Taxon*. **60**(2): 373-389.
- Ronikier, M., Cieślak, E., Korbecka, G. 2008. High genetic differentiation in the alpine plant *Campanula alpina* Jacq. (Campanulaceae): evidence for glacial survival in several Carpathian regions and long-term isolation between the Carpathians and the Alps. *Molecular Ecology*. **17**(7): 1763-1775.
- Ronikier, M., Schneeweiss, G. M., Schönswetter, P. 2012. The extreme disjunction between Beringia and Europe in *Ranunculus glacialis* s. l. (Ranunculaceae) does not coincide with the deepest genetic split – a story of the importance of temperate mountain ranges in arctic–alpine phylogeography. *Molecular Ecology*. **21**(22): 5561-5578.
- Sanda, V., Popescu, A., Doltu, M. I., Doniță, N. 1983. Caracterizarea ecologică și fitocenologică a speciilor spontane din flora României. *Studii și comunicări Științele Naturael Muzeul Bruckenthal*.(25 Supl.): 95, 96.
- Sang, T. 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **37**(3): 121-147.

- Săvulescu, T. 1966. Flora R.S.R. *Edited by Săvulescu, T.* Edit. Acad. R.S.R., România. pp. 304-305.
- Schmitt, T. 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*. **4**(11): 1-13.
- Schmitt, T., Rákosy, L., Abadjiev, S., Müller, P. 2006. Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography*. **34**: 939-950.
- Schmitt, T., Varga, Z. 2012. Extra-Mediterranean refugia: The rule and not the exception? *Front Zool*. **9**(1): 22.
- Schneeweiss, G. M., Schönswetter, P. 2011. A re-appraisal of nunatak survival in arctic-alpine phylogeography. *Molecular Ecology Notes*. **20**: 190–192.
- Schönswetter, P., Stehlik, I., Holderegger, R., Tribsch, A. 2005. Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. *Molecular Ecology*. **14**(11): 3547-3555.
- Sedivá, A., Janko, K., Slechtová, V., Kotlík, P., Simonovic, P., Delic, A., Vassilev, M. 2008. Around or across the Carpathians: colonization model of the Danube basin inferred from genetic diversification of stone loach (*Barbatula barbatula*) populations. *Molecular Ecology*. **17**: 1277-1292.
- Siljak-Yakovlev, S., Pustahija, F., Oli, M., E., Boguni, F., Muratovi, E., Ba, N., Catrice, O., Brown, S. C. 2010. Towards a Genome Size and Chromosome Number Database of Balkan Flora: C-Values in 343 Taxa with Novel Values for 242. *Advanced Science Letters*. **3**(2): 190-213.
- Silvestro, D., Michalak, I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*. **12**(4): 335-337.
- Small, R. L., Cronn, R. C., Wendel, J. F. 2004. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Australian systematic botany*. **17**: 145-170.
- Sommer, R. S., Nadachowski, A. 2006. Glacial refugia of mammals in Europe: evidence from fossil records. *Mammal Review*. **36**: 251-265.
- Speta, F. 1979. Karyological investigations in *Scilla* in regard to their importance for taxonomy. *Webbia*. **34**: 419–431.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. **22**(21): 2688-2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. 2008. A rapid Bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology*. **57**(5): 758-771.
- Stewart, J. R., Lister, A. M. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution*. **16**(11): 608-613.
- Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I., Dalén, L. 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B*. **277**(1682): 661-671.
- Svenning, J. C., Normand, S., Kageyama, M. 2008. Glacial refugia of temperate trees in Europa: insights from species distribution modelling. *Journal of Ecology*. **96**: 1117-1127.

- Syring, J., Willyard, A., Cronn, R., Liston, A. 2005. Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci. . *American Journal of Botany*. **92**: 2086-2100.
- Taberlet, P., Cheddadi, R. 2002. Ecology. Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science*. **297**: 2009-2010.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-G., Cosson, J.-F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*. **7**(4): 453-464.
- Tribsch, A., Schönswetter, P. 2003. Patterns of endemism and comparative phylogeography confirm palaeo-environmental evidence for Pleistocene refugia in the Eastern Alps. *Taxon*. **52**: 477–497.
- Ujvárosi, L., Markó, B. E. 2011. The Carpathians as speciation centres and barriers: from case studies to general patterns. Cluj University Press, Cluj-Napoca.
- Valtueña, F. J., Preston, C. D., Kadereit, J. W. 2012. Phylogeography of a Tertiary relict plant, *Meconopsis cambrica* (Papaveraceae), implies the existence of northern refugia for a temperate herb. *Molecular Ecology*. **21**(6): 1423-1437.
- Varga, Z. 2010. Extra-Mediterranean refugia, post-glacial vegetation history and area dynamics in Eastern Central Europe. Springer, Heidelberg.
- Zuccon, A., Zuccon, D. 2006. MrEnt v2.2. Program distributed by the authors. Department of Vertebrate Zoology & Molecular Systematics Laboratory, Swedish Museum of Natural History, Stockholm.

8. CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

CUPRINS.....	3
1. ABREVIERI	7
2. INTRODUCERE	9
3. CONSIDERAȚII TEORETICE.....	11
3.1. Prezentarea generală a speciilor.....	11
3.1.1. <i>Erythronium dens-canis</i> L. – taxonomie, morfologie, corologie, caracterizare ecologică și cenologică.....	11
3.1.2. <i>Scilla bifolia</i> L. – taxonomie, morfologie, corologie, caracterizare ecologică și cenologică.....	15
3.2. Studiile de filogenie și filogeografie.....	19
3.2.1. Considerații teoretice/Generalități	19
3.2.2. Tehnici și markeri moleculari folosiți în analizele de filogenie și filogeografie ale plantelor.....	23
3.3. Genetica conservării – o ramură de știință aplicată	28
3.4. Studii anterioare referitoare la speciile studiate.....	31
3.4.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	31
3.4.2. <i>Scilla bifolia</i>	36
4. OBIECTIVE	37
5. MATERIAL ȘI METODE.....	39
5.1. Prelevarea și conservarea probelor	39
5.2. Baza de date	59
5.3. Izolarea ADN	59
5.4. Selecția markerilor moleculari folosiți.....	60
5.4.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	60
5.4.2. <i>Scilla bifolia</i>	60
5.5. Amplificarea prin PCR	62
5.6. Secvențializarea ampliconilor.....	64
5.7. Analize filogenetice și filogeografice	64
5.7.1. Alinierea secvențelor de ADN	64
5.7.2. Generarea rețelei de haplotipuri.....	65
5.7.3. Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale.....	65
5.7.4. Calculul indicilor de diversitate ai cladelor în cazul speciei <i>Erythronium dens-canis</i> ...	66

6. REZULTATE	67
6.1. Rezultatele prelevării probelor.....	67
6.2. Rezultatele izolării ADN, ale amplificării secvențelor țintă, secvențializării și alinierii fragmentelor.....	69
6.2.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	69
6.2.1.1. ADN plastidial	69
6.2.1.2. ADN nuclear	71
6.2.2. <i>Scilla bifolia</i>	71
6.3. Numărul, structura, distribuția și rețeaua de haplotipuri la <i>Erythronium dens-canis</i>	72
6.4. Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale.....	75
6.4.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	75
6.4.2. <i>Scilla bifolia</i>	81
6.5. Indici de diversitate genetică ai cladelor de <i>Erythronium dens-canis</i>	84
7. DISCUȚII	85
7.1. <i>Erythronium dens-canis</i>	85
7.2. <i>Scilla bifolia</i>	89
8. CONCLUZII.....	95
9. BIBLIOGRAFIE.....	99
10. ANEXE.....	117
10.1. Anexa nr. 1. Informațiile privind materialul vegetal colectat pentru studiul speciei <i>Erythronium dens-canis</i> în studiul lui Bartha și colab. (2015a)	118
10.2. Anexa nr. 2. Pozițiile variabile ale alinierii secvențelor regiunii <i>rpl32-trnL</i> la exemplarele de <i>Erythronium dens-canis</i>	120
10.3. Anexa nr. 3. Pozițiile variabile ale alinierii secvențelor regiunii <i>rps15-ycf1</i> la exemplarele de <i>Erythronium dens-canis</i>	131
10.4. Anexa nr. 4. Pozițiile variabile ale alinierii secvențelor regiunii <i>rpl32-trnL</i> la exemplarele de <i>Scilla bifolia</i>	137
11. MULȚUMIRI	145
12. CUVINTE CHEIE	147
13. REZUMAT	149