

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA**  
**Facultatea de Biologie și Geologie**

**Dana Cristina Șuteu**

**STUDII DE TAXONOMIE MOLECULARĂ LA UNELE  
SPECII DE PLANTE ENDEMICE SAU RARE DIN  
ROMÂNIA**

**- Rezumatul tezei de doctorat -**

**Coordonator științific**  
**Prof. Dr. Octavian Popescu**

**Cluj-Napoca**

**2012**

# **CUPRINS REZUMAT**

|   |         |
|---|---------|
| OBIECTIVELE PREZENTULUI STUDIU  | Pag. 1  |
| INTRODUCERE   | Pag. 2  |
| <b>CONSIDERAȚII TEORETICE</b>   | Pag. 2  |
| 1. Filogenia și analizele filogenetice (selectiv)   | Pag. 2  |
| 2. Markeri moleculari utilizați în filogenia și taxonomia plantelor (selectiv)  | Pag. 3  |
| 3. Caracterizarea din punct de vedere taxonomic, morfologic, ecologic și al variabilității fenotipice a plantelor studiate (selectiv) | Pag. 3  |
| <b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>  | Pag. 8  |
| 4. Materiale și metode (selectiv)   | Pag. 8  |
| 5. Rezultate și discuții (selectiv)   | Pag. 9  |
| 5.1. Rezultate la genul <i>Pulmonaria</i>   | Pag. 9  |
| 5.2. Discuții la genul <i>Pulmonaria</i>  | Pag. 10 |
| 5.3. Concluzii la genul <i>Pulmonaria</i>   | Pag. 11 |
| 5.4. Rezultate la genul <i>Onosma</i>   | Pag. 11 |
| 5.5. Discuții la genul <i>Onosma</i>  | Pag. 15 |
| 5.6. Concluzii la genul <i>Onosma</i>   | Pag. 17 |
| 5.7. Rezultate la genul <i>Eritrichium</i>  | Pag. 17 |
| 5.8. Discuții la genul <i>Eritrichium</i>   | Pag. 21 |
| 5.9. Concluzii la genul <i>Eritrichium</i>  | Pag. 22 |
| 5.10. Rezultate la specia <i>Primula leucophylla</i>  | Pag. 22 |
| 5.11. Discuții la specia <i>Primula leucophylla</i>   | Pag. 26 |
| 5.12. Concluzii la specia <i>Primula leucophylla</i>  | Pag. 27 |
| 5.13. Rezultate la specia <i>Primula intricata</i>  | Pag. 27 |
| 5.14. Discuții la specia <i>Primula intricata</i>   | Pag. 30 |
| 5.15. Concluzii la specia <i>Primula intricata</i>  | Pag. 32 |
| Bibliografie selectivă  | Pag. 33 |
| CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT   | Pag. 35 |
| CUVINTE CHEIE   | Pag. 36 |

## **Obiectivele prezentului studiu**

Obiectul studiului îl reprezintă speciile/subspeciile endemice pentru România sau endemitele daco-balcanice și unele specii rare. În cadrul fiecărei specii de plante au fost stabilite unul sau mai multe obiective:

### ***Pulmonaria filarszkyana***

Obiectivul 1: Identificarea unor markeri moleculari “barcode” capabili să diferențieze speciile *Pulmonaria rubra* și *Pulmonaria filarszkyana*;

Obiectivul 2: Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Pulmonaria rubra* și *Pulmonaria filarszkyana*;

### ***Onosma pseudoarenaria***

Obiectivul 1: Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Onosma arenaria* și *Onosma pseudoarenaria*;

Obiectivul 2: Estimarea diversității genetice a populațiilor de *Onosma arenaria* și *Onosma pseudoarenaria* din România;

### ***Eritrichium jankae***

Obiectivul 1: Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Eritrichium nanum* și *Eritrichium jankae*;

### ***Primula leucophylla***

Obiectivul 1: Identificarea unor markeri moleculari “barcode” capabili să diferențieze speciile *Primula elatior* și *Primula leucophylla*;

Obiectivul 2: Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Primula elatior* și *Primula leucophylla*;

Obiectivul 3: Redefinirea arealului speciei *Primula leucophylla* pe baza analizelor moleculare;

### ***Primula intricata***

Obiectivul 1: Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Primula elatior* și *Primula intricata*.

## **Introducere**

Prezentul studiu se înscrie pe direcția de revizuire taxonomică prin metode moleculare a unor specii de plante al căror statut taxonomic este discutabil. Speciile/subspeciile endemice sau rare selectate pentru studiu sunt caracterizate de un statut taxonomic incert, ele fiind considerate, doar pe baza caracterelor morfologice și în absența unor studii genetice, de către diferiți autori ca având un statut taxonomic fie de specie distinctă, fie subspecie sau chiar varietate a unei alte specii. Întrucât diferențele dintre caracterele morfologice care fac distincția dintre specii/subspecii sunt minore și pot fi urmarea unor polimorfisme individuale determinate de factorii de mediu și nu a unor diferențe interspecifice, s-a considerat oportună realizarea unor studii de genetică moleculară care să contribuie la elucidarea statutului lor taxonomic. Taxonii problematici selectați pentru studiu sunt următorii: *Pulmonaria filarszkyana*, *Onosma pseudoarenaria*, *Eritrichium jankae* (familia Boraginaceae), *Primula leucophylla* și *Primula intricata* (familia Primulaceae), iar statutul lor taxonomic va fi discutat prin prisma relației lor cu speciile ale căror subspecii sau varietăți sunt considerați a fi: *Pulmonaria rubra*, *Onosma arenaria*, *Eritrichium nanum* și *Primula elatior*.

## **Considerații teoretice**

### **1. Filogenia și analizele filogenetice (selectiv)**

Principiul pe care se bazează filogenetica este acela că membrii unui grup sau clade împărtășesc o istorie evolutivă comună și sunt mai înrudiți între ei decât cu membrii altui grup. Filogenia moleculară presupune utilizarea macromoleculilor biologice (proteine, acizi nucleici) pentru a obține informații asupra istoriei evolutive a taxonilor și asupra legăturilor lor de înrudire.

Metodele filogenetice de construire a arborilor implică parcurgerea mai multor etape, ulterior obținerii setului de date: alinierea secvențelor, determinarea modelului de substituție, construirea arborelui și evaluarea arborelui. Există două grupe majore de metode de construire a arborilor filogenetici, și anume: metode bazate pe distanță și metode bazate pe analiza de caractere. Cele mai cunoscute metode filogenetice sunt UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means”), NJ (“Neighbor Joining”) și ME („Minimum Evolution”), iar

cele mai cunoscute metode bazate pe analiza de caractere sunt: MP („Maximum Parsimony”), ML („Maximum Likelihood”) și “Bayesian inference”.

## 2. Markeri moleculari utilizați în filogenia și taxonomia plantelor (selectiv)

Tipurile variate de markeri moleculari diferă în ceea ce privește principiul, metodologia și aplicațiile, ceea ce crează problema selectării markerului cel mai potrivit pentru rezolvarea temei de cercetare propuse. Deși în filogenetica plantelor, cel mai ridicat grad de încredere în arborii generați este dat de congruența dintre informațiile procurate de la cele trei genomuri: plastidial, nuclear și mitocondrial (Savolainen și Chase, 2003), totuși, multe studii se bazează pe utilizarea informațiilor provenite de la un singur genom, o explicație posibilă fiind lipsa unor markeri genetici potriviți. Deoarece filogeniile intraspecifice clar rezolvate pe baza a mai multor sisteme de date independente sunt dificil de obținut și costisitoare, se ajunge la utilizarea a câtorva sisteme de markeri mai mult sau mai puțin optime, aceasta reprezentând un compromis între nivelul de variabilitate suficient de ridicat al markerilor și utilitatea lor pentru a rezolva genealogii clare (Eidesen și colab., 2007).

Cei mai utilizați markeri moleculari în taxonomia și filogenia plantelor se clasifică în următoarele două categorii: proteine și acizi nucleici. Din prima categorie fac parte izoenzimele iar din cea de a doua fac parte microsateleții, SNP-urile, genele specifice, regiunile necodificatoare și alte regiuni. Printre principalele metode de detecție a markerilor moleculari ADN se numără secvențierea, genotiparea, tehnica RFLP, tehnica AFLP și tehnica RAPD.

## 3. Caracterizarea din punct de vedere taxonomic, morfologic, ecologic și al variabilității fenotipice a plantelor studiate (selectiv)

*Pulmonaria rubra* (denumire populară miera ursului, plămânariță) este un endemit carpatico-balcanic caracteristic făgetelor montane din Carpați. Este o specie frecventă din etajul montan mijlociu până în cel subalpin, prin păduri și buruienișuri, în făgete, brădeto-

făgete și brădet. În etajul alpin inferior se găsește sporadic prin buruienșurile de sub jnepenișuri și tufărișuri de *Alnus viridis*, până la circa 2000 m altitudine (Täuber, 1982).

În ceea ce privește variabilitatea speciei, cei mai mulți autori consideră că specia *P. rubra* are două subspecii: *P. rubra* subsp. *eurubra* (*P. rubra* subsp. *rubra*) (fig. 1) și *P. rubra* subsp. *filarszkyana* (Sârbu și colab., 2001; Gușuleac, 1960; Beldie, 1979). Totuși, Borza consideră *P. filarszkyana* ca fiind doar o varietate a *Pulmonariei rubra* (Borza, 1947), în timp ce Ciocârlan (2000) consideră specia *P. filarszkyana* ca fiind o specie distinctă, fără legături taxonomice cu *P. rubra*.



**Fig. 1.** *Pulmonaria rubra* subsp. *rubra* (foto: Dana Șuteu).

*P. filarszkyana* (*P. rubra* subsp. *filarszkyana*) este o specie endemică, aparținând Carpaților de Est (Beldie, 1979) care se diferențiază de *P. rubra* prin indumentul mult mai scurt (1 mm) și mai moale (Gușuleac, 1960). În general se consideră a fi răspândită în pădurile întunecoase de molid și între jnepeni, în munții Maramureșului, Rodnei și Suhardului.

*Onosma arenaria* (denumire populară otrățel) este o plantă robustă, hispidă, bogat foliată, cu aspect verde cenușiu. În timp ce la nivel de continent este răspândită peste tot, cu excepția regiunilor nordice, în România are o distribuție controversată, unii autori considerând că se întâlnește în locuri nisipoase, coline aride, stepe, dune fixate fie din regiunile Baia Mare, Cluj, Hunedoara, Timișoara, București, Constanța, Iași (Grințescu și Nyárády, 1960) fie doar în Delta Dunării (Teppner, 1996).

În ceea ce privește variabilitatea speciei, Ciocârlan (2000) consideră că prezintă două subspecii: *O. arenaria* subsp. *arenaria* și *O. arenaria* subsp. *pseudoarenaria*, cea din urmă considerată un endemit pentru Transilvania.

*Onosma pseudoarenaria* (*O. arenaria* subsp. *pseudoarenaria*) este o specie heliofilă care habitează în zona colinară (fig. 2), pe soluri uscate, nisipoase și se caracterizează prin populații compuse din indivizi puțini, deoarece se înmulțește greu din cauza fructelor sclerificate, ceea ce îi conferă statutul de specie vulnerabilă (Dihoru și Negrean, 2009). Diferă de *O. arenaria* prin următoarele caracteristici: numărul de cromozomi ( $2n=26$  și nu  $2n=20$  ca și în cazul *O. arenaria*), setule de 4-5 ori (nu de 8-10 ca și în cazul *O. arenaria*) mai scurte decât setele iar spațiul dintre pernițe este glabru (nu acoperit de perișori rari și scurți ca și la *O. arenaria*).

Este răspândită în regiunile Cluj, Brașov, Hunedoara (Grințescu și Nyárády, 1960).

În timp ce unii autori (Ciocârlan, 2000, 2009) o consideră specie subordonată speciei *O. arenaria*, alți autori (Rauschert, 1976) îi subordonează 8 subspecii din Europa Centrală și din Peninsula Balcanică, printre care și *Onosma pseudoarenaria* subsp. *pseudoarenaria* considerată un endemit transilvănean, iar Flora Europaea consideră această specie ca reprezentând un endemit pentru România și neavând subspecii subordonate, subspeciile alocate de Rauschert fiind considerate specii independente (Ball și Riedhl, 1972).



**Fig. 2.** *Onosma pseudoarenaria* în habitatul natural de la Suatu, jud. Cluj (foto: Liviu Filipaș).

*Eritrichium nanum* (denumire populară ochiul șarpelui) este o plantă rară, cu populații sărace, care se întâlnește pe stâncăriile și bolovănișurile calcaroase expuse la soare din etajul alpin și subalpin (fig. 3). Se întâlnește în Alpi Centrali și de Sud și în Carpații de S-E (Chater, 1972).

Variabilitatea acestei specii este destul de discutată, unii autori considerând subspeciile genului drept specii separate sau varietăți. Flora Europaea (Chater, 1972) și

Ciocârlan (2009) iau în considerare doar două subspecii: *E. nanum* subsp. *nanum* și *E. nanum* subsp. *jankae*.



**Fig. 3.** *Eritrichium nanum* subsp. *nanum* în habitatul natural din Piatra Iorgovanului (stânga; foto: Dana Șuteu) și în Munții Ciucaș (dreapta; foto: Liviu Filipaș).

*Eritrichium jankae* (*Eritrichium nanum* subsp. *jankae*) este considerată o specie endemică pentru România (Beldie, 1967; Grințescu, 1960; Borza, 1947; Ciocârlan, 2000; Chater, 1972). Diferă morfologic de *E. nanum* subsp. *nanum* prin inflorescența și frunzele îndesuit alb argintiu lanate, prin tulpini de 5-7,5 cm (nu de 1-5 cm ca și la subsp. *nanum*), prin frunzele late de 3-4,5 mm (nu de 1,5-3 mm ca și la subsp. *nanum*), precum și prin caliciul puțin mai lung, dar are același număr de cromozomi.

Se găsește în Munții Rodnei, Ciucaș, Bârsei, Bucegi, Iezer, Făgăraș, Căpățanii și Godeanu (Ciocârlan, 2009).

*Primula elatior* (denumire populară ciuboțica cucului) este o specie ierbacee, perenă, diploidă  $2n=22$  (Jacquemyn și colab., 2004). Se întâlnește în păduri mixte de foioase aflate în zone temperate din Europa de Vest și Centrală, în nord găsimu-se până în Danemarca și sudul Suediei și în est până în Asia Centrală (Woodell, 1969). În România este o specie comună (Nyárády și Gușuleac, 1960).

Variabilitatea *Primulei elatior* a fost subiectul unor lungi dezbateri în lumea științifică și încă nu s-a ajuns la un consens în ceea ce privește formele și varietățile acestei specii. Cei mai mulți autori îi atribuie acestei specii, printre multe forme, varietăți și subspecii, și subspeciile *leucophylla* și *intricata* (Ciocârlan, 2000; Valentine și Kress, 1972; Wright Smith și Fletcher, 1947).

*Primula leucophylla* (*Primula elatior* subsp. *leucophylla*) prezintă o morfologie (fig. 4) asemănătoare cu *P. elatior*, de care se deosebește cu greu. Caracterele care o diferențiază

de aceasta sunt următoarele: frunze gri tomentoase pe dos și caliciul de 6-8 mm lungime (Valentine și Kress, 1972; Ciocârlan, 2000).

Este considerată un endemit al Carpaților Orientali, fiind răspândită în Munții Maramureșului, Rodnei, Giurgeu, Suhard, Postăvaru, Ceahlău, Rarău, Obcinele Bucovinene (Nyárády și Gușuleac, 1960), după unii autori întâlnindu-se și în masivul Piatra Craiului, Munții Călimani, Ciucaș, Nemira și Vrancei.



**Fig. 4.** *Primula leucophylla* în Munții Ceahlău (foto: Liviu Filipaș).

*Primula intricata* (*P. elatior* subsp. *intricata*) se întâlnește în pajiștile umede din regiunea subalpină și alpină, în Munții Pirinei, Alpi și peninsula Balcanică (Nyárády și Gușuleac, 1960). În România, este o specie rară care habitează în Munții Bucegi și Munții Bârsei (Beldie, 1979; Nyárády și Gușuleac, 1960).

Diferă de *P. elatior* prin bracteele mai lungi, lobi corolei mai profund emarginați iar capsula este de lungimea caliciului (10-12 mm, spre deosebire de *P. elatior* unde capsula întrece cu mult caliciul) (Nyárády și Gușuleac, 1960).

Statutul ei taxonomic este încă dezbătut, unii autori o consideră o specie distinctă (Grenier și Godron, 1853; Nyárády și Gușuleac, 1960; Șuteu și colab., 2011), alții o consideră o varietate a *P. elatior* (Pax și Knuth, 1889), iar alții o consideră drept o subspecie a *P. elatior* (Lüdi, 1927; Ciocârlan, 2000; Valentine și Kress, 1972; Beldie, 1979; Wright Smith și Fletcher, 1947).

## **Contribuții personale**

### **4. Materiale și metode (selectiv)**

#### **Strategia de recoltare a materialului biologic**

Materialul biologic folosit la analize a fost recoltat din mai până în septembrie, între anii 2006-2010 din mai multe locații. S-a încercat recoltarea unui număr de minim 5 indivizi din fiecare populație, care au fost introduși imediat în tuburi pline cu silicagel. În paralel, au fost recoltate și vouchere care au fost folosite la determinarea fără dubii a speciei colectate. Ulterior, aceste vouchere au fost puse la presat în ierbar. Adicional, în cadrul analizei speciilor *P. elatior* - *P. leucophylla* - *P. intricata* s-a folosit și material de ierbar provenit din colecția Herbarului Cluj-Napoca aflat în incinta Grădinii Botanice "Alexandru Borza".

#### **Extracția ADN-ului**

S-a realizat prin mai multe metode, și anume: un protocol adaptat după Doyle și Doyle (1987, 1990), un protocol adaptat după Mengoni (Mengoni și colab., 2000) și prin utilizarea unui kit comercial: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

#### **Analiza microsateliților cloroplastici**

S-a bazat pe utilizarea a șase amorse dintre cele descrise de Weising și Gardner (1999): ccmp 2, ccmp 3, ccmp 4, ccmp 6, ccmp 7 și ccmp 10. Această analiză a fost utilizată doar pentru testarea polimorfismului în cazul unor populații aparținând genurilor *Onosma* și *Pulmonaria*. Interpretarea rezultatelor s-a realizat prin analiza prezenței sau absenței benzilor corespunzătoare amplificării cu fiecare amorsă în parte din gelul de poliacrilamidă.

#### **Analiza PCR-RFLP**

Analiza PCR-RFLP s-a realizat pe trei regiuni din genomul cloroplastic: trnD-T, trnC-D și psbA-trnS (după Demesure și colab., 1995). Această analiză a fost utilizată doar pentru testarea polimorfismului în cazul unor populații aparținând genurilor *Onosma* și *Pulmonaria*. Interpretarea rezultatelor s-a realizat prin analiza prezenței sau absenței benzilor corespunzătoare amplificării cu fiecare amorsă în parte din gelul de poliacrilamidă.

#### **Analiza AFLP**

Analiza AFLP s-a realizat la toți indivizii din unele populații din genurile *Primula*, *Eritrichium* și *Onosma*. Pentru diferitele genuri de plante luate în lucru s-au folosit combinații diferite de amorse sugerate în literatura de specialitate. Scoringul fragmentelor a fost realizat cu programul GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) pentru a produce o matrice bazată pe prezență/absență. Cu ajutorul scriptului în platforma R, AFLPdat, (Ehrich, 2006) s-au estimat

proporția locilor polimorfi, diversitatea genetică a lui Nei (Nei, 1987) și indexul de raritate. Pe baza distanței Nei și Li (Nei și Li, 1979) a fost generat un arbore Neighbor Joining cu ajutorul programului Splistree v. 4.10 (Huson și Bryant, 2006). Analiza varianței moleculare (AMOVA) a fost obținută prin utilizarea programului ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier și Lischer, 2010). Tot în cadrul programului Arlequin a fost calculat și  $F_{ST}$  (“fixation index”). Analiza “Principal Coordinate” (PCO) s-a efectuat cu programul PAST (Hammer și colab., 2001) utilizând doi indici: indicele Simpson și indicele euclidean.

### **Secvențierea**

S-a realizat secvențierea Sanger la toate cele patru genuri de plante în studiu: *Pulmonaria*, *Onosma*, *Eritrichium* și *Primula*. S-a efectuat secvențierea atât a regiunii ITS1 aparținând genomului nuclear cât și a unor regiuni aparținând genomului cloroplastic: intronii *trnL*, *trnG*, *rpl16*, *rps16*, spacerii intergenici *rpl32-ndhF*, *rps16-trnK*, *trnL-trnF*, *trnD-trnE*, *trnS-trnfM*, *psbD-trnT*, *trnH-psbA*, *trnS-trnG*, *trnT-trnL*. Secvențele obținute au fost asamblate și editate manual utilizând programul BioEdit v.7.0.9.0 (Hall, 1999). Ulterior, analiza secvențelor a fost realizată cu programul Mega 4.1 (Tamura și colab., 2007). Construcția arborilor s-a realizat prin metodele NJ, ML, ME, UPGMA folosind modelul Kimura 2P (1980).

## **5. Rezultate și discuții (selectiv)**

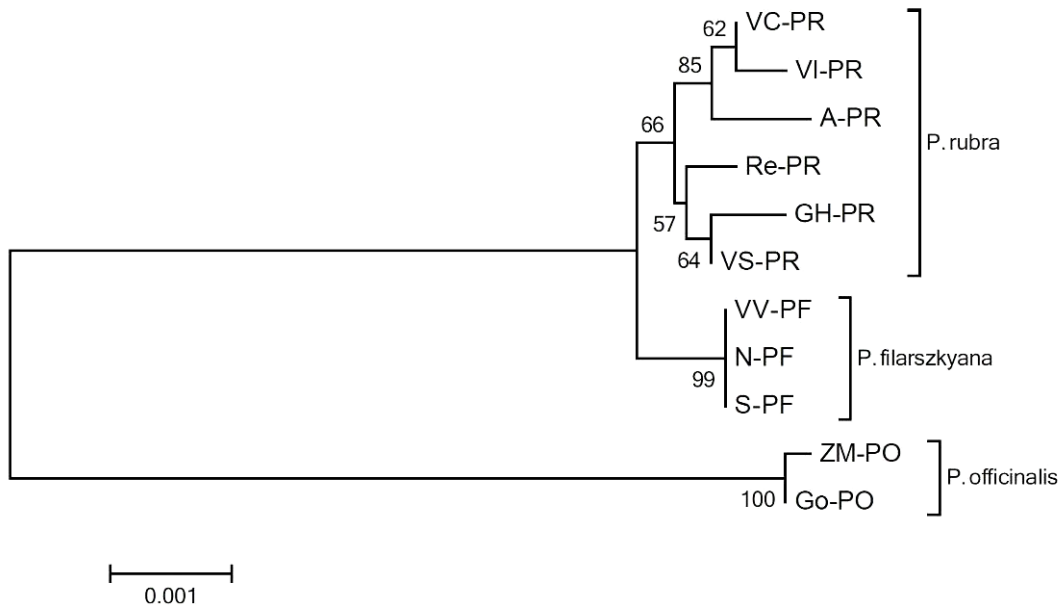
### **5.1. Rezultate la genul *Pulmonaria***

Analiza microsateliților cloroplastici nu relevă polimorfism între populațiile de *Pulmonaria rubra* și *Pulmonaria filarszkyana* pentru niciuna dintre amorsele utilizate.

Analiza PCR-RFLP nu relevă niciun polimorfism între populațiile de *Pulmonaria rubra* și *Pulmonaria filarszkyana* pe baza amorsele DT și AS, dar evidențiază un polimorfism la nivelul benzilor 2 și 5 datorat inserției/deleției unui fragment pentru amorsa CD.

#### Analiza secvențierii

Din cele 13 regiuni selectate s-a reușit amplificarea și secvențierea doar a 8 regiuni: ITS1, *rpL16*, *trnG*, *trnL*, *rpl32-ndhF*, *psbD-trnT*, *trnD-E* și *trnH-psbA*. Secvența concatenată a acestor markeri, cu lungimea de aproximativ 5000 nucleotide a fost utilizată pentru construcția de arbori prin metodele ME (fig. 5), ML, NJ, UPGMA.



**Fig. 5.** Dendrogramă la genul *Pulmonaria*, construită prin metoda ME, pe baza secvențelor ITS1, *rpL16*, *trnG*, *trnL*, *rpl32-ndhF*, *psbD-trnT*, *trnD-E* și *trnH-psbA*.

## **5.2. Discuții la genul *Pulmonaria***

### **Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Pulmonaria rubra* și *Pulmonaria filarszkyana***

Arborii construiți prin metodele ME (fig. 5), ML, NJ și UPGMA sunt congruenți și prezintă două grupări: prima alcătuită de populațiile de *P. officinalis* și cea de-a doua alcătuită din populațiile de *P. rubra* și *P. filarszkyana*. Grupul compus din populațiile de *P. officinalis* se separă cu o valoare maximă de bootstrap, statutul taxonomic al acestei specii fiind clar delimitat și prin caractere morfologice. În cadrul celui de al doilea grup, subgruparea alcătuită de *P. filarszkyana* este unitară, cele trei populații având toate același haplotip indiferent de markerii utilizați. Acest fapt este de înțeles dacă se are în vedere proximitatea dintre punctele de colectare, toate aparținând județului Maramureș. Arealul acestui taxon fiind limitat la câteva locații din Carpații de Est, permite existența unui flux genic neîntrerupt între locații. Taxonul *P. rubra* se separă în două subgrupări. Prima subgrupare (alcătuită din populațiile din Valea Cepelor, Arieșeni și Valea Ierii) se datorează unei proximități în poziția punctelor de colectare, dar, în ciuda acestei proximități, toate cele trei populațiile au haplotipuri ușor diferite. A doua subgrupare (alcătuită din populațiile din Retezat, Giurgeu-Hășmaș și Pârâul Văii Seci) adună populații din zone/județe îndepărtate ale țării, ceea ce poate fi explicat prin faptul că traseul fluxului genic dintre populațiile de *P. rubra* se face de-a lungul arcului carpatic. *P. rubra* este o specie marcantă a asociației *Fagetum dacicum*, asociație caracterizată prin făgete pure sau aproape pure. La nivelul arcului carpatic această asociație continuă aproape neîntrerupt, ceea ce înlesnește fluxul genic. Pe de altă parte, populațiile din Carpații

Occidentali sunt separate de cele din Carpații Orientali și Meridionali prin văi precum valea Mureșului și valea Someșului care pot reprezenta bariere geografice pentru fluxul genetic. În plus, nici pădurile de fag nu continuă neîntrerupt între grupa Carpaților Occidentali și restul grupelor carpatice.

Deși grupul compus din populațiile de *P. filarszkyana* este bine delimitat în cadrul grupării comune cu *P. rubra*, totuși plasarea acestui taxon în această grupare susține mai mult punctul de vedere conform căruia *P. filarszkyana* este o subspecie a *Pulmonariei rubra* și nu o specie distinctă cum este cazul speciei *P. officinalis*.

### **5.3. Concluzii la genul *Pulmonaria***

La genul *Pulmonaria*, utilizarea microsateliților cloroplastici nu este suficientă, rezoluția lor nefiind suficient de fină.

Analiza markerilor PCR-RFLP a evidențiat polimorfism între taxonii *P. rubra* și *P. filarszkyana* atunci când se utilizează regiunea trnC-trnD.

Studiile bazate pe analiza secvențelor indică faptul că taxonului *P. filarszkyana* ar trebui să-i revină statutul de subspecie a speciei *Pulmonaria rubra*.

### **5.4. Rezultate la genul *Onosma***

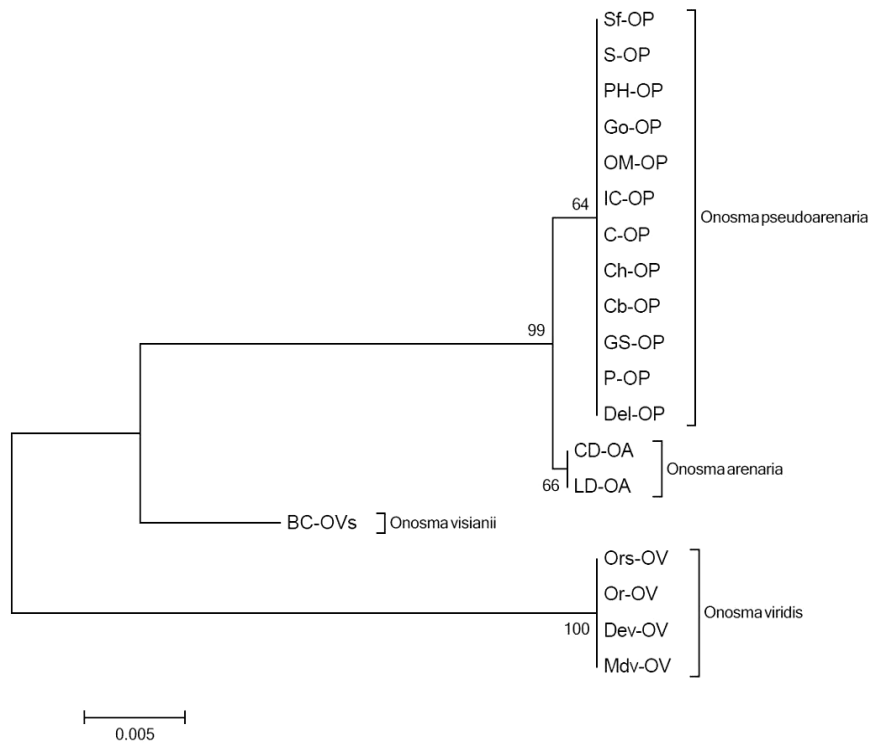
Analiza microsateliților cloroplastici nu relevă polimorfism între populațiile de *Onosma* sp. studiate pentru niciuna dintre amorsele utilizate.

Analiza PCR-RFLP nu relevă niciun polimorfism între populațiile de *Onosma* sp. pe baza amorsei DT, dar evidențiază un polimorfism pentru amorsele CD și AS. Polimorfismul evidențiat de amorsa CD este greu de decelat din cauza diferențelor mici dintre benzi, iar stabilirea haplotipurilor se realizează pe baza amorsei AS. Polimorfismul generat de perechea de amorse AS este vizibil la banda numărul 5 și reprezintă inserția/deleția unui fragment de nucleotide.

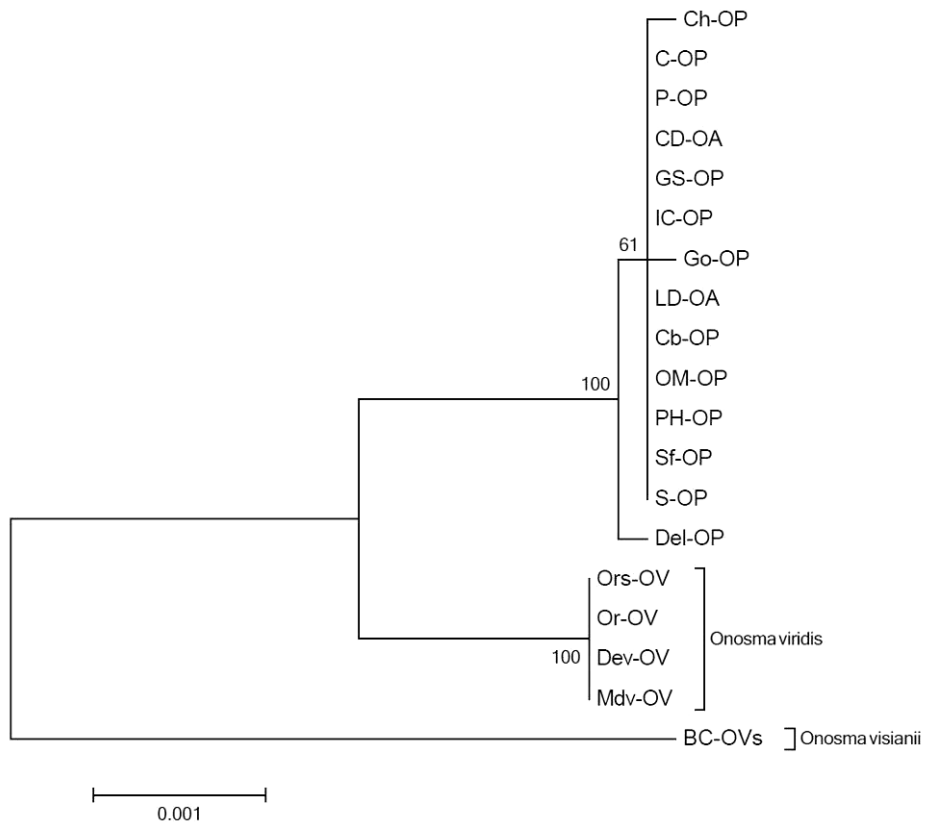
#### Analiza secvențierii

Pe baza secvenței ITS1 de aproximativ 350 pb au fost construiți arbori prin metodele ME (fig. 6), ML, NJ, UPGMA.

Din cele 13 regiuni selectate s-a reușit amplificarea și secvențierea doar a nouă regiuni: *rpL16*, *trnG*, *trnL*, *rpl32-ndhF*, *psbD-trnT*, *trnD-E*, *trnT-L*, *rps16-trnK* și *trnH-psbA*, cu lungimea concatenată de aproximativ 6000 nucleotide, care au fost utilizate pentru construcția de arbori filogenetici. Arborii au fost construiți prin metodele ME (fig. 7), ML, NJ, UPGMA.



**Fig. 6.** Dendrogramă la genul *Onosma*, construită prin metoda ME pe baza secvenței ITS1.



**Fig. 7.** Dendrogramă la genul *Onosma*, construită prin metoda ME, pe baza secvențelor *rpL16*, *trnG*, *trnL*, *rpl32-ndhF*, *psbD-trnT*, *trnD-E*, *trnT-L*, *rps16-trnK* și *trnH-psbA*.

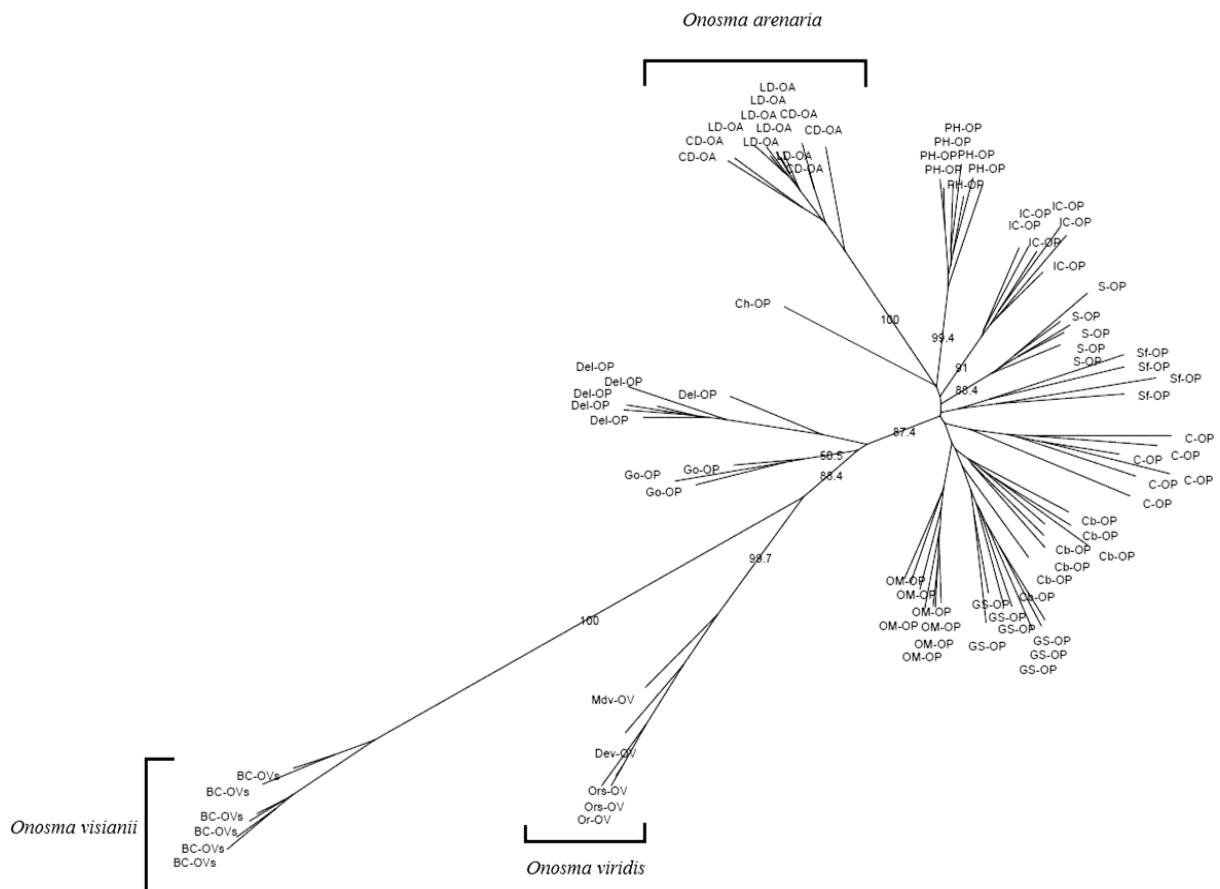
Analiza AFLP

Cu ajutorul scriptului în platforma R, AFLPdat, s-au determinat proporția locilor polimorfi, diversitatea genetică a lui Nei și indicele de raritate (tabelul 1).

**Tabelul 1.** Proporția locilor polimorfi, diversitatea genetică și indicele de raritate pentru populațiile genului *Onosma*.

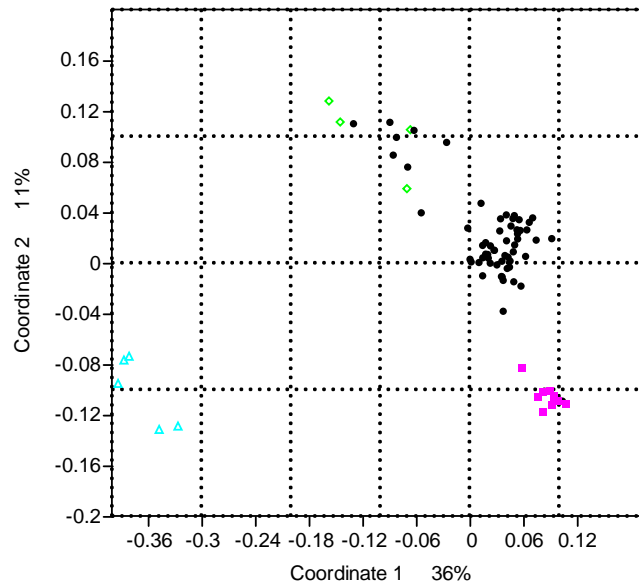
| Specia                       | Cod populație | Proporția markerilor variabili | Diversitatea genetică | Indicele de raritate (DW) |
|------------------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <i>Onosma viridis</i>        | Ors-OV        | 0,0660                         | 0,0440                | 21,1819                   |
| <i>Onosma visianii</i>       | BC-OVs        | 0,1718                         | 0,0845                | 192,8069                  |
| <i>Onosma arenaria</i>       | CD-OA         | 0,1762                         | 0,0819                | 28,2933                   |
|                              | LD-OA         | 0,0748                         | 0,0352                | 59,9596                   |
| <i>Onosma pseudoarenaria</i> | Cb-OP         | 0,2334                         | 0,1002                | 17,7642                   |
|                              | C-OP          | 0,2951                         | 0,1353                | 29,4634                   |
|                              | Del-OP        | 0,2070                         | 0,0845                | 19,3396                   |
|                              | GS-OP         | 0,2290                         | 0,1027                | 30,9598                   |
|                              | Go-OP         | 0,1277                         | 0,0851                | 5,3400                    |
|                              | IC-OP         | 0,1938                         | 0,0886                | 31,9461                   |
|                              | OM-OP         | 0,1806                         | 0,0809                | 21,0883                   |
|                              | PH-OP         | 0,1806                         | 0,0771                | 44,7643                   |
|                              | Sf-OP         | 0,2731                         | 0,1490                | 12,1602                   |
|                              | S-OP          | 0,1497                         | 0,0722                | 16,4296                   |

Pe baza matricei AFLP a fost generat un arbore Neighbor Joining (fig. 8).



**Fig. 8.** Dendrogramă la genul *Onosma*, construită prin metoda NJ, pe baza matricei AFLP.

Rezultatele analizei “Principal Coordinate” (PCO) pe baza matricei AFLP folosind indicele euclidean sunt prezentate în figura 9.



**Fig. 9.** Rezultate PCO utilizând indicele euclidean la genul *Onosma* pe baza matricei AFLP (negru – *O. pseudoarenaria*, verde – *O. viridis*, mov – *O. arenaria*, albastru – *O. visianii*).

Analizele varianței moleculare (AMOVA) s-au realizat cu partajarea varianței genetice totale pe diferite nivele (în cadrul populațiilor, între populații și între grupe de populații). Așadar, s-au realizat mai multe moduri de definire ale grupelor și pentru fiecare din acestea s-a calculat varianța moleculară pe diferite nivele. Rezultatele obținute în cazul când nu se definește niciun grup sunt trecute în tabelul 2.

**Tabelul 2.** Rezultatele AMOVA fără definirea grupurilor la genul *Onosma*.

| Sursa variației        | Procentul de variație | $F_{ST}$ |
|------------------------|-----------------------|----------|
| Între populații        | 63,68083              | 0,63681  |
| În cadrul populațiilor | 36,31917              |          |

În cazul în care s-au definit trei grupuri, primul corespunzând speciei *O. visianii*, al doilea corespunzând speciei *O. viridis* (toate cele patru populațiile) și al treilea fiind un grup comun *O. arenaria* și *O. pseudoarenaria*, s-au obținut rezultatele evidențiate în tabelul 3.

**Tabelul 3.** Rezultatele AMOVA cu definirea a trei grupuri la genul *Onosma*.

| Sursa variației                         | Procentul de variație | $F_{ST}$ |
|---|-----------------------|----------|
| Între grupuri                           | 51,95108              | 0,77651  |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 25,69971              |          |
| În cadrul populațiilor                  | 22,34921              |          |

În cazul în care s-au definit patru grupuri, primul corespunzând speciei *O. visianii*, al doilea corespunzând speciei *O. viridis* (toate cele patru populațiile), al treilea corespunzând speciei *O. arenaria* (cele două populații) și al patrulea corespunzând speciei *O. pseudoarenaria* (toate cele 12 populații) s-au obținut rezultatele evidențiate în tabelul 4.

**Tabelul 4.** Rezultatele AMOVA cu definirea a patru grupuri la genul *Onosma*.

| Sursa variației                         | Procentul de variație | F <sub>ST</sub> |
|---|-----------------------|-----------------|
| Între grupuri                           | 48,31                 | 0,72692         |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 24,38                 |                 |
| În cadrul populațiilor                  | 27,30                 |                 |

### **5.5. Discuții la genul *Onosma***

#### Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Onosma arenaria* și *Onosma pseudoarenaria*

Arborii generați pe baza secvenței ITS1 construiți prin metodele ME (fig. 6), ML, NJ și UPGMA, prezintă o structură identică indiferent de metoda utilizată. În cadrul sub-subgrupului format din populațiile de *O. arenaria* și *O. pseudoarenaria*, se observă o separare slabă a celor doi taxoni, pe baza unei singure transversii. Deși secvențele ITS au rezolvat cu succes probleme taxonomice intragenerice la genuri strâns înrudite cu genul *Onosma* (Weigend și colab., 2009; Cohen și Davis, 2009; Mansion și colab., 2009; Selvi și colab., 2009), în acest caz rezoluția lor este foarte scăzută, situație semnalată și de Kolarčik și colab. (2010) care afirmă că “cei doi taxoni se grupează într-o singură cladă cu rezoluție internă scăzută datorată unei lipse de variație”.

Arborii construiți prin metodele ME (fig. 7), ML, NJ și UPGMA, pe baza secvențelor concatenate a celor nouă regiuni cloroplastice arată o situație diferită față de arborii generați pe baza secvenței ITS1. Populațiile aparținând taxonilor *O. arenaria* și *O. pseudoarenaria* nu se mai separă cum a fost în cazul secvenței ITS1, singura populație care se separă din acest subgrup fiind populația de *O. pseudoarenaria* subsp. *tridentina* colectată din Serbia. Această diferență între rezoluția celor doi markeri poate fi explicată pe baza naturii lor. Se cunoaște faptul că ADN-ul cloroplastic din cauza naturii sale nerecombinante, a ratei de mutație scăzute și a modului de transmitere maternal, păstrează modelele genetice străvechi și ilustrează procese istorice precum izolarea refugială, divergența genetică, efectul fondatorului, rutele de migrare pentru perioade mai mari de timp decât markerii nucleari moșteniți biparental (Comes și Kadereit, 1998), pe când ADN-ul nuclear, datorită recombinării și ratei crescute de mutație, ilustrează procese genetice mult mai recente. Unii autori (Teppner, 1971) afirmă faptul că cele două specii sunt relativ noi și s-au format prin hibridizare. Astfel, *O. pseudoarenaria* probabil a provenit prin alotetraploidizarea unor taxon de tip Haplotricha cu

12 cromozomi (exp. *O. echioides*) cu un taxon de tip Asterotricha cu 14 cromozomi (exp. *O. fastigiata*), iar *O. arenaria* a provenit probabil prin retroîncrucișarea *O. pseudoarenaria* cu unii taxoni de tip Haplotricha cu 12 cromozomi. Dată fiind istoria strâns legată a celor doi taxoni, este explicabilă această lipsă de variație la nivel de ADN cloroplastic, în timp ce la nivel de ADN nuclear cele două specii se diferențiază mai rapid una de cealaltă. Diferențierea populației de *O. pseudoarenaria* subsp. *tridentina* din Serbia față de celelalte populații de *O. pseudoarenaria* este explicabilă atât prin faptul că este o subspecie, unii autori chiar considerând-o specie validă (Ball și Riedhl, 1972), cât și prin semnalul biogeografic datorat distanței geografice dintre populații.

În ceea ce privește estimarea parametrilor diversitate genetică, proporția markerilor variabili și indicele de raritate bazați pe matricea AFLP (tabelul 1), nu se obțin rezultate concludente, valorile fiind relativ egale pentru toate populațiile de *Onosma*. Singura specie care se diferențiază clar pe baza indicelui de raritate este specia *O. visianii*, diferențiere care se poate datora atât semnalului taxonomic cât și semnalului biogeografic, populația fiind colectată din Croația.

În ceea ce privește arborele NJ generat pe baza matricei AFLP (fig. 8) se observă următoarea situație: populațiile de *O. viridis* și *O. visianii* se separă de restul grupului, ulterior separându-se și una de cealaltă. Lungimea ramurilor în cazul acestor două specii arată și mai net separarea lor față de grupul *O. arenaria* – *O. pseudoarenaria*. În cadrul acestui grup, cele două populații de *O. arenaria* se grupează distinct față de *O. pseudoarenaria* cu o valoare maximă de bootstrap. Lungimea acestei ramuri sugerează încă o dată faptul că desprinderea celor două specii este relativ recentă, dar că la nivel de genom nuclear ele sunt clar diferențiate. În cadrul aceluiași grup se mai observă diferențierea a două populații: populația din Serbia care este evident izolată genetic față de restul populațiilor de *O. pseudoarenaria* și populația din Govăjdia (județul Hunedoara) care este situată într-o zonă împădurită, la poalele Carpaților de Sud, și este evident de asemenea izolată genetic. Restul populațiilor de *O. pseudoarenaria* formează subgrupuri distincte. Totuși, în cazul populațiilor din Păuliș (județul Hunedoara), Izvorul Crișului (județul Sălaj) și Suatu (județul Cluj), valorile de bootstrap sunt mari și arată izolarea genetică recentă a acestor populații.

Analiza AMOVA pe baza matricei AFLP atunci când nu se definesc grupuri arată o variație interpopulațională de 63,68% (tabelul 2) ceea ce sugerează existența unor populații relativ distincte genetic care se pot grupa pe criterii taxonomice și/sau biogeografice. Același fapt este susținut și de valoarea ridicată a indicelui  $F_{ST}$  (0,63681). În cazul în care se definesc trei grupuri (tabelul 3), unul compus din populația de *O. visianii*, al doilea compus din

populațiile de *O. viridis* și al treilea compus din populațiile de *O. arenaria* și *O. pseudoarenaria* se obține un procent de variație între grupuri de 51,95% ceea ce arată o bună separare și definire a grupurilor. Și creșterea valorii indicelui  $F_{ST}$  la 0,77651 sugerează aceeași diferențiere clară a grupurilor. Atunci când se definesc patru grupuri (tabelul 4), unul compus din populația de *O. visianii*, al doilea compus din populațiile de *O. viridis*, al treilea compus din populațiile de *O. arenaria* și al patrulea compus din populațiile de *O. pseudoarenaria* se obține un procent de variație între grupuri ușor mai scăzut decât în cazul precedent (48,31%) ceea ce sugerează că *O. arenaria* este delimitată de *O. pseudoarenaria*, dar această delimitare este relativ recentă comparativ cu delimitarea speciilor *O. visianii* și *O. viridis* față de grupul *O. arenaria* – *O. pseudoarenaria*. Concomitent se observă și o scădere a indicelui  $F_{ST}$  (0,72692), ceea ce arată aceeași delimitare mai puțin evidentă a speciei *O. pseudoarenaria* față de *O. arenaria*, comparativ cu diferențierea clară față de celelalte specii precum *O. visianii* și *O. viridis*.

Analiza PCO pe baza matricei AFLP (fig. 9) arată o delimitare puternică a speciei *O. visianii* față de restul speciilor, o delimitare clară dar nu așa puternică a speciei *O. arenaria*, o delimitare a speciei *O. viridis* în comun cu cele două populații de *O. pseudoarenaria* mai divergente (cea din Serbia și cea din Govăjdia) și o grupare comună a restului de populații de *O. pseudoarenaria*.

Așadar, majoritatea analizelor efectuate indică faptul că cele două specii, *Onosma arenaria* și *Onosma pseudoarenaria*, reprezintă specii distincte dar relativ recent separate, rezultat care confirmă analizele palinologice și cariologice.

### **5.6. Concluzii la genul *Onosma***

Secvența ADNnr, ITS1, relevă o ușoară separare a taxonului *O. arenaria* de *O. pseudoarenaria* pe baza unei singure modificări punctiforme.

Analiza secvențelor provenite de la nouă regiuni aparținând genomului cloroplastic nu relevă nicio separare a celor doi taxoni.

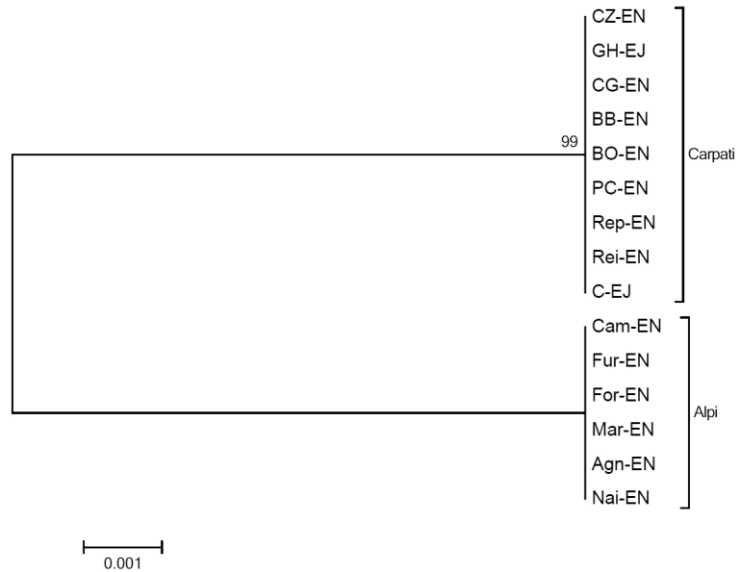
Rezultatele analizei AFLP separă clar cei doi taxoni.

Pe baza acestor rezultate, adăugate la diferențierea cariologică și palinologică, reiese că cei doi taxoni reprezintă unități distincte desprinse relativ recent una de cealaltă.

### **5.7. Rezultate la genul *Eritrichium***

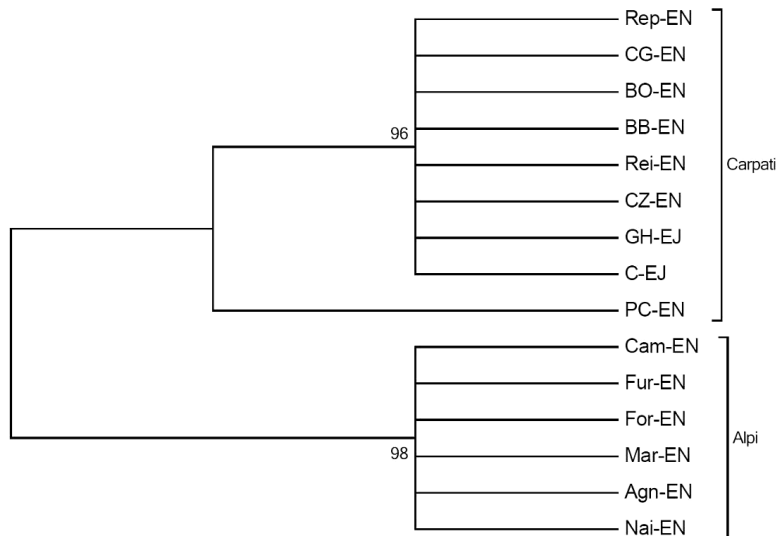
#### **Analiza secvențierii**

Pe baza secvenței ITS1 de aproximativ 350 pb au fost construiți arbori prin metodele ME (fig. 10), ML, NJ, UPGMA.



**Fig. 10.** Dendrogramă la genul *Eritrichium*, construită prin metoda ME pe baza secvenței ITS1.

Din cele 13 regiuni cloroplastice selectate s-a reușit amplificarea și secvențierea doar a nouă regiuni: *rpL16*, *trnG*, *trnL*, *rpl32-ndhF*, *psbD-trnT*, *trnD-E*, *trnT-L*, *rps16* și *trnH-psbA*, cu o lungime concatenată de aproximativ 5800 nucleotide, care au fost utilizate pentru construcția de arbori filogenetici. Arborii au fost construiți prin metodele ME (fig. 11), ML, NJ, UPGMA.



**Fig. 11.** Arbore de consens 50% la genul *Eritrichium*, construit prin metoda ME, pe baza secvențelor *rpL16*, *trnG*, *trnL*, *rps16*, *rpl32-ndhF*, *psbD-trnT*, *trnD-E*, *trnT-L* și *trnH-psbA*.

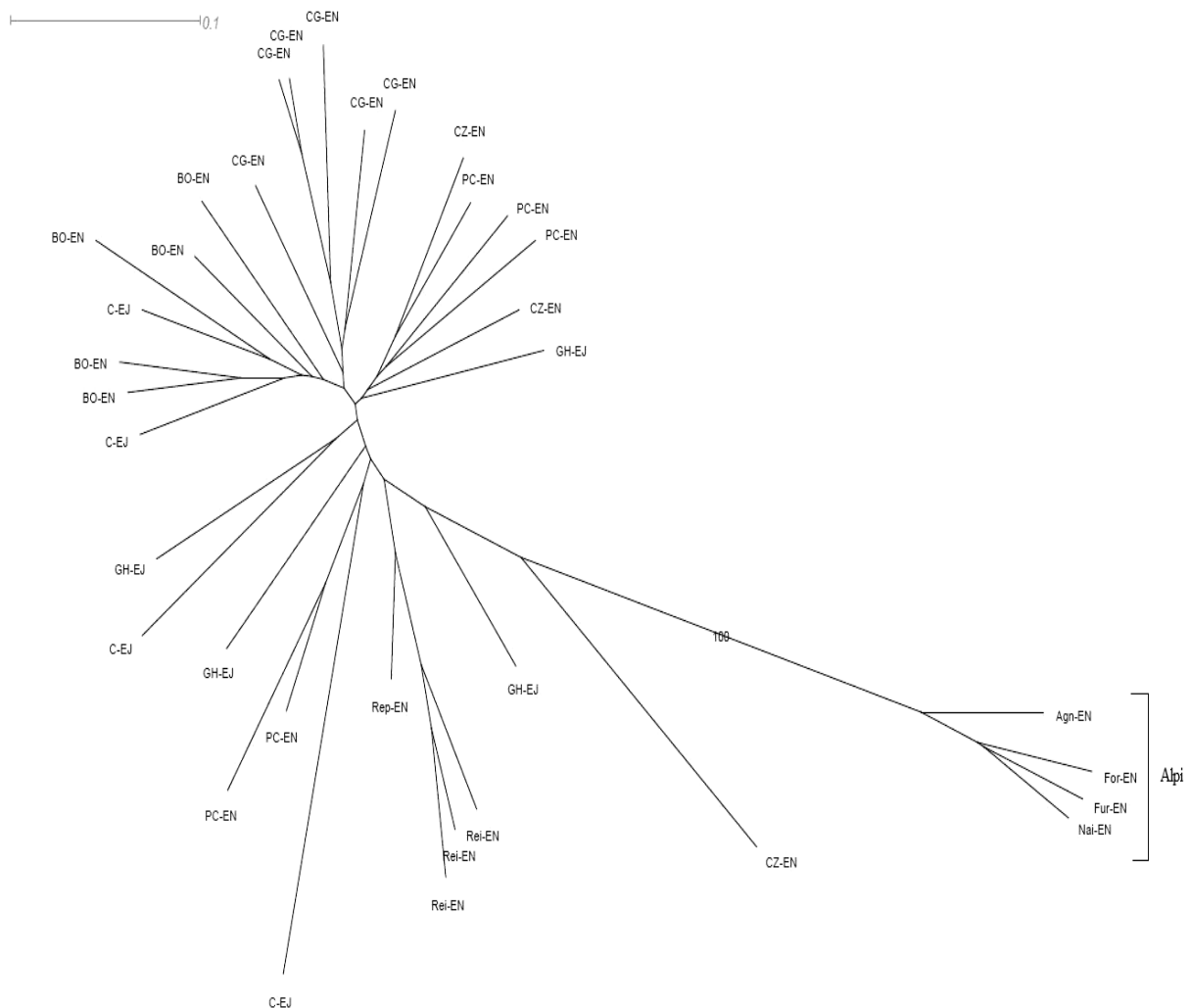
### Analiza AFLP

Parametrii determinați cu scriptul AFLPdat: locii polimorfi, diversitatea genetică a lui Nei și indicele de raritate sunt prezentați în tabelul 5.

**Tabelul 5.** Proporția locilor polimorfi, diversitatea genetică și indicele de raritate pentru populațiile genului *Eritrichium*.

| Specia                    | Populația | Proporția markerilor variabili | Diversitatea genetică | Indicele de raritate (DW) |
|---------------------------|-----------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <i>Eritrichium jankae</i> | GH-EJ     | 0,3957                         | 0,2228                | 25,7616                   |
|                           | C-EJ      | 0,5294                         | 0,2852                | 24,0836                   |
| <i>Eritrichium nanum</i>  | ALPI-EN   | 0,2459                         | 0,1345                | 94,9871                   |
|                           | PC-EN     | 0,3636                         | 0,1903                | 42,2113                   |
|                           | CZ-EN     | 0,4759                         | 0,3172                | 18,4224                   |
|                           | CG-EN     | 0,3957                         | 0,1803                | 62,1173                   |
|                           | BO-EN     | 0,3689                         | 0,1786                | 39,5904                   |
|                           | Rei-EN    | 0,2566                         | 0,1381                | 24,4530                   |

Pe baza matricei AFLP a fost generat un arbore Neighbor Joining (fig. 12).



**Fig. 12.** Dendrogramă la genul *Eritrichium*, construită prin metoda NJ, pe baza matricei AFLP.

Rezultatele AMOVA în cazul în care s-au definit două grupuri, primul corespunzând populațiilor de *Eritrichium nanum* din Alpi și al doilea corespunzând populațiilor din Carpați de *E. nanum* și *E. jankae*, sunt evidențiate în tabelul 6.

**Tabelul 6.** Rezultatele AMOVA cu definirea a două grupuri la genul *Eritrichium*.

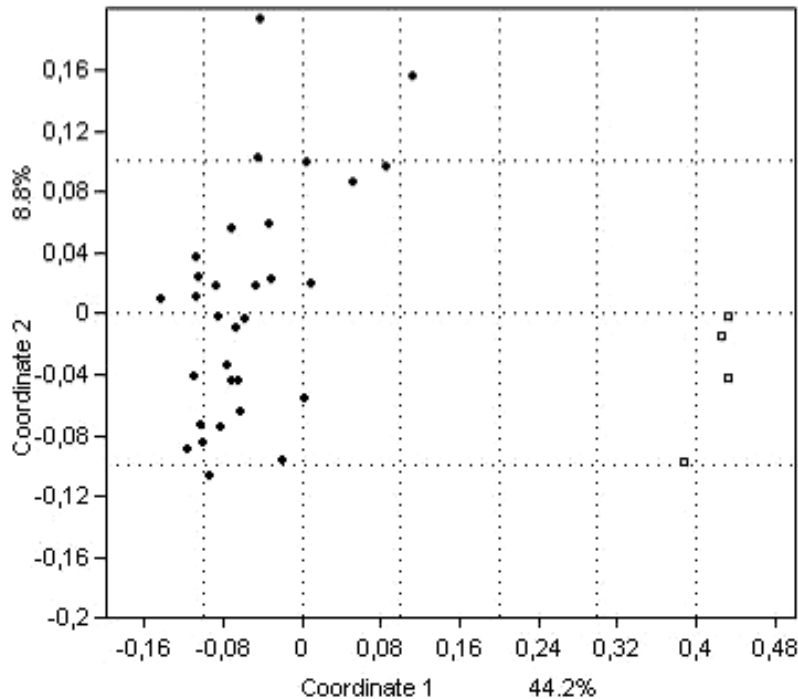
| Sursa variației                         | Procentul de variație | F <sub>ST</sub> |
|---|-----------------------|-----------------|
| Între grupuri                           | 53,48                 | 0,63086         |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 9,60                  |                 |
| În cadrul populațiilor                  | 36,91                 |                 |

În cazul în care se definesc trei grupuri, atât pe criterii taxonomice cât și biogeografice, primul grup conținând populațiile de *E. nanum* din Alpi, al doilea grup conținând populațiile de *E. nanum* din Carpați și al treilea grup conținând populațiile de *E. jankae*, se obțin rezultatele prezentate în tabelul 7.

**Tabelul 7.** Rezultatele AMOVA cu definirea a trei grupuri la genul *Eritrichium*.

| Sursa variației                         | Procentul de variație | F <sub>ST</sub> |
|---|-----------------------|-----------------|
| Între grupuri                           | 29,9                  | 0,42897         |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 15,4                  |                 |
| În cadrul populațiilor                  | 54,7                  |                 |

Rezultatele analizei “Principal Coordinate” (PCO) pe baza matricei AFLP sunt prezentate în figura 13.



**Fig. 13.** Rezultate PCO la genul *Eritrichium* pe baza matricei AFLP (negru – populațiile de *E. nanum* și *E. jankae* din Carpați, pătrat albastru – populațiile de *E. nanum* din Alpi).

### **5.8. Discuții la genul *Eritrichium***

#### Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Eritrichium nanum* și *Eritrichium jankae*

Analiza secvenței nucleare ITS1 nu indică nicio separare între taxonii *Eritrichium nanum* și *Eritrichium jankae*, toate populațiile aparținând genului *Eritrichium* colectate din România prezentând același ribotip. În schimb, la acest nivel se observă o separație certă biogeografică între populațiile colectate din Carpați și cele colectate din Alpii Elvețieni. Toate metodele de construire ale arborilor ME (fig. 10), NJ, ML, UPGMA generează același model de separație cu o valoare de bootstrap de 99 între populațiile aparținând celor două zone geografice. Această separație de criterii biogeografice este menținută și la nivel de markeri AFLP. Arborele NJ generat pe baza matricei AFLP (fig. 12) nu indică nicio separare între populațiile de *Eritrichium* din România, dar le separă pe acestea de populațiile din Elveția cu o valoare maximă de bootstrap.

Analiza secvențelor cloroplastice prezintă o situație oarecum diferită. În cadrul arborilor generați pe baza acestor regiuni (fig. 11) se menține aceeași separație observată la nivelul secvenței nucleare ITS1 între populațiile de *Eritrichium* colectate din Carpați și cele colectate din Alpii Elvețieni, dar se mai observă o separație între populațiile de *Eritrichium* colectate din România, populația de *Eritrichium* colectată din Masivul Piatra Craiului separându-se de restul populațiilor din România. Această populație are un haplotip intermediar între cel existent la populațiile din Alpi și cel existent la populațiile din Carpați.

În ceea ce privește proporția markerilor variabili și diversitatea genetică estimate pe baza matricei AFLP (tabelul 5), între populațiile de *Eritrichium nanum* și *E. jankae* nu se observă diferențe marcante. În cazul indicelui de raritate se observă o valoare mare (94,98) pentru populațiile din Alpi, ceea ce indică o divergență a acestora față de populațiile din Carpați, pe criterii biogeografice, dar nu se observă nicio separare a populațiilor de *E. jankae* față de cele de *E. nanum*.

În cadrul analizei AMOVA se observă o separație clară între grupul format de populațiile din Alpi și cel format din populațiile din Carpați, mai mult de jumătate din variație (53,48%) datorându-se componentei intergrupuri (tabelul 6). Identic, creșterea indicelui  $F_{ST}$  de la 0,37392 atunci când nu se definesc grupuri la 0,63086 când sunt definite două grupuri (cel din Alpi și cel din Carpați), arată faptul că cele două grupuri sunt bine delimitate. Atunci când se realizează analiza AMOVA cu includerea unui grup format din cele două populații de *E. jankae* (tabelul 7) se obține o valoare mult mai mică a varianței dintre grupuri (29,9%) decât în cazul precedent, ceea ce indică faptul că grupurile nu sunt bine definite. Același lucru este susținut și de scăderea valorii  $F_{ST}$  de la 0,63086 la 0,42897.

Analiza PCO (fig. 13) realizată pe baza matricei AFLP indică aceeași separare între populațiile de *Eritrichium* din Alpi și restul populațiilor de *Eritrichium* din Carpați, nici în acest caz populațiile de *E. jankae* nu se separă de restul populațiilor din România.

Toate analizele efectuate indică faptul că taxonul *E. jankae* nu merită rangul de specie dar nu își merită nici rangul de subspecie, cei doi taxoni nediferențiindu-se la nivel genetic. Deoarece diferențierea morfologică între cei doi taxoni există, se impune posibilitatea considerării taxonului *E. jankae* drept un ecotip nediferențiat genetic al taxonului *E. nanum*. Dezvoltarea indumentului alb argintiu lanat la nivelul inflorescenței și frunzelor, și care duce la încetinirea evaporării apei, poate fi o modificare apărută ca răspuns la factorii de mediu, și anume climatul secetos în care se găsește *E. jankae*. Așadar, taxonul *E. jankae* poate reprezenta doar un ecotip diferențiat morfologic dar nu și genetic al taxonului *E. nanum*.

### **5.9. Concluzii la genul *Eritrichium***

Rezultatele analizelor bazate pe ITS1, ADNcp și AFLP nu indică separarea taxonului *E. jankae* de taxonul *E. nanum*, dar indică separarea biogeografică a populațiilor de *E. nanum* din Alpi față de populațiile de *E. nanum* din Carpați, cu o excepție reprezentată de populația de *E. nanum* din Munții Piatra Craiului, care pe baza ADNcp are un haplotip intermediar între cele două grupuri.

Niciuna dintre analizele efectuate nu indică separarea taxonului *E. jankae* de taxonul *E. nanum*, ci relevă faptul că cei doi taxoni sunt identici din punct de vedere genetic.

Pe baza rezultatelor obținute, *E. jankae* reprezintă, cel mai probabil, un ecotip nediferențiat genetic al taxonului *E. nanum*.

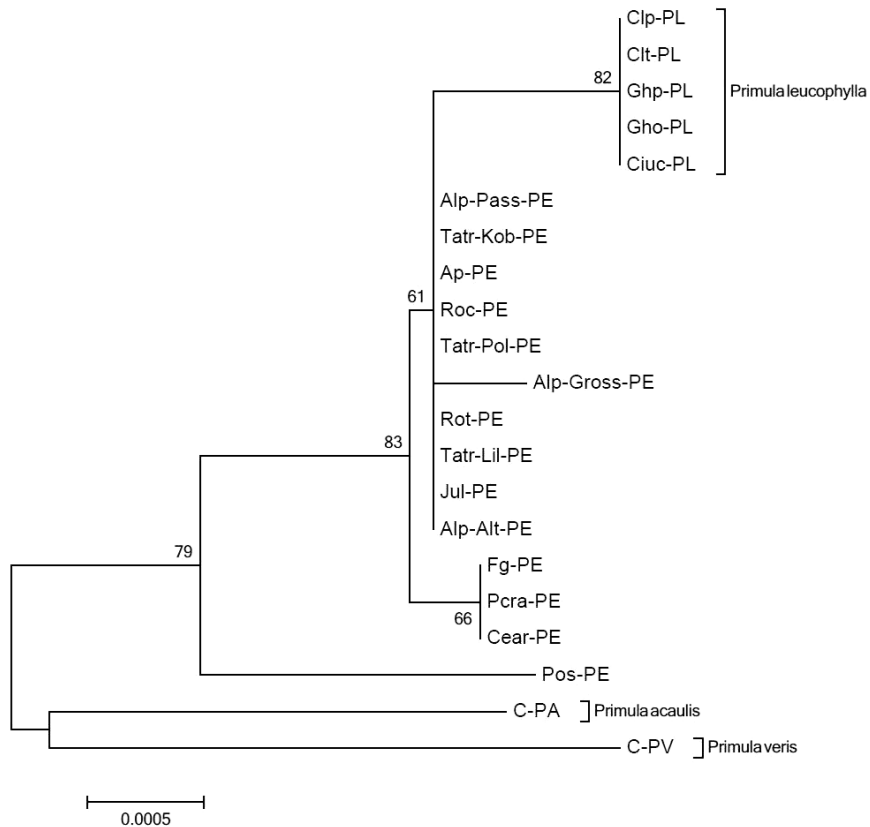
### **5.10. Rezultate la specia *Primula leucophylla***

#### Analiza secvențierii

Secvențele provenite de la trei markeri moleculari: *rpL16*, *psbD-trnT* și *trnH-psbA*, cu lungimea concatenată de aproximativ 2700 nucleotide, au fost utilizate pentru construcția de arbori prin metodele ME (fig. 14), ML, NJ, UPGMA.

#### Analiza AFLP

Parametrii determinați cu scriptul AFLPdat: locii polimorfi, diversitatea genetică a lui Nei și indicele de raritate sunt prezentați în tabelul 8.

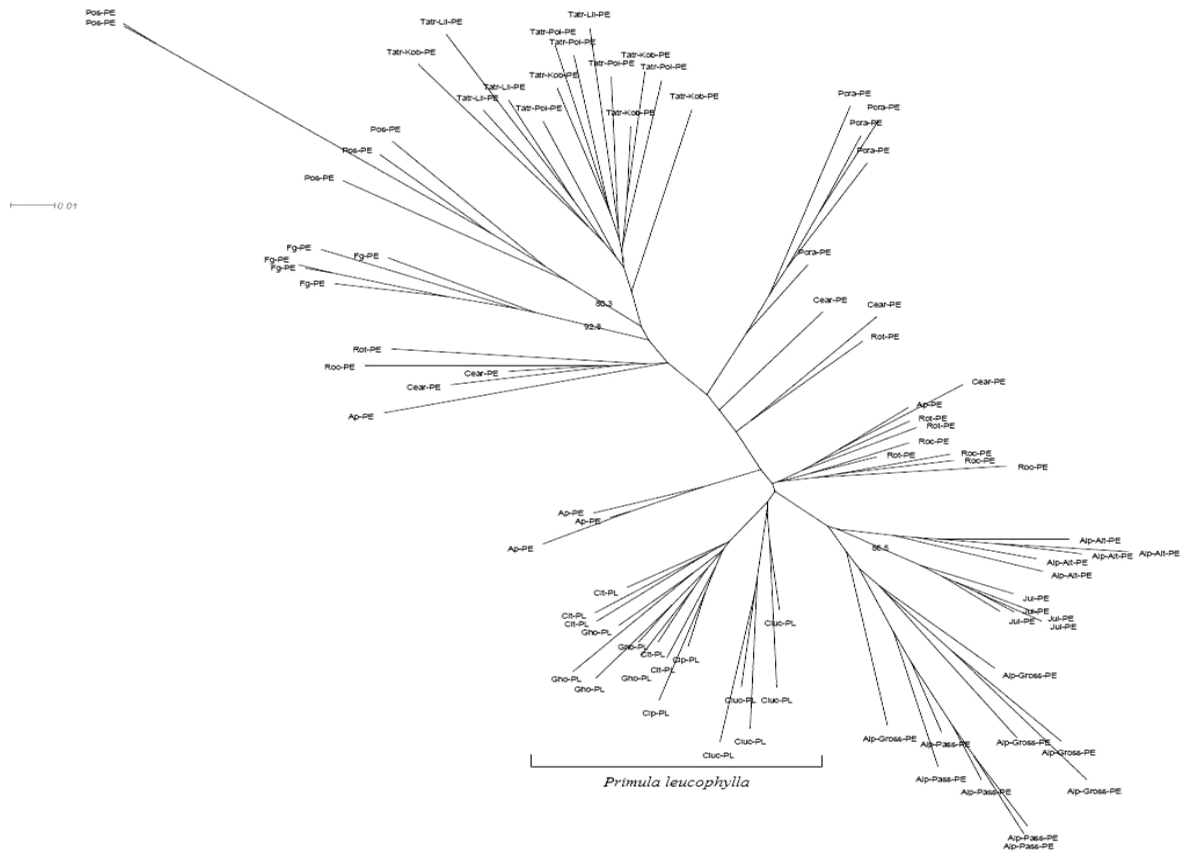


**Fig. 14.** Dendrogramă la genul *Primula*, construită prin metoda ME, pe baza secvențelor *rpL16*, *psbD-trnT* și *trnH-psbA*.

**Tabelul 8.** Proporția locilor polimorfi, diversitatea genetică și indicele de raritate pentru populațiile genului *Primula*.

| Specia                     | Populația   | Proporția markerilor variabili | Diversitatea genetică | Indicele de raritate (DW) |
|----------------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <i>Primula elatior</i>     | Ap-PE       | 0,1630                         | 0,0781                | 18,4976                   |
|                            | Fg-PE       | 0,1545                         | 0,0746                | 25,3190                   |
|                            | Pos-PE      | 0,2489                         | 0,1270                | 58,5491                   |
|                            | Pcra-PE     | 0,1888                         | 0,0892                | 20,7056                   |
|                            | Roc-PE      | 0,2060                         | 0,0987                | 17,1952                   |
|                            | Rot-PE      | 0,1673                         | 0,0815                | 14,0721                   |
|                            | Cear-PE     | 0,1931                         | 0,0969                | 11,6968                   |
|                            | Tatr-Kob-PE | 0,2017                         | 0,0978                | 21,5133                   |
|                            | Tatr-Pol-PE | 0,2060                         | 0,0995                | 20,0620                   |
|                            | Tatr-Lil-PE | 0,2017                         | 0,1101                | 21,0011                   |
|                            | Alp-Pass-PE | 0,1416                         | 0,0695                | 19,3688                   |
|                            | Jul-PE      | 0,0944                         | 0,0429                | 17,8315                   |
|                            | Alp-Alt-PE  | 0,1373                         | 0,0660                | 16,3522                   |
| Alp-Gross-PE               | 0,2017      | 0,1021                         | 17,0290               |                           |
| <i>Primula leucophylla</i> | Ciuc-PL     | 0,1759                         | 0,0866                | 21,8210                   |
|                            | Gho-PL      | 0,1330                         | 0,0652                | 14,7325                   |
|                            | Clp-PL      | 0,0472                         | 0,0472                | 3,7617                    |
|                            | Clt-PL      | 0,1201                         | 0,0575                | 15,6667                   |

Pe baza matricei AFLP a fost generat un arbore Neighbor Joining (fig. 15).



**Fig. 15.** Dendrogramă la genul *Primula*, construită prin metoda NJ, pe baza matricei AFLP.

Rezultatele AMOVA obținute în cazul când nu se definește niciun grup sunt trecute în tabelul 9.

**Tabelul 9.** Rezultatele AMOVA fără definirea grupurilor la genul *Primula*.

| Sursa variației        | Procentul de variație | $F_{ST}$ |
|------------------------|-----------------------|----------|
| Între populații        | 44,67                 | 0,44669  |
| În cadrul populațiilor | 55,33                 |          |

În cazul în care s-au definit două grupuri pe criterii taxonomice, primul corespunzând populațiilor de *Primula elatior* și al doilea corespunzând populațiilor de *Primula leucophylla*, s-au obținut rezultatele evidențiate în tabelul 10.

**Tabelul 10.** Rezultatele AMOVA cu definirea a două grupuri pe criterii taxonomice la genul *Primula*.

| Sursa variației                         | Procentul de variație | $F_{ST}$ |
|---|-----------------------|----------|
| Între grupuri                           | 14,94951              | 0,50159  |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 35,20986              |          |
| În cadrul populațiilor                  | 49,84062              |          |

În cazul în care s-au definit trei grupuri pe criterii biogeografice, primul corespunzând populațiilor de *Primula elatior* din Alpi, al doilea corespunzând populațiilor de *P. elatior* din

Tatra și al treilea corespunzând restului de populații de *Primula* din Carpații de S-E, s-au obținut rezultatele evidențiate în tabelul 11.

**Tabelul 11.** Rezultatele AMOVA cu definirea a trei grupuri pe criterii biogeografice la genul *Primula*.

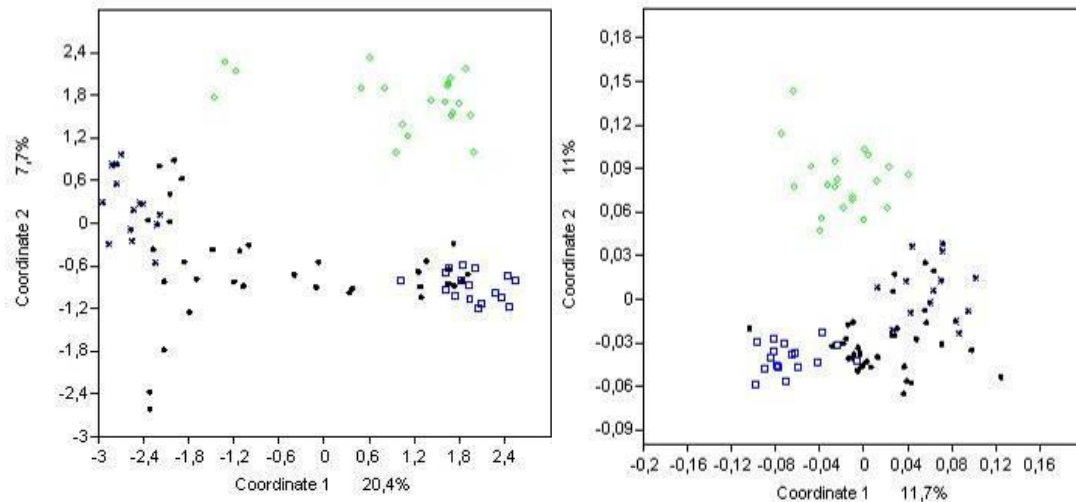
| Sursa variației                         | Procentul de variație | F <sub>ST</sub> |
|---|-----------------------|-----------------|
| Între grupuri                           | 18,73280              | 0,48949         |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 30,21576              |                 |
| În cadrul populațiilor                  | 51,05144              |                 |

În cazul în care s-au definit patru grupuri atât pe criterii taxonomice cât și pe criterii biogeografice, primul corespunzând populațiilor de *Primula elatior* din Alpi, al doilea corespunzând populațiilor de *P. elatior* din Tatra, al treilea corespunzând populațiilor de *P. elatior* din Carpații de S-E și al patrulea corespunzând populațiilor de *Primula leucophylla*, s-au obținut rezultatele evidențiate în tabelul 12.

**Tabelul 12.** Rezultatele AMOVA cu definirea a patru grupuri pe criterii biogeografice și taxonomice la genul *Primula*.

| Sursa variației                         | Procentul de variație | F <sub>ST</sub> |
|---|-----------------------|-----------------|
| Între grupuri                           | 21,79270              | 0,47591         |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 25,79792              |                 |
| În cadrul populațiilor                  | 52,40938              |                 |

Analiza “Principal Coordinate” (PCO) s-a realizat pe baza matricei AFLP. Când se utilizează indicele euclidean se obțin rezultatele prezentate în figura 16 - stânga, iar când se utilizează indicele Simpson se obțin rezultatele prezentate în figura 16 - dreapta.



**Fig. 16.** Rezultate PCO pe baza indicelui euclidean (stânga) și pe baza indicelui Simpson (dreapta) la genul *Primula* pe baza matricei AFLP (negru - populațiile de *P. elatior* din Carpații de S-E, cruce albastră - populațiile de *P. elatior* din Tatra, pătrat albastru - populațiile de *P. leucophylla*, romb verde - populațiile de *P. elatior* din Alpi).

### **5.11. Discuții la specia *Primula leucophylla***

#### Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Primula elatior* și *Primula leucophylla*

În ceea ce privește proporția locilor polimorfi și diversitatea genetică (tabelul 8) nu se observă nicio separare a *P. leucophylla* de *P. elatior*. Valorile obținute pentru *P. leucophylla* sunt destul de scăzute dar, totuși, există populații de *P. elatior* precum cea din Alpi, Soca Valley, care prezintă valori și mai scăzute. Indicele de raritate are valori medii, nu arată nicio izolare pentru populațiile de *P. leucophylla* față de cele aparținând speciei *P. elatior*.

Analiza Neighbor-Joining (fig. 15) prezintă o structurare a populațiilor de *P. leucophylla*, dar această grupare nu este susținută prin valori de bootstrap menționabile.

Analiza PCO a matricei AFLP relevă o grupare pe criterii biogeografice și nu pe criterii taxonomice. Astfel, populațiile de *P. elatior* din Alpi se separă de restul populațiilor din Carpați (fig. 16). Utilizând indicele Simpson la analiza PCO (fig. 16 - dreapta) se observă o ușoară separare a taxonului *P. leucophylla* în cadrul grupului din Carpați.

Analizele AMOVA bazate pe matricea AFLP fără definirea vreunui grup (tabelul 9) arată o variație mare intrapopulațională (55,33%) și o variație mică interpopulațională, ceea ce indică faptul că majoritatea sau chiar toate populațiile utilizate în studiu sunt destul de slab separate între ele și sunt uniforme din punct de vedere genetic. Separația moderată a populațiilor este susținută și de valoarea  $F_{ST}$  de 0,44669. Atunci când se face o asamblare pe criterii taxonomice, *P. elatior* vs *P. leucophylla* (tabelul 10), se observă că variația dintre cele două grupuri este scăzută (14,94%), ceea ce indică că grupurile nu sunt bine conturate. Cel mai mare procent de variație (49,84%) se datorează tot componenteii intrapopulaționale. Atunci când se realizează o asamblare în grupuri pe baza unor criterii geografice (tabelul 11), se observă că procentul de variație dintre grupuri crește ușor (18,73%) sugerând faptul că grupurile sunt mai bine definite, dar procentul de variație cel mai mare se datorează tot componenteii intrapopulaționale (51,05%). Cea mai bună conturare a grupurilor se obține atunci când se realizează o asamblare atât pe criterii geografice cât și taxonomice (tabelul 12). În acest caz, creșterea procentului de variație dintre grupuri la valoarea de 21,79% indică existența unei slabe separări a taxonului *P. leucophylla* de specia *P. elatior*.

Analiza de secvențe cloroplastice prezintă în cazul arborilor generați prin metodele ME (fig. 14), ML, NJ și UPGMA aproximativ aceeași grupare. În cadrul grupului format din populațiile de *P. elatior* și *P. leucophylla* se disting clar anumite populații de *P. elatior*: populațiile din Postăvaru, din Făgăraș, din Cearcănu și din Piatra Craiului. În cadrul subgrupului format din restul populațiilor, se distinge sub-subgrupul *P. leucophylla* care cuprinde toate populațiile aparținând acestui taxon, dar acest sub-subgrup este mai slab

separat de majoritatea populațiilor din grupul *P. elatior* decât unele populații subalpine calcifile de *P. elatior* din Carpații de S-E.

Diferențierea genetică pe baza analizei AFLP și a datelor ADNcp între *P. elatior* și *P. leucophylla* este slabă. Delimitarea taxonului *P. leucophylla* drept o unitate taxonomică distinctă nu este susținută de rezultatul niciunei analize. Rezultatele studiului indică mai mult posibilitatea ca *P. leucophylla* să fie un ecotip al *P. elatior*. Dezvoltarea indumentului care încetinește evaporarea apei din frunze poate fi o modificare apărută ca răspuns la factorii de mediu, și anume climatul secetos în care se găsește *P. leucophylla*.

*P. leucophylla*, fiind întâlnită etajul montan superior-subalpin și în pajiștile subalpine, este separată ecologic la nivel altitudinal de *P. elatior s. str.* care are o distribuție largă în cadrul Carpaților de S-E dar în etajul submontan-montan (Ciocârlan, 2009). Deoarece este un taxon marginal ecologic, *P. leucophylla* este separată și din punct de vedere fenologic de *P. elatior s. str.*, această separare fenologică putând duce la o limitare a fluxului genetic dintre cei doi taxoni ceea ce duce în timp la o diferențiere în structura genetică.

#### **5.12. Concluzii la specia *Primula leucophylla***

Nici analiza AFLP nici analiza ADNcp nu susțin delimitarea taxonului *P. leucophylla* ca o unitate taxonomică distinctă de *P. elatior*.

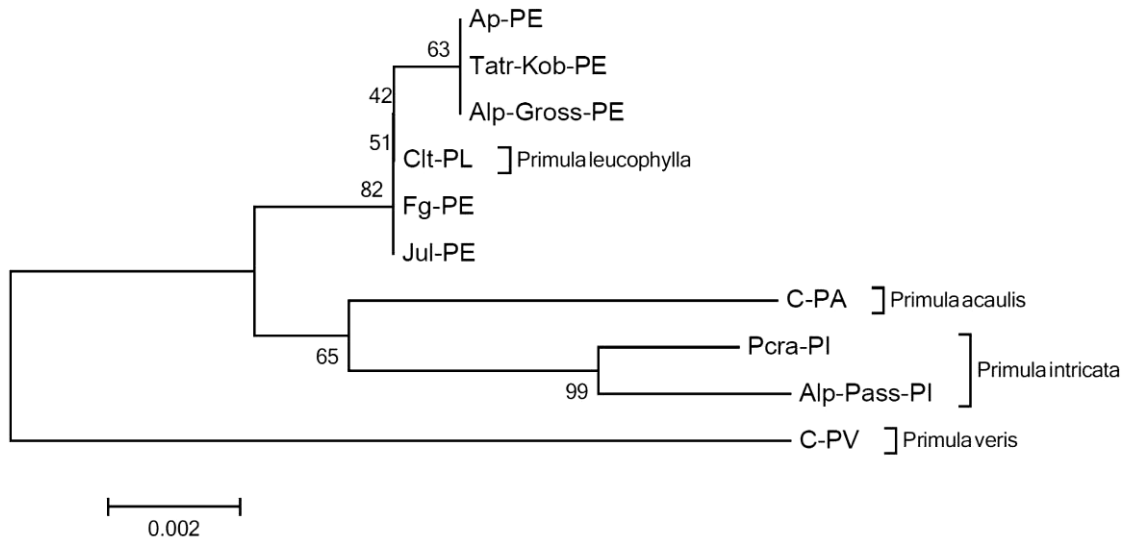
Rezultatele studiului sugerează că *P. leucophylla* ar reprezenta un ecotip adaptat la condițiile de climă secetoasă al speciei *P. elatior*.

Ecotipul *P. leucophylla* datorită izolării ecologice și fenologice se află în stadiul de diferențiere față de specia *P. elatior*.

#### **5.13. Rezultate la specia *Primula intricata***

##### Analiza secvențierii

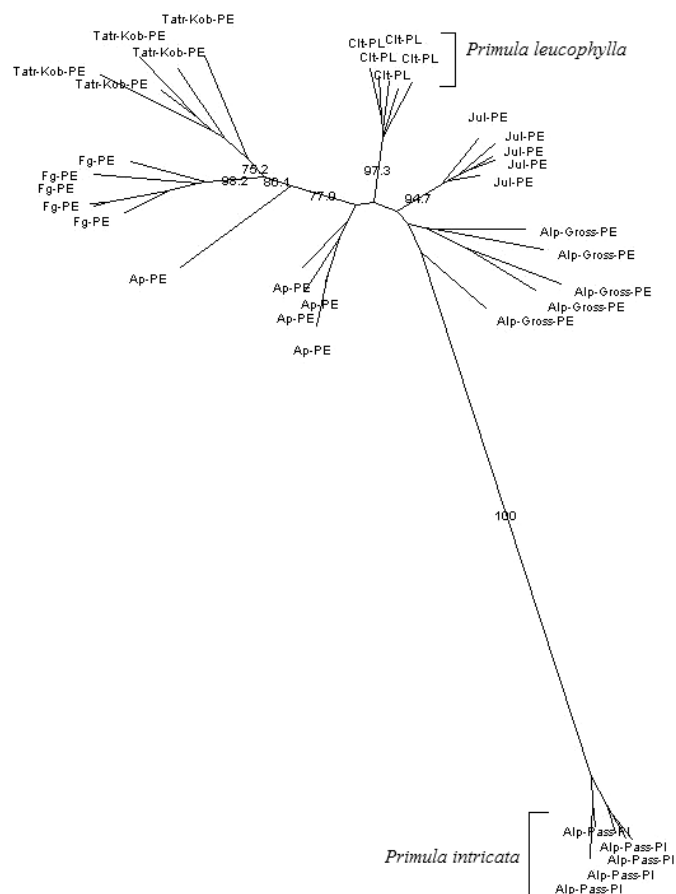
Secvențele provenite de la trei markeri moleculari: ITS1, *trnL* și *trnH-psbA*, cu lungimea concatenată de aproximativ 1200 nucleotide, au fost utilizate pentru construcția de arbori prin metodele ME (fig. 17), ML, NJ, UPGMA.



**Fig. 17.** Dendrogramă la *Primula intricata*, construită prin metoda ME, pe baza secvențelor ITS1, *trnL* și *trnH-psbA*.

### Analiza AFLP

Pe baza matricei AFLP a fost generat un arbore Neighbor Joining (fig. 18).



**Fig. 18.** Dendrogramă la *Primula intricata*, construită prin metoda NJ, pe baza matricei AFLP.

Cu ajutorul scriptului în platforma R, AFLPdat, s-au determinat proporția locilor polimorfi, diversitatea genetică a lui Nei și indicele de raritate (tabelul 13).

**Tabelul 13.** Proporția locilor polimorfi, diversitatea genetică și indicele de raritate pentru populațiile genului *Primula*, utilizate în studiul speciei *Primula intricata*.

| Specia                     | Populația    | Proporția markerilor variabili | Diversitatea genetică | Indicele de raritate (DW) |
|----------------------------|--------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <i>Primula elatior</i>     | Ap-PE        | 0,2356                         | 0,1133                | 32,6641                   |
|                            | Fg-PE        | 0,2101                         | 0,1031                | 54,4281                   |
|                            | Tatr-Kob-PE  | 0,2675                         | 0,1324                | 63,3665                   |
|                            | Jul-PE       | 0,1337                         | 0,0611                | 27,9473                   |
|                            | Alp-Gross-PE | 0,29298                        | 0,1490                | 32,3495                   |
| <i>Primula leucophylla</i> | Clt-PL       | 0,1401                         | 0,0700                | 26,6714                   |
| <i>Primula intricata</i>   | Alp-Pass-PI  | 0,1337                         | 0,0687                | 167,1520                  |

Rezultatele AMOVA obținute în cazul când nu se definește niciun grup sunt prezentate în tabelul 14.

**Tabelul 14.** Rezultatele AMOVA fără definirea grupurilor la populațiile genului *Primula*, utilizate în studiul speciei *Primula intricata*.

| Sursa variației        | Procentul de variație | $F_{ST}$ |
|------------------------|-----------------------|----------|
| Între populații        | 67,7                  | 0,67701  |
| În cadrul populațiilor | 32,3                  |          |

În cazul în care s-au definit două grupuri pe criterii taxonomice, primul corespunzând populațiilor de *Primula elatior* și *Primula leucophylla* și al doilea corespunzând populației de *Primula intricata*, s-au obținut rezultatele evidențiate în tabelul 15.

**Tabelul 15.** Rezultatele AMOVA cu definirea a două grupuri pe criterii taxonomice la populațiile genului *Primula*, utilizate în studiul speciei *Primula intricata*.

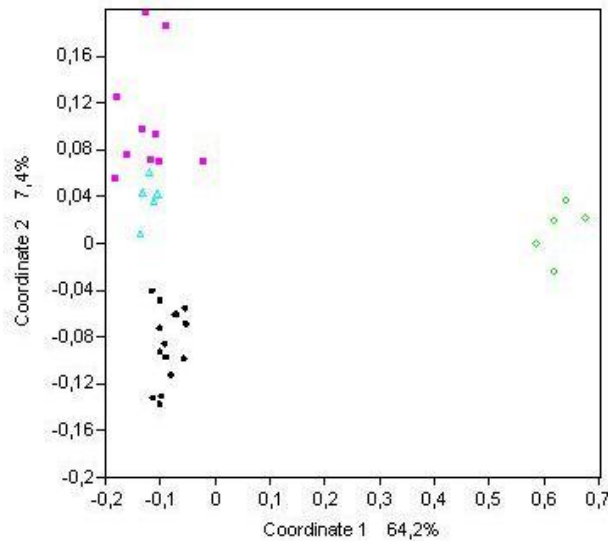
| Sursa variației                         | Procentul de variație | $F_{ST}$ |
|---|-----------------------|----------|
| Între grupuri                           | 58,93                 | 0,81298  |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 22,36                 |          |
| În cadrul populațiilor                  | 18,71                 |          |

În cazul în care s-au definit trei grupuri pe criterii taxonomice, primul corespunzând populațiilor de *Primula elatior*, al doilea corespunzând populației de *Primula intricata* și al treilea corespunzând populației de *Primula leucophylla* s-au obținut rezultatele evidențiate în tabelul 16.

**Tabelul 16.** Rezultatele AMOVA cu definirea a trei grupuri pe criterii taxonomice la populațiile genului *Primula*, utilizate în studiul speciei *Primula intricata*.

| Sursa variației                         | Procentul de variație | F <sub>ST</sub> |
|---|-----------------------|-----------------|
| Între grupuri                           | 43,92                 | 0,74457         |
| Între populațiile din cadrul grupurilor | 30,53                 |                 |
| În cadrul populațiilor                  | 25,55                 |                 |

Analiza “Principal Coordinate” (PCO) s-a realizat de asemenea pe baza matricei AFLP utilizând indicii Simpson (fig. 19).



**Fig. 19.** Rezultate PCO pe baza indicelui Simpson pentru populațiile genului *Primula*, utilizate în studiul speciei *Primula intricata* pe baza matricei AFLP (negru - populațiile de *P. elatior* din Carpați, pătrat mov - populațiile de *P. elatior* din Alpi, triunghi albastru - populația de *P. leucophylla*, romb verde - populația de *P. intricata* din Alpi).

#### **5.14. Discuții la specia *Primula intricata***

##### Investigarea relațiilor filogenetice dintre *Primula elatior* și *Primula intricata*

Rezultatele analizei AMOVA când nu se definesc grupuri (tabelul 14) indică faptul că cea mai mare variație se întâlnește între populații (67,7%). Acest fapt sugerează existența unor populații diverse unele de celelalte care pot fi ușor separate în grupuri. Valoarea mare a indicelui F<sub>ST</sub> (0,67701) confirmă același fapt. Variația intrapopulațională de 32,3% indică o relativă uniformitate în cadrul populațiilor. În cazul în care se definesc trei grupuri: *P. elatior*, *P. leucophylla* și *P. intricata* (tabelul 16), cea mai mare cantitate de variație genetică se datorează componente intergrupuri (43,92%) ceea ce sugerează că grupurile sunt bine diferențiate între ele, cu un flux genetic scăzut între ele. Variația dintre populațiile din cadrul grupurilor este de asemenea crescută, indicând același fapt. De asemenea, creșterea valorii

indicelui  $F_{ST}$  la 0,81298 reconfirmă același pattern. Rezultatul obținut poate fi datorat și distanței mari dintre punctele de colectare ale populațiilor, așadar că pentru a avea certitudine în ceea ce privește diferențierea grupurilor, s-a realizat încă o analiză AMOVA cu două grupuri: *P. elatior* împreună cu *P. leucophylla* și separat *P. intricata* (tabelul 15). Rezultatul arată clar faptul că mai mult de jumătate din variația genetică (58,93%) este explicată prin componenta variației dintre grupuri. Rezultatul susține clar separația *P. intricata* față de *P. elatior*, mai mult decât este susținută separația *P. leucophylla* față de *P. elatior*, rezultatul variației genetice dintre grupuri la definirea celor trei grupuri fiind mai mic decât în acest caz. Concomitent, se înregistrează și scăderea valorii indicelui  $F_{ST}$  la 0,74457, ceea ce confirmă același fapt. Așadar grupul constituit din *P. intricata* este un grup compact, bine format, sugerând existența unei specii distincte.

Analiza PCO (fig. 19) a matricei AFLP arată clar separarea *P. intricata* față de grupul constituit din *P. elatior* și *P. leucophylla*. Această separație nu este o separație pe criterii geografice, populațiile de *P. elatior* din Alpi nu se grupează cu populația de *P. intricata* din Alpi, ci mai degrabă se grupează cu *P. leucophylla* în cadrul unui grup *P. elatior* - *P. leucophylla*.

Arborele generat prin metoda NJ (fig. 18) pe baza matricei AFLP arată o separație clară cu o valoare de bootstrap maximă a două filogrupuri. Primul grup este constituit din populația de *P. intricata* din Alpi și al doilea este constituit din populațiile de *P. elatior* și *P. leucophylla*. Populația din Alpi de *P. intricata* este clar diferențiată de restul populațiilor de *Primula* atât prin valoarea maximă de bootstrap dar mai ales prin lungimea ramurilor arborelui NJ.

Rezultatele analizei diversității genetice și a proporției markerilor variabili (tabelul 13) indică populația de *P. intricata* ca fiind printre cele mai parcimonioase. În general, diversitatea genetică este scăzută în cadrul populațiilor mici și izolate ca o consecință a unor procese precum driftul genetic, bottleneck-ul, consangvinizarea și efectul fondatorului (Wright, 1931; Nei, 1975; Young și colab., 1996). Indicele de raritate (DW) este o măsură a divergenței și exprimă numărul de markeri privați, iar în cazul speciei *P. intricata* această valoare este maximă (167,1520), ceea ce o diferențiază încă o dată de grupul *P. elatior*.

Arborii generați prin analiza de secvențe (fig. 17) indică faptul că cele două populații de *P. intricata* nu fac parte din grupul *P. elatior*. În funcție de metoda utilizată, specia *P. intricata* se grupează fie într-un grup comun cu specia *P. acaulis*, fie se grupează mai apropiat de *P. elatior* decât de *P. acaulis* sau *P. veris*, dar totuși, ea nu este inclusă în grupul alcătuit de *P. elatior* și *P. leucophylla*. Secvențele aparținând populațiilor de *P. intricata* sunt foarte

divergențe față de cele aparținând grupului *P. elatior*, din lungimea concatenată de 1200 de nucleotide a celor trei markeri, peste 200 de situri informative se găsesc între *P. intricata* și grupul *P. elatior*. Cele două populații de *P. intricata*, cea din Alpi și cea din Carpați, diferă între ele prin nouă modificări punctiforme, fapt explicabil prin distanța geografică dintre punctele de colectare a celor două populații, care în plus mai fac parte din două lanțuri muntoase cu o structură geologică și cu o istorie glaciară diferite.

#### **5.15. Concluzii la specia *Primula intricata***

Rezultatele tuturor metodelor abordate și analizelor efectuate sunt convergente și susțin separarea *P. intricata* de grupul *P. elatior*.

Pe baza rezultatelor, studiul prezent consideră că este necesară acordarea statutului de specie independentă fără legături de subordonare taxonomică față de *P. elatior*, speciei *P. intricata*.

## Bibliografie selectivă

1. Ball, P. W., Riedhl, H., 1972. *Onosma*. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A., (edit.), Flora Europaea, III. University Press, Cambridge.
2. Beldie, A., 1967. Flora și vegetația Munților Bucegi. Ed. Academiei Republicii Socialiste România, București.
3. Beldie, A., 1979. Flora României. Determinator ilustrat al plantelor vasculare II. Ed. Academiei Republicii Socialiste România, București.
4. Borza, A., 1947. Conspectus florae Romaniae. Regionumque affinum. Tipografia "Cartea Românească", Cluj.
5. Chater, A. O., 1972. *Eritrichium*. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A., (edit.), Flora Europaea, III. University Press, Cambridge.
6. Ciocârlan, V., 2000. Flora ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta. Ed. Ceres, București.
7. Ciocârlan, V., 2009. Flora ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta. Ed. Ceres, București.
8. Cohen, J. I., Davis, J. I., 2009. Nomenclatural changes in *Lithospermum* (Boraginaceae) and related taxa following a reassessment of phylogenetic relationships. *Brittonia*, **61**:101-111.
9. Comes, H. P., Kadereit, J. W., 2003. Spatial and temporal patterns in the evolution of the flora of the European Alpine System. *Taxon*, **52**:451-462.
10. Demesure, B., Sodzi, N., Petit, R. J., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**:129-131.
11. Dihoru, G., Negrean, G., 2009. Cartea roșie a plantelor vasculare din România. Ed. Academiei Române, București.
12. Doyle, J. J., Doyle, J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**:11-15.
13. Doyle, J. J., Doyle, J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**:13-15.
14. Ehrich, D., 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, **6**:603-604.
15. Eidesen, P. B., Alsos, I. G., Popp, M., Stensrud, Ø., Suda, J., Brochmann C., 2007. Nuclear vs. plastid data: complex Pleistocene history of a circumpolar key species. *Molecular Ecology*, **16**:3902-3925.
16. Excoffier, L., Lischer, H. E. L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**:564-567.
17. Freeland, J. R., 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
18. Grenier, J. C. M., Godron, D. A., 1853. Flore de France, ou Description des Plantes qui Croissent Naturellement en France et en Corse, J.B. Baillière, Paris.
19. Grințescu, I., 1960. *Eritrichium*. In: Săvulescu, T., (edit.), Flora Republicii Populare Române, VII. Ed. Academiei Republicii Populare Române, București.
20. Grințescu, I., Nyárády, E. I., 1960. *Onosma*. In: Săvulescu, T., (edit.), Flora Republicii Populare Române, VII. Ed. Academiei Republicii Populare Române, București.
21. Gușuleac, M., 1960. *Pulmonaria*. In: Săvulescu, T., (edit.), Flora Republicii Populare Române, VII. Ed. Academiei Republicii Populare Române, București.
22. Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposia Series*, **41**:95-98.
23. Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4**(1):9.
24. Huson, D. H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, **23**(2):254-267.
25. Jacquemyn, H., Honnay, O., Galbusera, P., Roldán-Ruiz, I., 2004. Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape. *Molecular Ecology*, **13**:211-219.
26. Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**:111-120.
27. Kolarčík, V., Zozomová-Lihová, J., Mártonfi, P., 2010. Systematics and evolutionary history of the *Asterotricha* group of the genus *Onosma* (Boraginaceae) in central and southern Europe inferred from AFLP and nrDNA ITS data. *Plant Systematics and Evolution*, **290**:21-45.
28. Lüdi, W., 1927. Fam. Primulaceae, In: Hegi, G., (edit.), The Illustrate flora of Central Europe (in German), **5**(3). Carl Hanser, München.

29. Mansion, G., Selvi, F., Guggisberg, A., Conti, E., 2009. Origin of Mediterranean insular endemics in Boraginales: integrative evidence from molecular dating and ancestral area reconstruction. *Journal of Biogeography*, **36**:1282-1296.
30. Mengoni, A., Gonelli, C., Galardi, F., Gabbrielli, R., Bazzicalupo, M., 2000. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, **9**:1319-1324.
31. Nei, M., 1975. *Molecular population genetics and evolution*. North-Holland, Amsterdam.
32. Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
33. Nei, M., Li, W. H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **76**:5269-5273.
34. Nyárády, E. I., Guşuleac, M., 1960. *Primula*. In: Săvulescu, T., (edit.), *Flora Republicii Populare Române*, VII. Ed. Academiei Republicii Populare Române, Bucureşti.
35. Pax, F., Knuth, R., 1889. *Primulaceae*. In: Engler, A., (edit.), *The Plant Kingdom (in German)*, Regni vegetabilis conspectus, 10. W. Engelmann, Leipzig.
36. Rauschert, S., 1976. Zur Nomenklatur und Chorologie des Formenkreises von *Onosma pseudoarenarium* Schur s. lat. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, **11**:269-279.
37. Savolainen, V., Chase, M. W., 2003. A decade of progress in plant molecular phylogenetics. *Trends in Genetics*, **19**(12):717-724.
38. Sârbu, I., Ivănescu L., Ştefan N., Mânzu C., 2001. *Flora ilustrată a plantelor vasculare din estul României - determinant*. Vol. II. Ed. Universităţii "Alexandru Ioan Cuza", Iaşi.
39. Selvi, F., Cecchi, L., Coppi, A., 2009. Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Cerinth* L. (Boraginaceae). *Taxon*, **58**:1307-1325.
40. Şuteu, D., Puşcaş, M., Băcilă, I., Coste, A., Filipaş, L., Stoica, I. A., Hurdu, B. I., Ursu, T., Coldea, G., 2011. Does *Primula intricata* Gren. et Godr. Merit Species Rank? A Taxonomic Revision Based on nrDNA, cpDNA and AFLP Data. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **39**(1):24-29.
41. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**:1596-1599.
42. Täuber, F., 1982. Făgetele din Podişul Lipovei, în: Făgete carpatine. Semnificaţia lor bioistorică şi ecoprotectivă: Lucrările simpozionului din 30-31 mai 1979. Ed. Academiei Republicii Socialiste România, 198-205.
43. Teppner, H., 1971. Cytosystematik, bimodale Chromosomensätze und permanente Anorthoploidie bei *Onosma* (Boraginaceae). *Österreichische Botanische Zeitschrift*, **119**:196-233.
44. Teppner, H., 1996. Die *Onosma* – Arten (Boraginaceae – Lithospermeae) Rumäniens in Beiträge zur naturwissenschaftlichen Erforschung siebenbürgens VI.
45. Valentine, D. H., Kress, A., 1972. *Primula* L. In: Tutin, T. G., Heywood V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A., (edit.), *Flora Europaea*, III. University Press, Cambridge.
46. Weigend, M., Gottschling, M., Selvi, F., Hilger, H. H., 2009. Marbleseeds are gromwells—Systematics and evolution of *Lithospermum* and allies (Boraginaceae tribe Lithospermeae) based on molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**:755-768.
47. Weising, K., Gardner, R. C., 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in the chloroplast genomes of dicotyledonous plants. *Genome*, **42**:9-19.
48. Woodell, S. R. J., 1969. Natural hybridization in Britain between *Primula vulgaris* Huds (the primrose) and *P. elatior* (L.) Hill (the oxlip). *Watsonia*, **7**:115-127.
49. Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**:97-126.
50. Wright Smith, W., Fletcher, H. R., 1946. The genus *Primula*: Section Vernaes Pax. *Transactions and proceedings of the Botanical society of Edinburgh*, **34**:432-458.
51. Young, A., Boyle, T., Brown, T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**:413-418.

## Cuprinsul tezei de doctorat

|   |          |
|---|----------|
| LISTĂ DE ABREVIERI  | Pag. 1   |
| INTRODUCERE   | Pag. 3   |
| <b>CONSIDERAȚII TEORETICE</b>   | Pag. 5   |
| <b>Capitolul 1.</b> Filogenia și analizele filogenetice   | Pag. 6   |
| 1.1. Considerații generale asupra filogeniei  | Pag. 6   |
| 1.2. Etapele analizei datelor filogenetice  | Pag. 11  |
| <b>Capitolul 2.</b> Markerii moleculari utilizați în filogenia și taxonomia plantelor   | Pag. 17  |
| 2.1. Modul de moștenire a genomului nuclear la plante   | Pag. 18  |
| 2.2. Organizarea și modul de moștenire a genomului mitocondrial la plante   | Pag. 19  |
| 2.3. Organizarea și modul de moștenire a genomului plastidial la plante   | Pag. 19  |
| 2.4. Principalele categorii de markerii moleculari utilizate la plante  | Pag. 21  |
| 2.5. Metode de detecție a markerilor moleculari ADN   | Pag. 33  |
| <b>Capitolul 3.</b> Caracterizarea din punct de vedere taxonomic, morfologic, ecologic și al variabilității fenotipice a plantelor studiate                   | Pag. 39  |
| 3.1. Caracterizarea generală a familiei Boraginaceae  | Pag. 39  |
| 3.1.1. <i>Pulmonaria rubra</i> vs. <i>Pulmonaria filarszkyana</i>   | Pag. 41  |
| 3.1.2. <i>Onosma arenaria</i> vs. <i>Onosma pseudoarenaria</i>  | Pag. 45  |
| 3.1.3. <i>Eritrichium nanum</i> vs. <i>Eritrichium jankae</i>   | Pag. 49  |
| 3.2. Caracterizarea generală a familiei Primulaceae   | Pag. 52  |
| 3.2.1. <i>Primula elatior</i> vs. <i>Primula leucophylla</i> vs. <i>Primula intricata</i>   | Pag. 54  |
| <b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>  | Pag. 61  |
| <b>OBIECTIVELE PREZENTULUI STUDIU</b>   | Pag. 62  |
| <b>Capitolul 4.</b> Materiale și metode   | Pag. 63  |
| 4.1. Strategia de recoltare a materialului biologic   | Pag. 63  |
| 4.2. Extracția ADN-ului   | Pag. 73  |
| 4.3. Verificarea și cuantificarea acizilor nucleici prin electroforeză  | Pag. 78  |
| 4.3.1. Electroforeza în gel de agaroză  | Pag. 78  |
| 4.3.2. Electroforeza în gel de poliacrilamidă   | Pag. 79  |
| 4.4. Analiza microsateliților cloroplastici   | Pag. 82  |
| 4.5. Tehnica PCR-RFLP   | Pag. 84  |
| 4.6. Tehnica AFLP   | Pag. 85  |
| 4.7. Secvențierea   | Pag. 91  |
| 4.8. Analiza datelor  | Pag. 96  |
| <b>Capitolul 5.</b> Rezultate și discuții   | Pag. 99  |
| 5.1. Rezultate și discuții la genul <i>Pulmonaria</i>   | Pag. 99  |
| 5.1.1. Rezultate referitoare la analiza microsateliților cloroplastici  | Pag. 99  |
| 5.1.2. Rezultate referitoare la analiza PCR-RFLP  | Pag. 99  |
| 5.1.3. Rezultate referitoare la analiza secvențierii  | Pag. 99  |
| 5.1.4. Discuții: Identificarea unor markerii moleculari “barcode” capabili să diferențieze speciile <i>Pulmonaria rubra</i> și <i>Pulmonaria filarszkyana</i> | Pag. 108 |
| 5.1.5. Discuții: Investigarea relațiilor filogenetice dintre <i>Pulmonaria rubra</i> și <i>Pulmonaria filarszkyana</i>  | Pag. 110 |

|   |          |
|---|----------|
| 5.1.6. Concluzii parțiale referitoare la genul <i>Pulmonaria</i>  | Pag. 111 |
| 5.2. Rezultate și discuții la genul <i>Onosma</i>   | Pag. 112 |
| 5.2.1. Rezultate referitoare la analiza microsateliților cloroplastici  | Pag. 112 |
| 5.2.2. Rezultate referitoare la analiza PCR-RFLP  | Pag. 112 |
| 5.2.3. Rezultate referitoare la analiza secvențierii  | Pag. 113 |
| 5.2.4. Rezultate referitoare la analiza AFLP  | Pag. 127 |
| 5.2.5. Discuții: Investigarea relațiilor filogenetice dintre <i>Onosma arenaria</i> și <i>Onosma pseudoarenaria</i>                                       | Pag. 132 |
| 5.2.6. Discuții: Estimarea diversității genetice a populațiilor de <i>Onosma arenaria</i> și <i>Onosma pseudoarenaria</i> din România                     | Pag. 136 |
| 5.2.7. Concluzii parțiale referitoare la genul <i>Onosma</i>  | Pag. 137 |
| 5.3. Rezultate și discuții referitoare la genul <i>Eritrichium</i>  | Pag. 138 |
| 5.3.1. Rezultate referitoare la analiza secvențierii  | Pag. 138 |
| 5.3.2. Rezultate referitoare la analiza AFLP  | Pag. 151 |
| 5.3.3. Discuții: Investigarea relațiilor filogenetice dintre <i>Eritrichium nanum</i> și <i>Eritrichium jankae</i>  | Pag. 155 |
| 5.3.4. Concluzii parțiale referitoare la genul <i>Eritrichium</i>   | Pag. 160 |
| 5.4. Rezultate și discuții referitoare la genul <i>Primula</i>  | Pag. 161 |
| 5.4.1. Rezultate și discuții referitoare la specia <i>Primula leucophylla</i>   | Pag. 161 |
| 5.4.1.1. Rezultate referitoare la analiza secvențierii  | Pag. 161 |
| 5.4.1.2. Rezultate referitoare la analiza AFLP  | Pag. 169 |
| 5.4.1.3. Discuții: Identificarea unor markeri moleculari “barcode” capabili să diferențieze speciile <i>Primula elatior</i> și <i>Primula leucophylla</i> | Pag. 174 |
| 5.4.1.4. Discuții: Investigarea relațiilor filogenetice dintre <i>Primula elatior</i> și <i>Primula leucophylla</i>                                       | Pag. 176 |
| 5.4.1.5. Discuții: Redefinirea arealului speciei <i>Primula leucophylla</i> pe baza analizelor moleculare   | Pag. 180 |
| 5.4.1.6. Concluzii parțiale referitoare la specia <i>Primula leucophylla</i>  | Pag. 181 |
| 5.4.2. Rezultate și discuții referitoare la specia <i>Primula intricata</i>   | Pag. 181 |
| 5.4.2.1. Rezultate referitoare la analiza secvențierii  | Pag. 182 |
| 5.4.2.2. Rezultate referitoare la analiza AFLP  | Pag. 187 |
| 5.4.2.3. Discuții: Investigarea relațiilor filogenetice dintre <i>Primula elatior</i> și <i>Primula intricata</i>   | Pag. 191 |
| 5.4.2.4. Concluzii parțiale referitoare la specia <i>Primula intricata</i>  | Pag. 193 |
| 5.5. Concluzii finale   | Pag. 194 |
| BIBLIOGRAFIE  | Pag. 196 |
| ANEXE   | Pag. 226 |

## Cuvinte cheie

*Pulmonaria*, *Onosma*, *Eritrichium*, *Primula*, plante endemice, plante rare, markeri moleculari, taxonomie moleculară, AFLP, ADNnr, ADNcp.