

RST - Raport științific privind implementarea proiectului „**REASONING - Reziliența la secetă și valoarea ecologică a plantațiilor de duglas, molid și brad având în vedere schimbările climatice**” (cod: PN-III-P1-1.1-TE- 2019-1099; Contract de Finanțare pentru Execuție Proiecte NR. TE 75/2020) în perioada 15/09/2020 - 31/12/2020

I. REZUMATUL ETAPEI I:

OBIECTIVELE SPECIFICE ALE PRIMEI ETAPE: întocmirea a două baze de date ce vor cuprinde date anuale de creștere și date genetice pentru fiecare dintre cele trei specii de conifere studiate (duglas, molid și brad)

ACTIVITĂȚI REALIZATE ÎN CADRULUI ETAPEI I:

Etapa I: Studii dendroecologice și genetice în păduri mixte de duglas, molid și brad

Activitate 1.1: Selectarea de păduri mixte de duglas, molid și brad în SW-ul României.

Activitate 1.1.1: Selecția pădurilor mixte de duglas, molid și brad se va face în baza informațiilor extrase din Planurile Locale de Management. În acest sens, ocoalele silvice Ana Lugojana (Timiș), Rusca Montană (Caraș-Severin) și Oțelu Roșu (Caraș-Severin) au fost contactate în prealabil și s-a stabilit o colaborare cu ele.

Activitate 1.2: Deplasare în teren pentru prelevarea de probe.

Activitate 1.2.1: Se vor preleva carote (pentru măsurarea inelelor anuale de creștere) și frunze / cambiu (pentru extragerea de ADN) din 225 de arbori (duglas, molid și brad). Realizarea acestei activități depinde de restricțiile, în ceea ce privește deplasările, ce ar putea apărea pe fondul situației determinate de virusul COVID-19, astfel încât sănătatea membrilor echipei de lucru să nu fie expusă. Astfel, în cazul în care această deplasare în teren nu se va putea realiza în Etapa I, ea se va realiza în Etapa II (primăvara anului 2021).

Activitate 1.3: Prelucrarea probelor prelevate în teren.

Activitate 1.3.1: Măsurarea inelelor anuale de creștere (pe carote) și extragerea de ADN (din frunze / cambiu). Aceste activități de laborator vor fi realizate urmând protocoale și programe specifice din domeniul dendrocronologiei și cel al geneticii. Datorită volumului mare de lucru și dat fiind faptul că aceste activități sunt extrem de minuțioase, necesitând multa precizie și deci timp, ele vor fi continuate în Etapa II a proiectului. Activitatea 1.3.1 depinde de realizarea activității 1.2: Deplasare în teren pentru prelevarea de probe. Începerea întocmirii celor două baze de date: creștere și genetică.

II. DESCRIEREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI TEHNICĂ, CU PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A REZULTATELOR ETAPEI I ȘI GRADUL DE REALIZARE A OBIECTIVELOR:

Toate activitățile propuse pentru Etapa I a proiectului REASONING (a se vedea mai sus) au fost realizate cu succes, în conformitate cu planul de implementare.

Proiectul REASONING a început în septembrie 2020 (mai exact pe 15/09/2020). La începutul lunii octombrie 2020, campania de teren era deja organizată și s-a putut realiza cu precauții, având în vedere situația COVID-19 din România la acel moment.

Activitățile 1.1 și 1.1.1: după ce am studiat cu atenție Planurile Locale de Management ale Ocoalelor Silvice Ana Lugojana (Timiș), Rusca Montană (Caraș-Severin) și Oțelu Roșu (Caraș-Severin), am selectat trei plantații mixte de duglas, molid și brad, toate situate în sud-vestul României. Am preferat să lucrăm în această zonă din România, deoarece aici clima are o influență sub-mediteraneană, iar scopul proiectului REASONING este de a studia, printre altele, performanțele celor trei specii de conifere atunci când trebuie să facă față fenomenelor de secetă severă, având în vedere proveniența și diversitatea lor genetică. Cele trei plantații mixte de duglas, molid și brad au fost denumite Ana Lugojana, Rusca Montană și Oțelu Roșu, pentru a fi ușor de identificat, și sunt toate situate pe versanți cu expunere nordică.

Activitățile 1.2 și 1.2.1: deplasarea în teren a avut loc la începutul lunii octombrie 2020. Prelevarea de mostre a constat în extragerea de carote și colectarea de frunze / cambiu, necesare analizelor dendrocronologice și genetice propuse. La fiecare dintre cele trei plantații

mixte, un număr de 75 de arbori maturi au fost selectați și eșantionați aleatoriu: 25 duglași, 25 molizi și 25 brazi. Toți arborii selectați (75 de arbori x 3 plantații mixte = 225 de arbori) sunt dominanți și cu un diametru similar la înălțimea pieptului (DBH), pentru a evita introducerea de “zgomot” nedorit în analize. S-au prelevat probe doar din arbori vii, sănătoși, care nu prezentau semne de atac biotic (ex. insecte, putregai) și nici de răni provocate de doborâturi de vânt sau zăpadă. În cadrul fiecărei plantații, toți arborii eșantionați sunt situați pe același versant, astfel încât condițiile la nivel micro să nu varieze prea mult între ei. În timpul deplasării în teren, nu s-au observat evenimente de mortalitate în rândul speciilor studiate la niciuna dintre cele trei plantații mixte de duglas, molid și brad.

Din fiecare arbore selecționat (adică un total de 225 arbori), s-au extras două carote. Extragerea carotelor s-a făcut la înălțime standard (1,3 m deasupra solului) și perpendicular cu pantă pentru a evita posibilele zone de lemn comprimat. Carotele au fost extrase folosind burghie (diametru 5 mm; Haglöf, Suedia). Aceste mostre vor fi folosite pentru realizarea **primului obiectiv specific al proiectului REASONING**: studierea creșterilor istorice (adică, inelele anuale ale arborilor) ale celor trei specii de conifere (duglas, molid și brad), în trei plantații mixte din SV României: Ana Lugojana, Rusca Montană și Oțelu Roșu.

Din exact aceiași 225 arbori selecționați, s-au prelevat și mostre de frunze / cambiu. Acest lucru s-a făcut fie folosind o foarfecă telescopică, necesară pentru a ajunge la frunzele situate sus în coroană, fie folosind un cilindru metalic foarte rezistent, necesar pentru extragerea cambului. Aceste mostre vor fi folosite pentru realizarea celui **de-al doilea obiectiv specific al proiectului REASONING**: studierea geneticii celor trei specii de conifere (duglas, molid și brad), în trei plantații mixte din SV României: Ana Lugojana, Rusca Montană și Oțelu Roșu.

Activitățile 1.3 și 1.3.1: după încheierea campaniei de teren, am început să procesăm mostrele colectate (carote, frunze / cambiu). Carotele au fost uscate, lipite pe suporturi speciale de lemn și șlefuite cu hârtie abrazivă de diferite granulații până când toate limitele inelelor au devenit clar vizibile. Carotele au fost apoi scanate la 1200 dpi (Epson Expression 11000XL) și s-a început măsurarea (precizie de 0,01 mm) lor folosind software-ul CooRecorder (Cybis Elektronik & Data, Saltsjöbaden, Suedia). Măsurarea inelelor anuale ale arborilor este o activitate extrem de minuțioasă ce necesita foarte mult timp. Astfel, această activitate va fi continuată și în Etapa II (2021) a proiectului. Rezultatul final va fi o bază de date de creșteri anuale ce va fi utilizată pentru a efectua analize dendrocronologice și dendroecologice în vederea comparării modului în care cresc cele trei specii de conifere studiate (performanța lor) și evaluării modului în care rezistă / tolerează / sunt reziliente la evenimente de secetă severă la care au fost expuse în trecut (inelele anuale înregistrează cu exactitudine condițiile climatice la care sunt expuși arborii de-a lungul vieții lor). Toate aceste analize ne-ar putea ajuta să înțelegem cum au crescut de-a lungul timpului aceste specii de conifere, având în vedere faptul că toate au fost expuse unor condiții de mediu asemănătoare. În plus, aceste analize ne vor permite să facem estimări cu privire la modul în care aceste specii vor răspunde în viitor la evenimente de secete severe, având în vedere diferitele strategii pe care le-au folosit în trecut pentru a face față unor astfel de evenimente neprielnice.

Mostrele de frunze / cambiu au fost folosite pentru extragerea ADN-ului. Pentru aceasta, mai întâi s-au introdus 60-70 mg de țesut biologic (adică frunze / cambiu) împreună cu 2 bile de wolfram într-un cilindru de 2 ml și s-au măcinat (30 Hz) timp de 2-3 minute folosind moara Tissue Lyser Roche MM400. Extracția ADN-ului a fost apoi efectuată urmând protocolul CTAB [19, 20], protocol ce presupune extragerea ADN-ului în mai pași. Primul pas: pentru ruperea membranelor celulare s-au adăugat 1000 μl 2 x CTAB Extraction Buffer (substanță ce conține CTAB, PVP și β-mercaptoethanol) și 10-15 μl Proteinase K, după care tuburile astfel pregătite s-au introdus într-un Thermomixer pentru 30 de minute la o temperatură de 65°C și 550 rotații / minut. Al doilea pas: s-au adăugat 200 μl de Wet Chlorophorm, pentru a separa și denatura unele proteine existente, 600 μl Izopropanol (-20

°C) și 1000 μl de Wash Buffer (50 μl acetat de amoniu + 40 ml etanol 76% + 10 ml H₂O) pentru eliminare unor reziduri de CTAB și purificarea ADN-ului extras. La final, peste produsul rezultat s-au adăugat 50 μl Elution Buffer. După extracția ADN-ului, calitatea și concentrația acestuia au fost testate cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop 8000. Pentru aceasta, s-a utilizat un volum de 1 μl de ADN din soluția stoc. Concentrațiile au fost destul de mari însă calitatea ADN-ului, apreciată în funcție de raportul 260/280 la care valorile optime sunt cuprinse în intervalul 1.8-2.0, a fost uneori destul de slabă datorită conținutului mare de impurități. Ulterior, în funcție de cantitatea și calitatea ADN-ului s-au efectuat diluții de 1:10 - 1:30, pentru a obține o concentrație de aproximativ 20 – 30 ng/μl. Rezultatul final va fi o bază de date genetice care va fi utilizată pentru a identifica originea geografică a semințelor care au fost folosite pentru plantarea duglasului, molidului și bradului în cele trei plantații mixte din SV-ul României. Analizele genetice propuse pentru proiectul REASONING ne-ar permite, de asemenea, să evaluăm și diversitatea genetică a celor trei plantații mixte selectate, informații care ne-ar permite totodată să înțelegem mai bine adaptarea locală și soarta acestor plantații de conifere având în vedere schimbările climatice.

III. MANAGEMENTUL PROIECTULUI REASONING:

În 2020, a fost necesară achiziționarea de diferite materiale pentru a efectua analizele dendrocronologice și genetice. Astfel, s-au achiziționat un șlefuitor electric cu vibrații și accesorii (câști antifoane, menghine), toate necesare șlefuirii carotelor eșantionate. Pentru extracțiile ADN și analizele genetice, s-au achiziționat diferite kit-uri de laborator (de exemplu, markeri genetici, tuburi Eppendor, microplăci, vârfuri de pipete, etc.). Totodată, echipa de lucru a proiectului a necesitat achiziționarea de tonere de imprimantă pentru a-și putea desfășura în mod corespunzător activitatea de laborator și birou.

IV. CONCLUZIILE ETAPEI I ALE PROIECTULUI REASONING:

Toate activitățile (1.1, 1.1.1, 1.2, 1.2.1, 1.3 și 1.3.1) propuse pentru Etapă I a proiectului REASONING au fost finalizate cu succes în cursul anului 2020, conform planului de lucru. Principalele rezultate ale acestei prime etape vor fi două baze de date (dendrocronologice și genetice) care vor sta la baza analizelor ulterioare ce se vor face în vederea studierii plantațiilor mixte de duglas, molid și brad eșantionați în sud-vestul României.

V. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE ALE DIRECTORULUI DE PROIECT PE PARCURSUL ETAPEI I A PROIECTULUI REASONING:

De la începutul proiectului REASONING, directorul de proiect Ana-Maria Hereș a publicat un articol ISI: Gazol A., **Hereș A.-M.**, Curiel Yuste J., Land-use practices (coppices and dehesas) and management intensity modulate responses of Holm oak growth to drought. *Agricultural and Forest Meteorology*, *in press*, <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108235>

Acest articol reprezintă rezultatul colaborării sale cu instituții internaționale. Deoarece, pe parcursul lucrului la acest articol directorul de proiect Ana-Maria Hereș a fost sprijinită financiar de proiectul REASONING, proiectul (PN-III-P1-1.1-TE-2019-1099) este menționat în secțiunea Mulțumiri a articolului publicat.

Brașov, 24.11.2020

director proiect,
dr. Ana-Maria Hereș