

RAPORT FINAL (15/09/2020 - 14/09/2022)

I. OBIECTIVE PREVĂZUTE ȘI REALIZATE:

Principalul obiectivul al proiectului REASONING a fost acela de a efectua studii ecologice și genetice în plantații mixte de duglas (specie alogenă în Europa), molid (specie nativă din zonele reci și muntoase ale Europei) și brad (specie nativă în România) din România. Acest principal obiectiv s-a bazat pe faptul că, deși importanța economică a duglasului pare a fi foarte bine stabilită (i.e., cherestea), date importante precum performanța acestei specii în ceea ce privește creșterile și rezistența la fenomene severe de secetă, marcate de schimbările climatice, lipsesc din literatura de specialitate. Totodată, deși există mai multe studii care compară plantații de duglas și molid, există foarte puține date care compară plantații de duglas și brad, deși bradul este originar din Europa, este o specie comună în Europa Centrală și de Est, are nevoie de condiții climatice foarte asemănătoare cu cele ale duglasului și este și el apreciat pentru calitatea lemnului său [1, 2].

Tinând cont de obiectivul principal prevăzut în cadrul proiectului REASONING, trei plantații mixte de duglas, molid și brad au fost identificate (**Act. 1.1 și 1.1.1 din Etapa I a Planului de Implementare**) și eșantionate în SV României: Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu (**Fig. 1**; Ocoalele Silvice Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu). Toate aceste trei plantații sunt situate în Munții Poiana Ruscă.

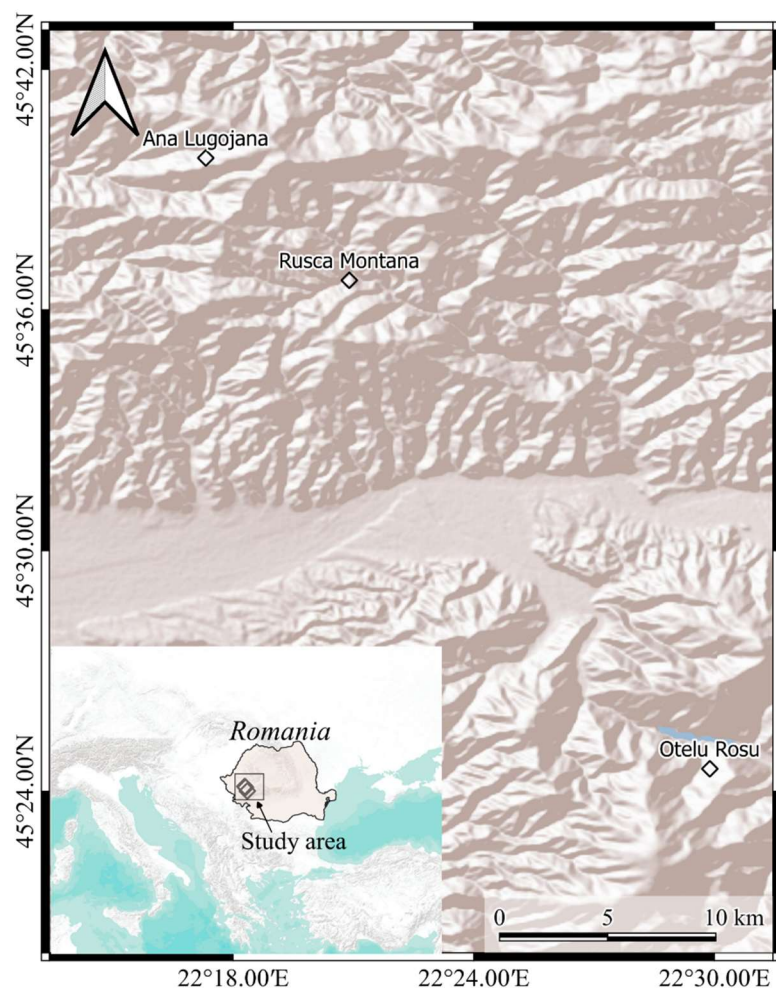


Fig. 1 Locația celor trei zone de studiu (Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu) în SV României (Munții Poiana Ruscă).

În continuare, în cele trei plantații mixte de duglas, molid și brad s-au efectuat studii care să ducă la realizarea **obiectivelor specifice** propuse în cadrul proiectului REASONING:

(1) **Studii privind ratele istorice de creștere (i.e., pe baza inelelor anuale de creștere)** ale duglasului, molidului și bradului din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu. Pentru realizarea acestui obiectiv prevăzut în proiectul REASONING, membrii echipei de cercetare s-au deplasat în teren (**Act. 1.2 din Etapa I a Planului de Implementare**). În cadrul acestei campanii de teren care s-a desfășurat în 2020, a fost urmată schema de eșantionare prezentată în propunerea inițială de proiect. Astfel, la fiecare dintre cele trei zone de studiu, au fost selectați aleatoriu și eșantionați 25 de arbori adulți pentru fiecare dintre cele trei specii de conifere plantate (**Actul 1.2.1 din Etapa I a planului de implementare**). Eșantionarea a constat în extragerea din fiecare arbore a câte două carote folosind burghie cu diametrul interior de 5 mm (Haglöf, Suedia). În total, 450 de carote au fost extrase manual din 225 de arbori (adică, 25 de arbori x 3 specii x 3 zone de studiu; **Tabelul 1**). În plus, toți arborii eșantionați s-au măsurat (diametru, DBH; înălțime)

și s-au geolocalizat (**Tabelul 1**). După terminarea campaniei de teren, carotele extrase au fost pregătite folosind proceduri dendrocronologice standard. Ulterior, aceste carote au fost folosite pentru a măsura (precizie 0.01 mm) inelele anuale de creștere ale arborilor eșantionați. În acest scop, s-a folosit software-ul CDendro și CooRecorder (Cybis Elektronik & Data, Saltsjöbaden, Suedia; **Act. 1.3 și 1.3.1 din Etapa I a Planului de Implementare; Act. 2.1 și 2.1.1 din Etapa II a Planului de Implementare**). Acuratețea statistică a procesului de crosdatare (i.e., potențiale erori de datare; calitatea măsurătorilor inelelor anuale) a fost verificată în mod repetat utilizând programul COFECHA [3]. În total, 215 arbori (74 duglas, 70 molid și 71 brad; **Tabelul 1**) au fost crosdatați cu acuratețe și incluși în **baza finală de date anuale de creștere**. Această bază de date a fost utilizată în continuare pentru a efectua analize dendrocronologice și dendroecologice (**Act. 2.3 și 2.3.1 din Etapa II a Planului de Implementare**). În mod concret, această bază de date s-a utilizat pentru a compara creșterile anuale ale celor trei specii studiate (i.e., performanța) și pentru a le evalua rezistența/toleranța/reziliența la evenimentele severe de secetă la care au fost expuși de-a lungul vieții lor (i.e., inelele anuale de creștere înregistrează cu fidelitate condițiile climatice la care arborii sunt expuși de-a lungul vieții lor). Pentru a realiza acest lucru, pe lângă baza de date anuale de creștere, s-au obținut, prelucrat și utilizat și date privind Indicele Standardizat de Precipitație-Evapotranspirație (SPEI) [4, 5].

Rezultatele obținute pentru obiectivul (1) al proiectului REASONING sunt descrise în detaliu în secțiunea II. REZULTATE ȘI INDICATORI de mai jos și vor fi publicate într-o revistă de specialitate: Petrea Ș., Petritan I.C., Gazol A., Curiel Yuste J., Hereș A.-M., *in prep.* (Act. 3.2 și 3.2.1 din Etapa III a Planului de Implementare**).**

(2). **Studii privind genetica** duglasului, molidului și bradului din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu. Pentru realizarea acestui obiectiv prevăzut în proiectul REASONING, în cadrul campaniei de teren desfășurate în anul 2020 (**Actul 1.2 din Etapa I a Planului de Implementare**), s-au prelevat și acicule și probe de cambiu de la exact aceiași 225 de arbori (duglas, molid și brad; **Act. 1.2.1 din Etapa I a Planului de Implementare**). Și în acest caz, a fost urmată schema de eșantionare prezentată în propunerea inițială de proiect. Prelevarea probelor genetice a fost efectuată fie folosind o foarfecă telescopică, necesară pentru a ajunge la aciculele situate în partea de sus a coroanelor arborilor, fie un cilindru metalic foarte rezistent, necesar pentru extragerea cambiumului. După terminarea campaniei de teren, aciculele și probele de cambiu au fost utilizate pentru extragerea ADN-ului (**Act. 1.3 și 1.3.1 din Etapa I a Planului de Implementare; Act. 2.1 și 2.1.1 din Etapa II-a a Planului de Implementare**). Pentru aceasta, mai întâi s-au introdus 60-70 mg de țesut biologic (acicule / 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, protocol ce presupune extregerea ADN-ului în mai pași. Primul pas: pentru ruperea membranelor celulare s-au adăugat 1000 μ l 2 x CTAB Extraction Buffer (substanță ce conține CTAB, PVP și β -mercaptoethanol) și 10-15 μ l 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 μ l de Wet Chlorophorm, pentru a separa și denatura unele proteine existente, 600 μ l Izopropanol (-20 °C) și 1000 μ l de Wash Buffer (50 μ l 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 μ l 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 μ l 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/ μ l. **Baza de date genetice** obținută în urma acestor analize de laborator a fost utilizată în continuare pentru efectuarea de analize (**Act. 2.3 și 2.3.1 din Etapa a II-a a Planului de implementare**) cu scopul de a identifica originea geografică a semințelor care au fost folosite la plantarea duglasului, molidului și bradului. Totodată, această bază de date genetice s-a folosit și pentru a evalua diversitatea genetică a celor trei plantații mixte selectate în cadrul proiectului REASONING, astfel de informații permițându-ne să înțelegem mai bine adaptarea locală și viitorul acestor plantații de conifere având în vedere schimbările climatice. Datorită volumului uriaș de muncă privind baza de date genetice, momentan s-au prelucrat statistic doar probele de duglas. Probele de molid și brad sunt în prezent în curs de analiză statistică (*in prep.*).

Rezultatele obținute pentru obiectivul (2) al proiectului REASONING sunt descrise în detaliu în secțiunea II. REZULTATE ȘI INDICATORI de mai jos și vor fi publicate într-o revistă de specialitate: Curtu Al., Ciocîrlan E., Șofletea N., Petritan C., Petrea Ș., Hereș A.-M., Assessing genetic diversity and structure of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantations in Romania based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms, submitted to Annals of Forest Research (Act. 3.2 și 3.2.1 din Etapa III a Planului de Implementare).

(3). **Studii privind subarboretului și arbori competitori** ai duglasului, molidului și bradului din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu. Pentru realizarea acestui obiectiv prevăzut în proiectul REASONING, membrii echipei de cercetare au desfășurat o a doua campanie

de teren în anul 2021 (**Act. 2.2 și 2.2.1 din Etapa II a Planului de Implementare**). În cadrul acestei campanii de teren, toți cei 225 de arbori (duglas, molid și brad) din care s-au extras carote și au fost prelevate acicule și cambiu în 2020, au fost revizitați în zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu. Acești arbori au fost ușor de găsit datorită faptului că în cadrul campaniei de teren din 2020 au fost geolocalizați. Și în acest caz, a fost urmată schema de eșantionare prezentată în propunerea inițială de proiect. În acest sens, s-a urmat metodologia descrisă de Curiel Yuste et al. 2019 [6]: în jurul fiecăruia dintre cei 225 arbori (i.e., arbori de referință) s-a stabilit un cerc cu diametrul de 5 m, iar în acest cerc s-a efectuat un sondaj detaliat al subarboretului și arborilor competitori. Mai exact, toți puieții au fost numărați și identificați la nivel de specie. Totodată, toți arborii competitori dominanti au fost identificați la nivel de specie. Pentru aceștia din urmă, s-au măsurat diametrele (DBH) și distanțele la care sunt situați față de cei 225 arbori de referință. Datele privind subarboretul s-au utilizat în continuare pentru a estima capacitatea de regenerare a celor trei specii de conifere studiate (duglas, molid și brad) și a altor specii de arbori și arbuști. Datele privind arborii competitori s-au utilizat în continuare pentru a estima concurența pe care acești arbori competitori o exercită asupra celor 225 arbori (duglas, molid și brad) din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu (**Actul 3.1 și 3.1.1 din Etapa III a Planului de implementare**).

Rezultatele obținute pentru obiectivul (3) al proiectului REASONING sunt descrise în detaliu în secțiunea II. REZULTATE ȘI INDICATORI de mai jos și vor fi publicate într-o revistă de specialitate: Petrea Ș., Petritan I.C., Gazol A., Curiel Yuste J., Hereș A.-M., *in prep.* (Act. 3.2 și 3.2.1 din Etapa III a Planului de Implementare**).**

(4). **Evaluarea serviciilor ecosistemice** oferite de cele trei plantații de duglas, molid și brad în zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu. Pentru realizarea acestui obiectiv prevăzut în proiectul REASONING, s-a colaborat cu dr. Stefano Balbi și doctoranda sa Alba Márquez Torres. Ambii experți în modelizare lucrează în cadrul k.LAB (BC3 - Basque Center for Climate Change; Spania) și au folosit software-ul ARIES (ARTificial Intelligence for Ecosystem Services) pentru a efectua analizele privind serviciilor ecosistemice (**Act. 3.1 și 3.1.1 din Etapa a III-a a Planului de Implementare**). Această colaborare a fost stabilită și prezentată în propunerea originală de proiect unde dr. Stefano Balbi și doctoranda sa Alba Márquez Torres au fost incluși ca și colaboratori externi. Analizele privind serviciile ecosistemice, realizate de cei doi experți, s-au realizat pe baza datelor anuale de creștere, subarboret și arbori competitori (i.e., obținute în cadrul obiectivelor specifice (1) și (3) descrise anterior) și pe geolocalizarea celor 225 arbori (duglas, molid și brad) din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu.

Rezultatele obținute pentru obiectivul (4) al proiectului REASONING sunt descrise în detaliu în secțiunea II. REZULTATE ȘI INDICATORI de mai jos și vor fi publicate într-o revistă de specialitate (Act. 3.2 și 3.2.1 din Etapa III a Planului de Implementare).

II. REZULTATE ȘI INDICATORI:

Obiectivele prevăzute în cadrul proiectului REASONING au fost realizate conform propunerii inițiale de proiect și a planului de implementare.

Rezultatele proiectului REASONING sunt detaliate în continuare pe baza obiectivelor specifice prezentate în secțiunea I. OBIECTIVE PREVĂZUTE ȘI REALIZATE.

(1) Studii privind ratele istorice de creștere (i.e., pe baza inelelor anuale de creștere)

Baza de date privind creșterile anuale conținea date brute de lățime a inelelor (TRW, raw tree ring widths - conform denumirii lor în limba engleză). Pentru a obține o estimare mai fiabilă a creșterilor arborilor și pentru a elimina fluctuațiile de frecvență joasă determinate de creșterea mărimii tulpinii și a vârstei arborilor de-a lungul timpului, seriile TRW au fost transformate în *basal area increment* (BAI), folosind pachetul R dplR [7, 8]. Mai exact, pentru a obține BAI, a fost folosită funcția „bai.out”. Deoarece molizii din zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montan au avut serii mai scurte de BAI (i.e., începând cu 1980; **Tabelul 1**), s-a folosit o perioadă comună de studiu (i.e., 1980-2020) pentru a efectua analize statistice cu cele trei specii de conifere din cele trei zone de studiu. În aceste analize statistice, s-au folosit datele BAI și SPEI.

Tabelul 1. Principalele caracteristici ale speciilor duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Zona de studiu	Ana Lugojana			Otelu Rosu			Rusca Montana		
Specie	brad	duglas	molid	brad	duglas	molid	brad	duglas	molid
Nr. inițial de arbori	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Nr. final de arbori	23	25	24	24	24	22	24	25	24
Perioada	1966 - 2020	1979 - 2020	1980 - 2020	1972 - 2020	1971 - 2020	1974 - 2020	1975 - 2020	1975 - 2020	1980 - 2020
DBH (cm)	34.61	36.51	34.26	36.36	36.87	36.56	35.39	38.64	37.42
Înălțime (m)	24.02	26.74	25.68	27.28	30.53	29.82	26.98	29.59	27.27

Perioada, perioada de timp acoperită de arborii eșantionați; *DBH*, diametru la înălțimea pieptului; *Înălțime*, înălțimea arborilor.

Conform rezultatelor obținute, creșterile (i.e., performanța) arborilor (duglas, molid și brad) din zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montana au înregistrat tendințe pozitive (semnificative din punct de vedere statistic; **Fig. 2**). În schimb, în zona de studiu Otelu Rosu, creștile celor trei specii de conifere studiate au diferit între ele. În concret, bradul a înregistrat o tendință de creștere pozitivă (semnificativă din punct de vedere statistic), molidul a înregistrat o tendință de creștere negativă (semnificativă din punct de vedere statistic), în timp ce duglasul nu a înregistrat nicio tendință de creștere (**Fig. 2**). Per ansamblu, aceste rezultate arată că bradul, o specie nativă din România, are performanțe bune de creștere indiferent de zona de studiu. În schimb, deși în zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montana, duglasul și molidul par să crească bine, în zona de studiu Otelu Rosu creșterile lor pare a fi limitate. Posibili factori care stau la baza limitării creșterii lor trebuie investigați în continuare mai în detaliu, i.e., condițiile de sol sau microclima ar putea fi implicate, printre altele.

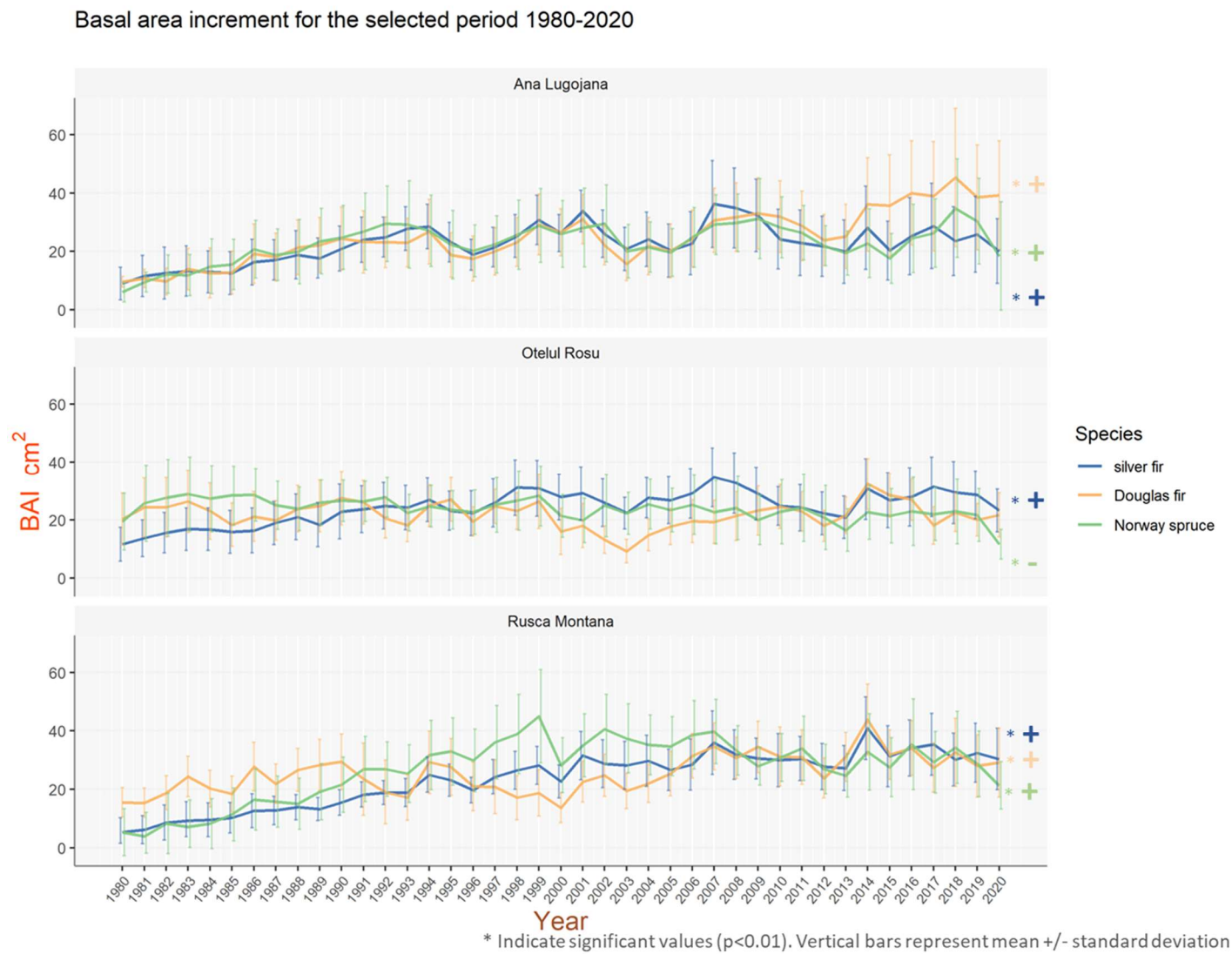


Fig. 2 Tendințe de creștere (BAI) pentru duglas, molid și brad în zonele de studiu Ana Lugoiana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Pentru a putea evalua modul în care arborii eşantionaţi (duglas, molid şi brad) din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana şi Otelu Rosu răspund la evenimente severe de secetă, s-au calculat indicii privind rezistenţa (capacitatea de a face faţă evenimentelor de secetă), recuperarea (capacitatea de a se recupera după evenimente de secetă), rezilienţă (capacitatea de a reveni la creşteri similare celor de dinainte de secetă) şi rezilienţă relativă (rezilienţa care ia în considerare daunele survenite în timpul evenimentelor de secetă) [9]. În primul rând, mai multe evenimente severe de secetă (i.e., 1983, 1994, 2000 şi 2011) au fost identificate între 1980 şi 2020, la cele trei zone de studiu, folosind Indicele Standardizat de Precipitaţie-Evapotranspiraţie (SPEI) [4, 5]. Apoi, pentru a efectua analize statistice, s-au fost luate în considerare trei ani de creşteri înainte şi trei ani de creşteri după aceste evenimente severe de secetă. Rezultatele analizelor statistice (i.e., *generalized least squares models followed by least-square means based on Tukey HSD tests* [10, 11]) efectuate cu aceste seturi de date au arătat că nu există diferenţe semnificative între speciile duglas, molid şi brad în ceea ce priveşte indicii de rezistenţă, recuperare, rezilienţă şi rezilienţă relativă (**Fig. 3**). Cu alte cuvinte, toate cele trei specii au răspuns foarte similar atunci când s-au confruntat cu evenimente severe de secetă, duglasul (alogen) neavând niciun avantaj în acest sens în comparaţie cu molidul şi bradul (nativi în Europa).

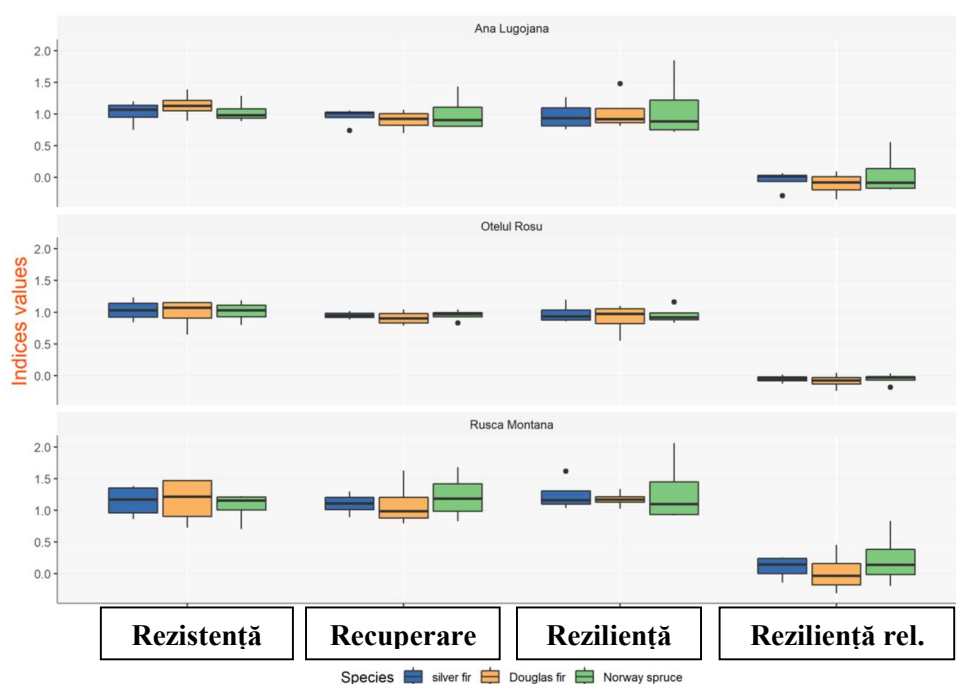


Fig. 3 Rezultatele analizei statistice *generalized least squares models followed by least-square means based on Tukey HSD tests* ce arată că nu sunt diferenţe semnificative în ceea ce priveşte indicii de rezistenţă, recuperare, rezilienţă şi rezilienţă relativă între speciile duglas, molid şi brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana şi Otelu Rosu

Indicatori:

Toate rezultatele prezentate în această secțiune au fost prezentate în cadrul a două conferințe internaționale – prezentări orale:

- **29 octombrie 2021**, Petrea Ș., Petritan I.C., Hereș A.-M., "Mixed silver fir, Douglas fir and Norway spruce plantations in the SW of Romania – growth and components of tree resilience to severe droughts". 5th Edition of the International Conference "Integrated Management of Environmental Resources"; Suceava, Romania; prezentare orală;
- **24-27 may 2022**, Petrea Ș., Petritan I.C., Gazol A., Curiel Yuste J., Hereș A.-M., "Drought resilience and stability of coexisting planted silver fir, Norway spruce and Douglas fir trees in the face of climate change". TRACE2022 "Tree-Rings in Archaeology, Climatology and Ecology"; Erlangen, Germany; prezentare orală.

În plus, rezultatele prezentate în această secțiune vor fi incluse într-un articol științific care se află în momentul de față în curs de pregătire: **Petrea Ș., Petritan I.C., Gazol A., Curiel Yuste J., Hereș A.-M., in prep.**

(2). Studii privind genetica

Baza de date genetice a fost împărțită luând în considerare cele trei specii de conifere studiate. În mod concret, actualmente, doar baza de date genetice a duglasului a fost tratată statistic cu scopul de a estima diversitatea genetică a acestei specii și de a identifica posibile cauze istorice care ar putea explica structura genetică și variația celor trei populații de duglas (Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu). Analizele datelor s-a făcut în baza a diferite abordări statistice (*UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean; DAPC, Discriminant Analysis of Principal Components; AMOVA, analysis of molecular variance and pairwise FST*) folosind software-uri specifice (*Micro-Checker [12]; GenAlEx v.6.51b2 [13]; Haplotype Analysis 1.05 [14]; Treeview [15]; ARLEQUIN [16]*). Adicional, metoda Median-Joining [17] și software-ul Qgis 3.22 au fost utilizate pentru a construi haplotipurile cpSSR ale duglașilor eșantionați și pentru a ilustra structura și distribuția lor genetică. În final, pentru a evalua structura genetică a celor trei populații de duglas, metoda de clustering Bayesian (Structure software v.2.3.4) [18] a fost utilizată. Valoarea K finală (clustere genetice potențiale) a fost evaluată pe baza probabilităților log ($\ln \Pr(X|k)$) și a metodei Δk [19] folosind STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 [18, 19, 20].

În ceea ce privește markerii nucleari SSR, rezultatele obținute au arătat că numărul mediu de alele per locus (N_a) a variat între 14.500 (Otelu Rosu) și 15.700 (Rusca Montana) (**Tabelul 2**). Diversitatea genetică a fost ridicată, în timp ce heterozigozitatea observată a variat între 0.724 (Otelu Rosu) și 0.806 (Rusca Montana) (**Tabelul 2**). În ceea ce privește coeficientul de consangvinizare, doar populația de duglas de la Otelu Rosu a prezentat o valoare > 0.1 . Per

ansamblu, rezultatele obținute sugerează diferențe minore între cele trei populații de duglas din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu (**Tabelul 2**). Aceste rezultate sunt coroborate și de analizele UPGMA, bazate pe distanța genetică Nei, și de analizele DAPC care, per ansamblu, nu au arătat nicio diferențiere între cele trei populații de duglas.

Tabelul 2. Variația indicilor de diversitate genetică, pe baza locilor de microsateliți nucleari, a populațiilor de duglas din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Zona de studiu	Ana Lugojana	Otelu Rosu	Rusca Montana
Specie	duglas	duglas	duglas
Na	15.200	14.500	15.700
He	0.870	0.880	0.876
Ho	0.777	0.724	0.806
F	0.096	0.168	0.077

Na, număr de alele; *He*, heterozigozitate așteptată; *Ho*, heterozigozitate observată; *F*, coeficientul de consangvinizare.

În ceea ce privește variația genetică, evaluată prin markeri cpSSR, rezultatele obținute au arătat că numărul de haplotipuri detectate pentru fiecare populație a variat între 3 (Ana Lugojana) și 5 (Otelu Rosu), numărul efectiv de haplotipuri a variat între 2.462 (Ana Lugojana) și 4.000 (Otelu Rosu), bogăția haplotipurilor a variat între 1.607 (Ana Lugojana) și 2.750 (Otelu Rosu), diversitatea haplotipului a variat între 0.679 (Ana Lugojana) și 0.857 (Otelu Rosu), în timp ce distanța genetică medie dintre arbori a variat între 0.655 (Ana Lugojana) și 12.179 (Rusca Montana) (**Tabelul 3**).

Tabelul 3. Variația haplotipului, pe baza locilor de microsateliți cloroplastici, a populațiilor de duglas din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Zona de studiu	Ana Lugojana	Otelu Rosu	Rusca Montana
Specie	duglas	duglas	duglas
A	3	5	4
Ne	2.462	4.000	2.909
Rh	1.607	2.750	2.143
He	0.679	0.857	0.750
D ² sh	0.655	1.750	12.179

A, numărul de haplotipuri detectate pentru fiecare populație; *Ne*, numărul efectiv de haplotipuri; *Rh*, bogăția de haplotipuri; *He*, diversitatea haplotipurilor; *D²sh*, distanța genetică medie dintre arbori.

Rezultatele obținute privind structura genetică a populațiilor, bazate pe metoda de clustering Bayesian (Structure software v.2.3.4) [18], au indicat valoarea 2 ca fiind cea mai probabilă pentru numărul K. În plus, rezultatele obținute pe baza analizelor de structură a markerilor nucleari SSR și a markerilor cpSSR (**Fig. 4**), au arătat o structură genetică nediferențiată în funcție de populații.

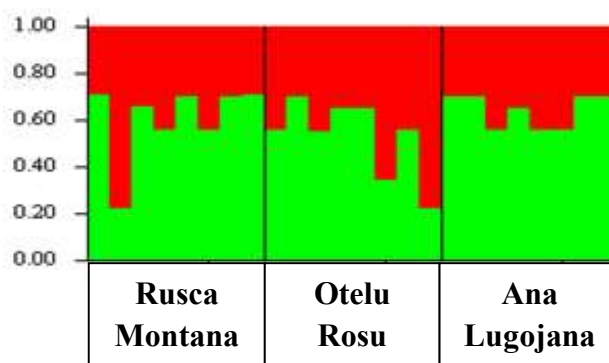


Fig. 4 Rezultatele analizelor de structură a markerilor cpSSR, estimate cu $K = 2$, pentru populațiile de douglas din zonele de studiu Ana Lugoiana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Indicatori:

Toate rezultatele prezentate în această secțiune vor fi incluse într-un articol științific care are în momentul de față statusul de transmis spre publicare într-o revistă de specialitate: **Curtu Al., Ciocîrlan E., Șofletea N., Petritan C., Petrea Ș., Hereș A.-M., Assessing genetic diversity and structure of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) plantations in Romania based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms, submitted to Annals of Forest Research.**

(3). Studii privind subarboretului și arbori competitori

Datele privind subarboretul și arborii competitori au fost utilizate pentru a calcula indicii de alfa-diversitate Shannon [21] și de competiție Hegyi [22], separat pentru fiecare dintre cei 225 de arbori de referință de douglas, molid și brad. Pentru a calcula indicele de alfa-diversitate Shannon, a fost utilizată funcția „diversity” disponibilă din pachetul R vegan [23]. Pentru a calcula indicele de competiție Hegyi, a fost utilizată funcția „pairwise” disponibilă din pachetul R Siplab [24]. Ambii indici (i.e., Shannon și Hegyi) au fost ulterior considerați ca fiind constanți în timp până în anul 2005. Pentru a lua această decizie, s-au consultat Amenajamentele Ocoalelor Silvice Ana Lugoiana, Rusca Montana și Otelu Rosu, unde sunt disponibile toate informațiile referitoare la aceste plantații. Conform acestor Amenajamente, în ultimii 15 ani (i.e., 2020-2005) nu s-au efectuat curățiri și nici rărituri în cadrul celor trei plantații. Pentru a confirma în continuare aceste informații, s-au efectuat analize statistice suplimentare (*segmented or broken-line models*) folosind datele TRW de-a lungul

timpului și utilizând funcția „segmented” disponibilă din pachetul R segmentat [25, 26] urmată de aplicarea testului Davies. Rezultatele acestor analize nu au arătat niciun punct de întrerupere semnificativ între 2005 și 2020. Aceste rezultate confirmă astfel informațiile disponibile din Amenajament. În caz contrar, ar fi fost găsite puncte de întrerupere semnificative, puncte ce ar fi fost determinate de reducerea competiției între arbori.

Pentru a vedea dacă, în cadrul fiecărei zone de studiu, există diferențe în ceea ce privește indicii de alfa-diversitate Shannon și de competiție Hegyi între duglas, molid și brad, s-au efectuat analize ANOVA (urmate de un *test post hoc Tukey's Honest Significant Difference (HSD)*) sau Kruskal-Wallis (urmate de un *pairwise Wilcoxon post hoc test with a Bonferroni correction*), în funcție de normalitatea datelor.

Rezultatele obținute au arătat că, în cadrul celor trei zone de studiu, nu există diferențe semnificative între duglas, molid și brad argintiu în ceea ce privește indicii de alfa-diversitate Shannon și de competiție Hegyi (**Tabelul 4; Fig. 5**). Cu alte cuvinte, toate cele trei specii prezintă o alfa-diversitate foarte asemănătoare (răsaduri cu DBH < 10 cm și înălțimea > 10 cm și toți arbuștii) și sunt expuse unei presiuni competitive asemănătoare din partea arborilor competitori. Analize ulterioare vor aprofunda totuși rezultatele obținute și vor investiga dacă există diferențe semnificative între cele trei zone de studiu și dacă indicele de competiție Hegyi ar putea explica, alături de alți factori, tendințele de creștere a celor trei specii de conifere studiate la Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu.

Tabelul 4. Indicele de alfa-diversitate Shannon

Zona de studiu	Ana Lugojana			Otelu Rosu			Rusca Montana		
Specie	brad	duglas	molid	brad	duglas	molid	brad	duglas	molid
Indicele de alfa-diversitate Shannon	0.75 ^a (0.34)	0.62 ^a (0.42)	0.65 ^a (0.44)	0.91 ^a (0.31)	0.99 ^a (0.38)	0.95 ^a (0.25)	0.62 ^a (0.27)	0.62 ^a (0.33)	0.60 ^a (0.30)

Numerele din paranteze reprezintă abaterile standard. Literele „a” indică faptul că nu există diferențe semnificative în ceea ce privește indicele de alfa-diversitate Shannon între speciile duglas, molid și brad în cadrul aceleiași zone de studiu (Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu).

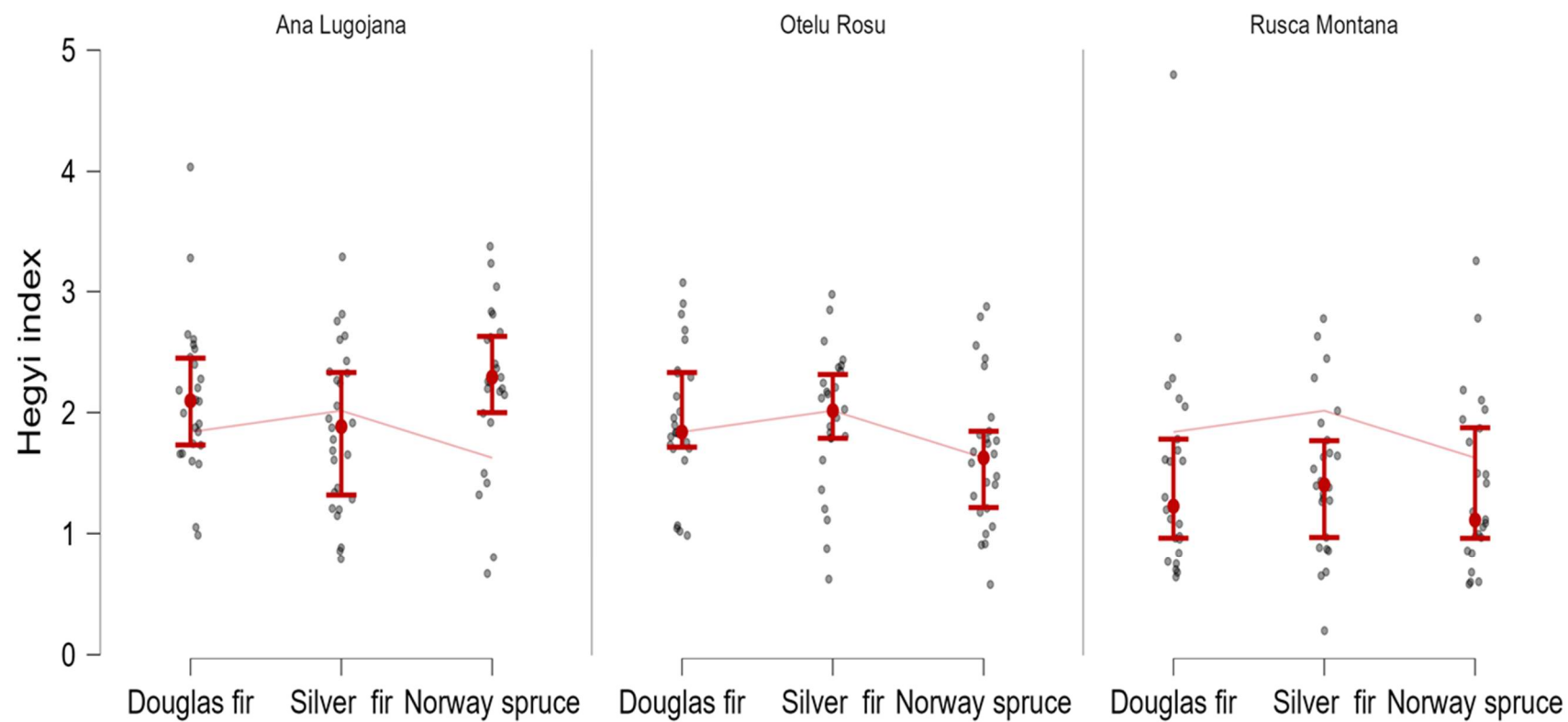


Fig. 5 Indicele Hegyi pentru duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugoiana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Indicatori:

Toate rezultatele prezentate în această secțiune au fost prezentate într-o conferință internațională:

- **24-27 mai 2022**, Petrea Ș., Petritan I.C., Gazol A., Curiel Yuste J., Hereș A.-M., "Drought resilience and stability of coexisting planted silver fir, Norway spruce and Douglas fir trees in the face of climate change". TRACE2022 "Tree-Rings in Archaeology, Climatology and Ecology"; Erlangen, Germany; oral presentation.

În plus, rezultatele prezentate în această secțiune vor fi incluse într-un articol științific care se află în momentul de față în curs de pregătire: **Petrea Ș., Petritan I.C., Gazol A., Curiel Yuste J., Hereș A.-M., *in prep.***

(4). Evaluarea serviciilor ecosistemice

Date privind creșterile anuale, subarboretul și arborii competitori, împreună cu coordonatele geografice ale celor 225 de arbori eșantionați, au fost utilizate pentru a face o evaluare a serviciilor ecosistemice pe care cele trei plantații de duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu le-ar putea oferi naturii și societății umane (i.e., captarea / stocarea carbonului, recreere etc.). Pentru a realiza acest lucru, dr. Stefano Balbi și doctoranda sa Alba Márquez Torres de la k.LAB (BC3 - Basque Center for Climate Change; Spania) au introdus cele datele menționate mai sus în software-ul ARIES (ARTificial Intelligence for Ecosystem Services) (<https://aries.integratedmodelling.org/>).

Rezultatele obținute până acum în acest sens au arătat următoarele:

i). Conform modelului IPCC tier 1, zona de studiu Otelu Rosu (**Fig. 6, colțurile din dreapta jos**) pare a fi cea care ar avea cel mai mare potențial în ceea ce privește capacitatea de captare/ stocare a carbonului. Cu toate acestea, trebuie subliniat faptul că, potrivit aceluiași model, datele de creștere, împreună cu indicii Shannon și Hegyi, indică faptul că mai mulți arbori (în principal molizi) din zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montana au de fapt potențial mai mare în ceea ce privește capacitatea de captare/ stocare a carbonului (**Tabelul 5**). Modelele IPCC tier 1 au fost descrise atât pentru factorii de emisie, cât și pentru datele de activitate. În mod specific, modelul IPCC tier 1, utilizat în aceste analize, reprezintă modelul de bază și utilizează frecvent valorile implicite la nivel de țară recomandate de IPCC.

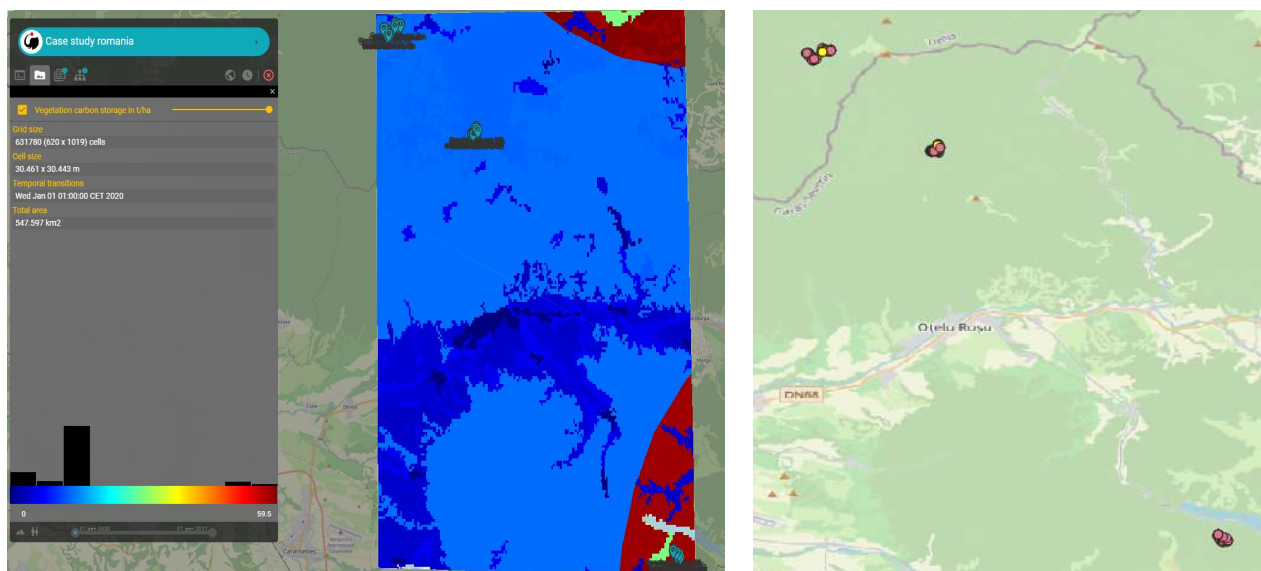


Fig. 6 Capacitatea de captare / stocare a carbonului, estimată folosind datele anuale de creștere și indicii Shannon și Hegyi a speciilor duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Tabelul 5. Arborii (în principal molid), amplasați în zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montana, care au un potențialul cel mai mare în ceea ce privește capacitatea de captare / stocare a carbonului

Specie	Codul arborelui	Zona de studiu	Creșteri	Indicele Shannon	Indicele Hegyi
molid	L36	Ana Lugojana	6.72	0.00	0.66
molid	L58	Ana Lugojana	6.49	0.00	0.80
molid	M45	Rusca Montana	5.90	0.36	0.58
duglas	L9	Ana Lugojana	5.89	0.24	1.87
molid	M9	Rusca Montana	5.80	0.28	0.67
molid	M27	Rusca Montana	5.59	0.91	1.18
brad	M55	Rusca Montana	5.40	0.60	0.86
duglas	L30	Ana Lugojana	5.32	1.20	1.73
molid	M1	Rusca Montana	5.24	0.33	0.60
duglas	L13	Ana Lugojana	5.18	1.07	1.99

ii). Atunci când datele s-au suprapus cu *CORINE land cover layer* [27], rezultatele obținute au arătat că zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montana par să ofere mai mult habitat pentru polenizatori. Cu toate acestea, trebuie subliniat faptul că aceste rezultate nu sunt legate de prezența speciilor duglas, molid și brad, ci de prezența speciilor de foioase care apar pe acești versanți de munte (**Fig. 7a**). În ciuda acestor rezultate aparent pozitive, nu au putut fi identificate culturi ce ar putea fi polenizate în apropierea zonelor de studiu (**Fig. 7b**).

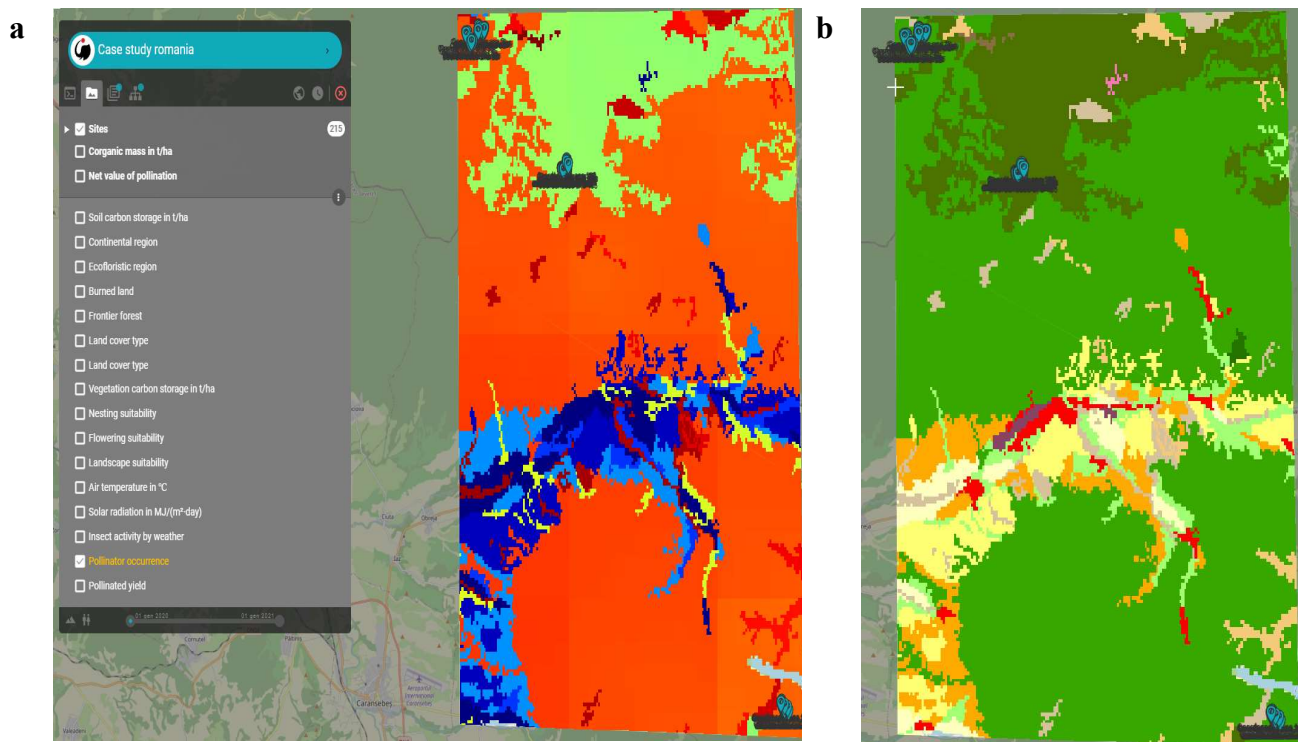


Fig. 7 Potențialul de a oferi habitat pentru polenizatori al plantațiilor mixte de duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu

iii). Rezultatele obtinute au aratat că posibilitatile de recreere oferite de zonele de studiu Otelu Rosu sunt teoretic mai bune decat cele oferite de zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montana. Această valoare de recreere teoretică a zonei de studiu Otelu Rosu se explică prin faptul că această zonă de studiu este mai accesibilă decât celelalte două. Într-adevăr, accesibilitatea semnalată de către model poate fi coroborată de membrii echipei de cercetare care au vizitat cele trei locuri de studiu în cadrul campaniile de teren din 2020 și 2021. Un alt rezultat interesant, referitor la posibilitățile recreative ale celor trei zone de studiu, a fost obținut pentru zona de studiu Rusca Montana pentru care s-a identificat o mai mare aprovizionare teoretică. Acest rezultat este legat de faptul că, avînd în vedere *CORINE land cover layer* [27], oamenii preferă să viziteze păduri cu compoziții forestiere mixte mai degrabă decât monoculturi (**Fig. 8**).

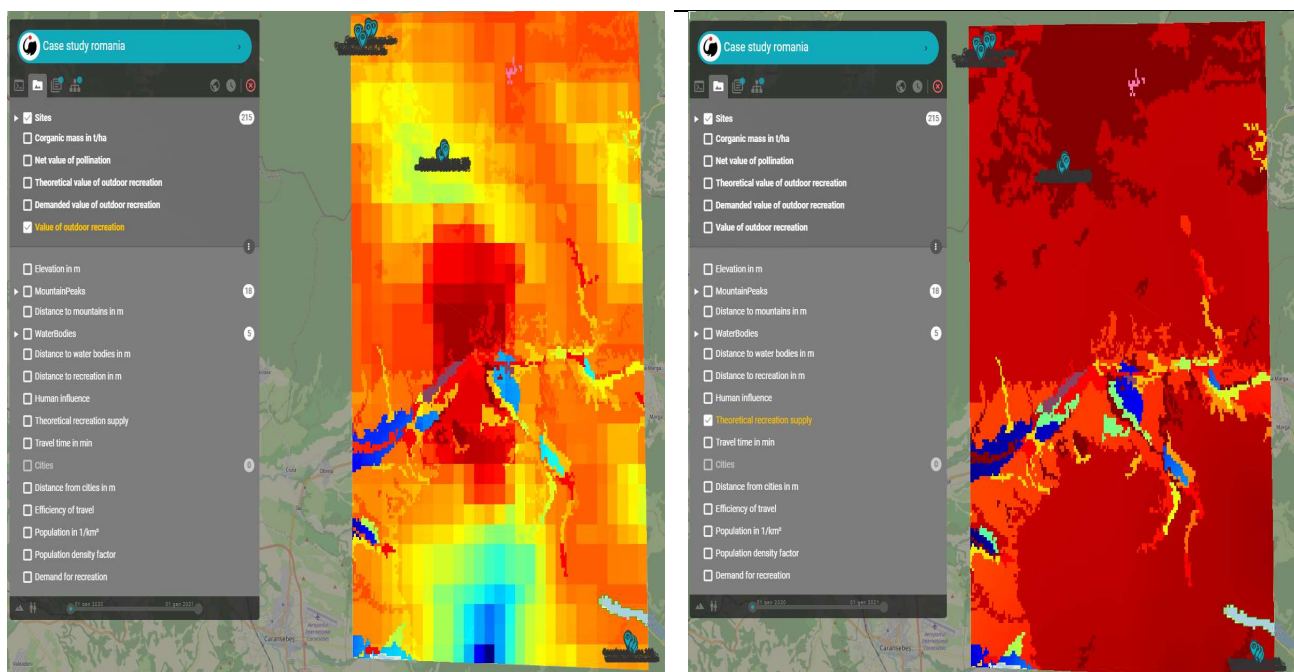


Fig. 8 Valoarea teoretică de recreere a plantațiilor mixte de duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu

Indicatori:

Toate rezultatele prezentate în această secțiune vor fi incluse într-un articol ce va fi publicat într-un jurnal de specialitate odată ce vor fi finalizate și completate cu modele de sol și biomasă, modele care sunt în curs de construire și validare.

III. IMPACT:

Toate obiectivele prevăzute în cadrul proiectului REASONING au fost realizate în perioada 15/09/2020 - 14/09/2022, așa cum este detaliat în secțiunile I. OBIECTIVE PREVĂZUTE ȘI REALIZATE și II. REZULTATE ȘI INDICATORI prezentate anterior.

În concluzie, rezultatele obținute în cadrul proiectului REASONING au arătat că duglasul, molidul și bradul din zonele de studiu Ana Lugojana și Rusca Montana prezintă tendințe de creștere pozitive. În schimb, la Otelu Rosu, doar bradul prezintă o tendință pozitivă de creștere. Totodată, nu s-a observat niciun avantaj (i.e., în ceea ce privește rezistența, recuperarea, reziliența și reziliența relativă) pentru duglas în comparație cu molidul și bradul atunci când aceste trei specii se confruntă cu evenimente de secetă severă. În ceea ce privește duglasul, analizele genetice efectuate pe această specie au arătat că nu există diferențiere între cele trei populații din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu. Totodată, rezultatele obținute în ceea ce privește structura genetică a populațiilor de duglas, având în vedere analize de structură a markerilor nucleari SSR și a markerilor cpSSR, au evidențiat o structură genetică nediferențiată în funcție de populații, un model

des întâlnit în rândul speciilor de conifere. Datele de subarboret și arbori competitori au arătat în continuare că nu există diferențe semnificative între cele trei specii de conifere atunci când se analizează indicii de alfa-diversitate Shannon și de competiție Hegyi. În ceea ce privește serviciile ecosistemice oferite de cele trei plantații mixte de duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu, acestea nu par să ofere beneficii deosebite naturii și societății umane. Deși în secțiunea II. REZULTATE ȘI INDICATORI de mai sus au fost evidențiate unele beneficii teoretice, aceste servicii ecosistemice trebuie privite și interpretate cu prudență, deoarece au o mulțime de *nuanțe* ce trebuie luate în considerare înainte de a putea trage concluzii foarte solide în ceea ce le privește.

Evenimentele de secetă tot mai severe și mai frecvente nu mai sunt doar un scenariu viitor de schimbări climatice, ci o realitate a zilelor noastre [28] care afectează ecosistemele forestiere la toate nivelurile (i.e., structură, funcții și servicii ecosistemice) în întreaga lume [29, 30]. În acest context, societatea umană și pădurile trebuie să se ajusteze și să se adapteze împreună pentru a face față unor astfel de provocări. În concret, avem nevoie de păduri care să continue să ofere servicii ecosistemice cheie și să satisfacă în același timp nevoile societății umane într-un mod durabil, iar pentru ca acest lucru să se întâmple avem nevoie de măsuri forestiere bine planificate. Proiectul REASONING a adus date științifice noi pentru România. Din câte știm, înainte de acest proiect, nu au existat publicații care să combine date ecologice și genetice din plantațiile de duglas stabilite în România. Rezultatele proiectului REASONING completează astfel informațiile disponibile pe care le avem în prezent în Europa despre această specie alogenă, completând o piesă importantă în puzzle-ului plantațiilor sale (i.e., stabilite în afara arealului natural de distribuție). În plus, prin studierea de plantații mixte de duglas, molid și brad, proiectul REASONING a completat un gol de cunoștințe ecologice și genetice nu numai în România, ci și în Europa, deoarece, deși au fost publicate mai multe studii cu plantații mixte de duglas și molid, în literatura științifică lipsesc date despre plantații mixte de duglas și brad [1]. Rezultatele proiectului REASONING vor fi, prin urmare, de mare interes atât pentru comunitatea științifică, cât și pentru stakeholders (i.e., societate, silvicultori), deoarece cele trei specii de conifere au funcții ecologice și economice importante. Complexitatea proiectului REASONING a fost definită de interdisciplinaritatea sa, acest proiect fiind unul în care s-au combinat diferite metode / studii de cercetare: dendrocronologice, dendroecologice, genetice, inventarieri de subarboret și arbori competitori și modele. Proiectul REASONING a adus împreună experți din toate aceste domenii de cercetare, experți care și-au combinat cunoștințele pentru a obține, cât mai complete posibil, rezultate importante din plantațiile mixte de duglas, molid și brad din zonele de studiu Ana Lugojana, Rusca Montana și Otelu Rosu. Abordarea inovatoare și interdisciplinară a proiectului REASONING ne-a permis să cercetăm caracteristicile ecologice și genetice ce stau la baza proceselor ce au loc în plantații mixte de

conifere, pe de o parte, și să facem estimări asupra serviciilor ecosistemice pe care acestea le-ar putea oferi naturii și societății umane, pe de altă parte. Rezultatele obținute în cadrul proiectului REASONING au fost diseminate în conferințe internaționale (Petrea et al., 2021; Petrea et al., 2022) și vor fi publicate în reviste de specialitate (Curtu et al., *submitted*; Petrea et al., *in prep.*). La o scară mai mică, proiectul REASONING a contribuit cu siguranță la dezvoltarea studiilor dendrocronologice, genetice și ecologice care se realizează în România. Echipa internațională care a participat în cadrul proiectului REASONING (**cei patru membrii ai echipei de cercetare [Ana-Maria Hereș, Elena Ciocîrlan, Ștefan Petrea și Ion Catalin Petritan] și colaboratorii externi [Alexandru Lucian Curtu, Jorge Curiel Yuste, Antonio Gazol Burgos, Stefano Balbi și Alba Márquez Torres]**) și-a consolidat, de asemenea, colaborarea stabilă, creând în continuare condiții optime pentru a menține o rețea de cercetare continuă în jurul subiectului *impactului schimbărilor climatice asupra ecosistemelor forestiere*, un subiect de mare interes la nivel mondial. În plus, cercetătorii juniori implicați în proiectul REASONING au putut beneficia de expertiza membrilor seniori ai echipei de cercetare, formându-și, consolidându-și și extinzându-și cunoștințele și abilitățile științifice.

Toate informațiile referitoare la proiectul REASONING, implementarea și rezultatele acestuia, pot fi găsite și pe următoarea pagină web: <https://silvic.unitbv.ro/ro/cercetare/525-proiect-reasoning.html>

IV. BIBLIOGRAFIE

- [1] Schmid M, Pautasso M, Holdenrieder O, 2014, Ecological consequences of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) cultivation in Europe. European Journal of Forest Research 133:13-29
- [2] Sofletea N, Curtu AL, 2007, Dendrologie. Editura Universitatii Transilvania
- [3] Holmes RL, 1983, Computer-assisted quality control in tree-ring dating and measurement. Tree-Ring Bulletin 43:69-78
- [4] Vicente-Serrano SM, Beguería S, López-Moreno JI, Angulo M, El Kenawy A, 2010, A new global 0.5° gridded dataset (1901–2006) of a multiscalar drought index: comparison with current drought index datasets based on the palmer drought severity index. J. Hydrometeorol. 11:1033–1043
- [5] Beguería S, Vicente-Serrano SM, Reig F, Latorre B, 2014, Standardized precipitation evapotranspiration index (SPEI) revisited: parameter fitting, evapotranspiration models, tools, datasets and drought monitoring. Int. J. Climatol. 34: 3001–3023
- [6] Curiel Yuste J, Flores-Rentería D, García-Angulo D, Hereș A-M, Bragă C, Petritan A-M, Petritan IC, 2019, Cascading effects associated with climate-change-induced conifer mortality in

mountain temperate forests result in hot-spots of soil CO₂ emissions. *Soil Biology and Biogeochemistry* 133:50-59

[7] Bunn AG, 2008, A dendrochronology program library in R (dplR). *Dendrochronologia* 26:115–124

[8] Bunn A, Korpela M, Biondi F, Campelo F, Mérian P, Qeadan F, Zang C, 2020, dplR: Dendrochronology Program Library in R. R package version 1.7.1. <https://CRAN.R-project.org/package=dplR>.

[9] Lloret F, Keeling EG, Sala A, 2011, Components of tree resilience: effects of successive low-growth episodes in old ponderosa pine forests. *Oikos* 120, 1909–1920

[10] Pinheiro JC, Bates DM, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team, 2020, Nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-147. URL. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>

[11] Lenth RV, 2016, Least-squares means: the R package lsmeans. *J. Stat. Softw.* 69:1–33

[12] van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P, 2004, Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538

[13] Peakall R, Smouse PE, 2012, GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539

[14] Eliades NG, Eliades DG, 2009, Haplotype Analysis: Software for Analysis of Haplotypes Data. *Forest Genetics and Forest Tree Breeding*, Georg-Augst University Goettingen, Germany

[15] Page RDM, 2002, Visualizing Phylogenetic Trees Using TreeView. *Current protocols in Human Genetics*, 10, 6.2.1-6.2.15

[16] Excoffier L, Lischer HEL, 2010, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology and Resources* 10: 564-567

[17] Bandelt HJ, Forster P, Röhl A, 1999, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48

[18] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-95

[19] Evanno G, Regnaut S, Goudet J, 2005, Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611–2620

[20] Jakobsson M, Rosenberg NA, 2007, CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801-180

- [21] Shannon CE, 1948, A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal, 27:379–423
- [22] Hegyi F, 1974, A simulation model for managing jack-pine stands. Fries, Growth Models for Tree and Stand Simulation. Res. Note vol. 30. Royal College of Forestry, Stockholm, Sweden, pp. 74–90
- [23] Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H, 2020, vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- [24] García O, 2014, Siplab, a spatial individual-based plant modelling system. Computational Ecology and Software, 4:215-222
- [25] Muggeo VMR, 2008, segmented: an R Package to Fit Regression Models with Broken-Line Relationships. R News, 8/1, 20-25. URL <https://cran.r-project.org/doc/Rnews/>.
- [26] Muggeo VMR, 2017, Interval estimation for the breakpoint in segmented regression: a smoothed score-based approach. Australian & New Zealand Journal of Statistics, 59, 311-322
- [27] Büttner G, Feranec J, Jaffrain G, Mari L, Maucha G, Soukup T, 2004, The CORINE land cover 2000 project. EARSeL eProceedings 3
- [28] IPCC, 2013, In: Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Midgley PM (Eds.), Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA 1535 pp.
- [29] Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M. ... Cobb N, 2010, A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. For. Ecol.Manag. 259:660–684
- [30] Hartmann H, Moura CF, Anderegg WRL, Ruehr NK, Salmon Y, Allen CD, ... O'Brien M, 2018, Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality. New Phytol. 218:15–28

Braşov, 08.09.2022

**director de proiect,
dr. Ana-Maria Hereş**

