

➤ **PN 23090302 Identificarea și caracterizarea prin modele avansate a resurselor genetice forestiere cu potențial adaptativ ridicat, precum și conservarea acestora în condițiile unui management forestier sustenabil climatic**

Scopul proiectului este dezvoltarea unor modele inovative pentru identificarea și caracterizarea avansată a resurselor genetice forestiere cu potențial adaptativ ridicat prin integrarea metodelor noi de genetică moleculară și de teledetecție cu metodele clasice de caracterizare fenotipică, auxologică și climatică, care să contribuie la dezvoltarea unui nou concept de conservare și monitorizare a resurselor în condițiile unui management forestier adaptativ.

Obiectivul general îl reprezintă dezvoltarea, testarea și validarea metodelor inovative pentru identificarea și caracterizarea avansată a resurselor genetice forestiere, care să contribuie la creșterea numărului de resurse genetice caracterizate cu informații esențiale pentru conservarea și monitorizarea pe termen lung a tendințelor și a proceselor care mențin variația genetică.

În 2025 a fost realizată faza VI “Evaluarea diversității genetice adaptative cu ajutorul metodelor inovative de genotipare prin secvențiere a genelor candidate”.

Obiectivul fazei VI a fost aplicarea tehnologiei Single Primer Enrichment Technology (SPET) și a setului SPET Forgenius-MultiSp50K pentru genotiparea populațiilor de cvercinee, în special *Quercus robur* și *Q. pedunculiflora* din zona de stepă și silvostepă a României; obținerea unui set extins de markeri SNP-uri distribuiți la nivelul întregului genom al speciei *Q. robur*, în vederea evaluării diversității genetice adaptative; adnotarea funcțională detaliată a genelor candidate implicate în răspunsul la stres biotic și abiotic; dezvoltarea metodei privind fluxul de adnotare BLASTx–InterPro–GO–EC (BLASTx, InterProScan, Gene Ontology, coduri enzimatic); evaluarea potențialului tehnologiei SPET ca instrument de referință pentru monitorizarea genetică a resurselor genetice forestiere; crearea bazei de date ce conține 18.000 de regiuni țintă genotipate cu tehnologia SPET.

Pentru îndeplinirea obiectivelor asumate, s-au desfășurat următoarele activități:

1. Aplicarea setului SPET Forgenius-MultiSp50K la cvercinee din zona de stepă și silvostepă. Utilizarea panelului Forgenius-MultiSp50K, proiectat pe genomul de referință *Quercus robur* PM1N, pentru captarea a ~18.000 de regiuni țintă distribuite genomic și în gene candidate implicate în răspuns la stres, la populații de *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* din RGF Letea, Șeremet, Ciornuleasa, Braniștea Cătarilor, Dorobanți, Vânju Mare, Lohan și populația Punghina.
2. Extracția și controlul calității ADN-ului genomic. Recoltarea frunzelor uscate, extracția ADN (Invisorb Spin Plant Mini Kit), cuantificarea fluorimetrică (Qubit 2.0) și selecția probelor cu cantitate și puritate adecvată (≥ 500 ng, 20–50 ng/ μ l) pentru genotiparea SPET, asigurând baza experimentală necesară obținerii unui set extins de SNP-uri.
3. Prepararea librărilor SPET și secvențierea țintită. Prepararea librărilor Allegro Targeted Genotyping (Tecan) cu 100 ng ADN/probă, marcarea fragmentelor cu identificatori moleculari unici (UMI), verificarea dimensiunii librărilor (Bioanalyzer) și secvențierea paired-end (2 $\times$ 150 bp) pe platforma NovaSeq 6000 la IGATech, pentru captarea robustă a regiunilor țintă SPET.
4. Preprocesarea bioinformatică și detecția SNP-urilor. Curățarea citirilor (cutadapt, ERNE-FILTER), alinierea la genomul *Q. robur* PM1N cu BWA-MEM, eliminarea duplicatelor pe baza UMI și apelarea variantelor cu GATK v4.5, obținând 220.506 SNP-uri distribuite la nivelul întregului genom și constituind baza setului de markeri pentru diversitate genetică adaptativă.

5. Genotiparea populațiilor și evaluarea transferabilității interspecifice SPET. Genotiparea a 183 de indivizi din 8 populații de cvercinee și cuantificarea numărului de primeri funcționali per populație (medie ~16.184 primeri), demonstrând transferabilitatea ridicată a markerilor SPET între *Q. robur* și *Q. pedunculiflora* și adecvarea lor pentru monitorizarea genetică standardizată.
6. Analiza PCA a structurii genetice la nivel populațional. Realizarea analizei PCA pe întregul set de 220.506 SNP-uri, cu evidențierea separării clare între populațiile STB (*Q. pedunculiflora*) și ST (*Q. robur*), precum și a pozițiilor intermediare (Letea, Punghina), contribuind la evaluarea diversității genetice adaptative și la testarea potențialului SPET în detectarea structurilor genetice fine.
7. Implementarea fluxului de adnotare BLASTx–InterProScan–GO–EC. Dezvoltarea și aplicarea unui flux bioinformatic integrat în OmicsBox (BLASTx, InterProScan, GO mapping/annotation, EC) pentru cele 18.000 de secvențe țintă SPET, constituind o metodă inovativă de adnotare funcțională standardizată a genelor candidate implicate în răspunsul la stres biotic și abiotic.
8. Analiza detaliată a rezultatelor InterProScan și identificarea genelor candidate. Caracterizarea familiilor, domeniilor și siturilor proteice (kinaze, RLK, LRR, PPR, factori de transcripție WRKY/AP2/Myb/NAC, enzime metabolice, proteine de rezistență etc.), pentru delimitarea genelor candidate implicate în semnalizare, răspuns la stres și procese metabolice relevante pentru adaptare.
9. Caracterizarea profilului funcțional prin Gene Ontology și coduri enzimatic EC. Analiza distribuției termenilor GO (P/F/C), a nivelurilor GO, a codurilor de evidență și a codurilor enzimatic (transferaze, hidrolaze, oxidoreductaze etc.), pentru descrierea structurii funcționale a panoului SPET și a relevanței sale în studiile de adaptare și monitorizare genetică a resurselor forestiere.
10. Crearea și organizarea bazei de date cu 18.000 regiuni țintă și integrarea datelor și a adnotărilor funcționale (BLASTx–InterPro–GO–EC) într-o bază de date dedicată regiunilor țintă, care poate fi utilizată ca resursă de referință pentru monitorizarea genetică pe termen lung a resurselor genetice forestiere de cvercinee și pentru analize viitoare de diversitate și adaptare.

Rezultatele fazei a VI-a s-au concretizat în:

-1 studiu privind, evaluarea diversității genetice adaptative cu ajutorul metodelor inovative de genotipare prin secvențiere a genelor candidate, prin aplicarea tehnologiei Single Primer Enrichment Technology (SPET) și a setului SPET Forgenius-MultiSp50K asupra populațiilor de cvercinee din România, în special *Quercus robur* și *Q. pedunculiflora*, vizând adnotarea funcțională a genelor implicate în răspunsul la stres și dezvoltarea unei baze de date genomice de referință pentru monitorizarea resurselor genetice forestiere.

-1 articol BDI:

“Evaluarea și conservarea Resurselor Genetice Forestiere de cvercinee din sudul Dobrogei: analiză și propuneri pentru gestionarea acestora în contextul schimbărilor climatice” Revista de Silvicultură și Cinegetică. Autori: Bogdan Ionuț Pleșca, Flaviu Eugen Popescu, Ecaterina Nicoleta Apostol, Răzvan Diaconescu, Ioana Maria Pleșca, Dragoș Postolache

- 2 articole ISI:

“Large-Scale Genomic SNP Dataset for Central and Southeast European Turkey Oak (*Quercus cerris* L.) Populations Generated by ddRAD-Seq Method”. Autori: Botond B. Lados, Csilla É. Molnár, Máté Farkas, Attila Benke, Katalin Bereczki, László Nagy, Zoltán A. Köbölkuti, Srdan

Stojnić, Lazar Kesić, Velisav Karaklić, Mladen Ivanković, Dragos Postolache, Tibor Hartel, Petar Zhelev, Milan Mataruga, Vladimir Tomov, Klára Cseke (2025). Journal of Biogeography, 52(10), e70014. <https://doi.org/10.1111/jbi.70014>

Nechita, Constantin, J. Julio Camarero. "Hotter winter-spring droughts accelerated the growth decline of marginal pedunculate oak (*Quercus robur*) populations in dry sites from Romania." Dendrochronologia (2025): 126369. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2025.126369>

- 1 Bază de date cu 18.000 regiuni țintă și integrarea datelor și a adnotărilor funcționale (BLASTx–InterPro–GO–EC).

- 1 Metodă inovativă privind fluxul de adnotare BLASTx–InterPro–GO–EC și caracterizarea funcțională a genelor candidate.