

Controlul materialelor forestiere de reproducere: trasabilitatea genetică, contribuție la gestionarea durabilă a pădurilor

M. Teodosiu, M. Konnert

Teodosiu M., Konnert M., 2014. The control of the forest reproductive material: the genetic traceability, support for forest certification and a sustainable forest management. *Bucov. For.* 14(2): 195-204, 2014.

Abstract. For a sustainable forest management, beside the choice of the right species in artificial regeneration, the right provenances present their own importance. The existing legal regulation on forest reproductive material moving in trade can only provide an absolute proof of identity, at an unproportionally intense level of controlling. Techniques based on the analysis of DNA markers are a powerful tool for the genetic traceability of forest reproductive material, but on a European level, the traceability systems are yet missing, excepting the two certification systems implemented in Germany (ZüF and FfV). The reference samples collected from individuals in different steps of the forest reproductive material production, and the comparison of their genetic composition, are the principle underlying the German certification systems. The seeds from seed orchards can be identified with highly polymorphic SSR markers, once the the genetic profile of the reference clone is known, without reference samples. For different purpose, suitable DNA markers are available, and the nuclear microsatellites are the more usefull in individual identification. Different statistical approaches can still be used to assign individual or groups of individuals to a population, but this requires further evaluation for their use in traceability. The control procedures are under development at European level. Their implementation are necessary also in Romania, as connecting to the present scientific trends, and also related to its position as seeds provided for other European countries. **Keywords** forest reproductive material, traceability, microsatellites, genetic fingerprint

Authors. Maria Teodosiu (teodosiumaria@yahoo.com) - Forest Research and Management Institute, Station Câmpulung Moldovenesc, 725100 Câmpulung Moldovenesc, Suceava, Romania; Monika Konnert - Bavarian Institution for Forest Seeding and Planting, 83317 Teisendorf, Germania.

Manuscript received December 05, 2014; revised December 20, 2014; accepted December 22, 2014; online first December 31, 2014.

Introducere

Regenerarea naturală a pădurilor asigură conservarea diversității genetice și specifice, a echilibrului ecologic și structural al arboretelor, constituind astfel condiția esențială pentru menținerea integrității ecosistemelor forestiere. La nivel european, se constată o creștere a suprafețelor regenerate natural, ponderea la nivelul anului 2010 fiind de aproape 70%, existând însă și țări (Polonia, Ucraina) unde mai mult de 50% din suprafața forestieră este regenerată artificial (MCPFE 2011). În România, conform “Raportului național privind starea mediului în anul 2013” (ANPM, 2014), procentul suprafețelor regenerate artificial se situează la 39,3%. Valoarea este în scădere cu 5,3% față de anul precedent, aceasta inclusiv în condițiile în care nu s-au semnalat situații excepționale cum ar fi doborâturile de vânt în masă, când de obicei se impun lucrări de împăduriri pe suprafețe extinse, în procent de peste 50% (de exemplu, conform ANPM 2013, în anul 2006 suprafața regenerată artificial prin plantații s-a ridicat la nivelul de 56%).

Atunci când regenerarea artificială a arboretelor este o necesitate, pentru garantarea stabilității și a productivității viitorului arboret, pe lângă celelalte aspecte de ordin ecologic și silvicultural, alegerea proveniențelor adecvate și cu origine controlată prezintă o deosebită importanță. Unele studii estimează un câștig genetic rezultat în urma utilizării unor materiale de origine și calitate corespunzătoare de 5% pentru semințele care provin din arborete surse de semințe selecționate, de 10% pentru livezi semincere din prima generație, respectiv de 15-30% pentru livezi semincere din generația a-2a (Lindgren et al. 2008, Reid 2008).

Utilizarea unor materiale forestiere de reproducere având o proveniență neadecvată stațiunii poate avea consecințe negative asupra potențialului adaptativ și productiv al pădurilor, în special în condițiile prezente ale modificărilor climatului. Ca exemplu, în

într-unul dintre primele teste comparative de proveniențe, instalate în anul 1913 (Stimm 1995), proveniențele de douglas din regiunea de coastă a SUA au produs la vârsta de 80 de ani un volum de 1708 m³ ha⁻¹, în timp ce proveniențele continentale (de interior) doar 745 m³ ha⁻¹, diferențele ce indică singure consecințele (pierderile) economice rezultate din plantațiile cu proveniențe nepotrivite (Konnert și Ruetz 2006).

Garantarea originii și a utilizării corespunzătoare a materialelor forestiere de reproducere se realizează printr-o serie de proceduri de control (MMS 2013), majoritatea acestora presupunând verificarea documentelor scrise. Totuși, chiar și în condițiile implementării unui sistem intensiv de control, posibilitatea fraudării trebuie luată în calcul. Odată cu dezvoltarea tehnicilor de analiză în domeniul geneticii moleculare au fost identificate noi oportunități de control, precum compararea compoziției genetice a materialelor forestiere de reproducere pe parcursul diferiților pași din procesul de producție (recoltarea semințelor, producerea puieților, instalarea plantațiilor), pot conduce la rezultate mai apropiate de realitate.

Scopul lucrării este de a prezenta o sinteză a orientărilor actuale cu privire la trasabilitatea materialelor forestiere de reproducere. Se va insista pe prezentarea avantajelor trasabilității bazate pe markeri ADN și a tendințelor la nivel european, precum și a posibilităților de aplicare ale acesteia în România.

Cadrul legal

Directiva 1999/105/CE a Consiliului European reprezintă cadrul legal pentru producerea și comercializarea materialelor forestiere de reproducere în Uniunea Europeană, aceasta aplicându-se tuturor statelor membre. Directiva stipulează un set de cerințe minime, lăsând statelor membre și posibilitatea de a impune cerințe adiționale mai stricte - pe

baza legislației naționale - în ceea ce privește aprobarea materialelor de bază (sursa din care se obțin materiale forestiere de reproducere), respectiv producerea materialelor forestiere de reproducere pe teritoriul propriu. Reglementările Directivei referitoare la producerea și comercializarea materialelor forestiere de reproducere trebuie respectate cu strictețe, nefiind acceptate alte restricții decât cele menționate în aceasta. Pentru utilizarea finală a MFR, Directiva CE nu prezintă cerințe suplimentare dar, în același fel, oferă țărilor membre posibilitatea de a include în legislația națională prevederi specifice. Reglementările privind controlul implică numai verificarea documentelor (certificatul principal de identitate și documentele de însoțire).

În România, Directiva 105/1999 a fost transpusă în reglementări interne înainte de aderarea la Uniunea Europeană, prin Ordonanța Guvernului nr. 11/2004 privind producerea, comercializarea și utilizarea materialelor forestiere de reproducere, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 161/2004. Directiva a fost implementată în legislația națională ulterior aderării României la UE, prin Legea 107/2011.

În linii mari, legislația europeană și cea națională conțin același set de principii în ceea ce privește: (i) cerințele minime pentru admiterea materialelor de bază, (ii) catalogul național și lista națională a materialelor forestiere de reproducere, (iii) certificatul principal de identitate („Master Certificate of Identity”), (iv) mecanismul de control efectuat de către

Autoritatea desemnată de Guvern, (v) clasificarea materialelor forestiere de reproducere destinate comercializării. Referitor la ultimul aspect, în Uniunea Europeană sunt recunoscute șase tipuri de materiale de bază și patru categorii de materiale forestiere de reproducere (Tabelul 1).

Cerințele minime pentru admiterea materialelor de bază pentru producerea materialelor forestiere de reproducere din una din categoriile menționate (Tabelul 1) sunt specificate în Directiva CE 105/1999, iar criteriile pentru selecție sunt stabilite de fiecare stat membru. De exemplu, pentru categoria „sursă identificată”, cerințele minime din Directiva europeană se referă la obligativitatea ca sursa de semințe sau arboretul să fie localizat într-o singură regiune de proveniență și să fie precizată originea. Necesitatea inspecției și a aprobării de către autoritate este lăsată la decizia statelor membre. Din aceste motive, utilizarea materialelor forestiere de reproducere din categoria „sursă identificată” este strict interzisă în unele țări din UE (de ex. în Germania) sau este aprobată doar în condițiile în care nu este destinată scopului forestier (Austria de exemplu). În legislația națională din România nu există precizări clare în această privință, la categoria „sursă identificată” putând fi incluse sursele de semințe cu capacitate sporită de adaptare, iar MFR pot fi utilizate în scopuri forestiere deosebite (împădurirea terenurilor degradate chimic etc.).

Comisia Europeană a elaborat o propunere de regulament privind materialul de repro-

Tabelul 1 Categoriile sub care diferitele tipuri de materiale forestiere de reproducere pot fi comercializate în Europa (conform Anexei VI din Directiva 1999/105/EC)

Tipul de material de bază	Categorie materialul forestier de reproducere			
	Sursă identificată	Sursă selecționată	Sursă calificată	Sursă testată
Sursă de semințe	X			
Arboret	X	X		X
Plantaj			X	X
Părinți de familie (familii)			X	X
Clone			X	X
Amestec clonal			X	X

ducere al plantelor – cunoscut și sub numele de „Regulamentul semințelor” - care vizează includerea celor 12 directive existente cu privire la materialul de reproducere al plantelor, inclusiv Directiva CE 105/1999, în respectivul Regulament (2013/0137(COD)). Scopul este de a garanta aplicarea respectivelor reglementări în egală măsură, în toate statele membre, introducerea unor norme mai clare și simplificate, reducerea costurilor și alinierea legislației privind materialul de reproducere cu normele existente în materie de sănătate a plantelor (Consiliul European 2014). Noua propunere a iscat ample controverse în aproape toate statele membre și în întregul sector forestier, incluzând aici proprietarii și administratorii de păduri, pepinierele și firmele implicate în comercializarea MFR. Motivațiile au avut în vedere faptul că în silvicultură investițiile au în vedere perioade foarte lungi de timp, iar orice daune produse prin utilizarea unor materiale de reproducere inadecvate devin vizibile după mai mulți ani, în timp ce în agricultură diferitele varietăți de plante pot fi schimbate în fiecare an. Prin urmare în silvicultură, calitatea controlului nu trebuie atenuată, mai ales dacă se iau în calcul și efectele posibile ale schimbărilor climatice. Pe lângă alte aspecte, aplicabilitatea directă a prevederilor regulamentului, fără a se lăsa statelor membre posibilitatea de a adapta noile reguli necesităților lor, a condus în final la respingerea propunerii de către Parlamentul European (martie 2014), urmată de retragerea din agenda de lucru a Comisiei Europene (decembrie 2014) (Consiliul European 2014).

La nivel mondial, certificarea MFR se realizează sub schema OECD pentru certificarea transferurilor materialelor forestiere de reproducere pe piața internațională. Această schemă voluntară este deschisă atât membrilor OECD, cât și oricărui alt membru al ONU. În prezent, în cazul speciilor incluse în lista de produse din șapte din țările non-UE (Norvegia, Canada, Turcia, USA, Serbia, Croația și Elveția), sub auspiciile schemei OECD și

certIFICATE oficial de autoritățile țării respective, semințele și puietii din una din categoriile „sursă identificată”, „sursă selecționată”, „sursă testată” sunt considerate echivalente semințelor și puietilor produși în conformitate cu Directiva 105/1999.

Trasabilitatea genetică a materialelor forestiere de reproducere

Certificarea materialelor forestiere de reproducere și trasabilitatea

“Certificarea este procedura prin care o terță parte dă o asigurare scrisă că un produs, proces sau serviciu este conform cu condițiile specificate” (Ghidul 2 ISO/CEI: 1996, <http://www.asro.ro>). În privința materialelor forestiere de reproducere, în legislația națională (Legea 107/2011) certificarea este definită drept „confirmarea de către împuternicitul/reprezentantul autorității a originii/provenienței și a calității materialului forestier de reproducere, produs pentru comercializare în scopuri forestiere, în conformitate cu categoriile prevăzute în sistemul național sau cu sistemul OECD”. De obicei, în cadrul unui sistem de certificare, caracteristica atestată trebuie să fie posibil de urmărit în orice etapă de producție și în orice moment, posibilitatea de a face acest lucru fiind denumită trasabilitate.

Termenul de trasabilitate (din engl. traceability) este unul relativ nou, fiind introdus la mijlocul anilor '80 în scopul garantării controlului circulației bunurilor între diverșii parteneri economici. Conform sistemului de asigurare a calității ISO 9000/2000, trasabilitatea este definită drept „capacitatea de a permite regăsirea istoricului, a utilizării sau a localizării unei entități (produs, proces sau serviciu) prin identificări înregistrate”. Chiar dacă până în prezent a devenit obligatoriu doar în sectorul alimentară (începând cu 1 ianuarie 2005) (Regulamentul European 178/2005), trasabilitatea este un concept utilizat în mai

multe domenii de activitate, inclusiv cel forestier (trasabilitatea lemnului și a MFR).

Utilizarea metodelor genetice în trasabilitatea MFR

Trasabilitatea genetică desemnează posibilitatea de a verifica identitatea unui produs (de exemplu lot de materiale forestiere de reproducere) cu ajutorul studiului polimorfismului ADN (Botta et al. 2004, Dalvit et al. 2007). Începând cu anii '80, dezvoltarea unor tehnici de identificare a polimorfismului ADN, între care poate cea mai importantă este cea bazată pe Reacția de Polimerizare în Lanț (PCR) (Mullis et al. 1986), a permis identificarea unui număr mare de loci genici, utili în studierea mai amplă și mai precisă a compoziției genetice a populațiilor de arbori forestieri. În același timp, aceasta a deschis și noi oportunități în ceea ce privește controlul respectării reglementărilor legale în domeniul materialelor forestiere de reproducere.

Un instrument util în trasabilitatea MFR îl reprezintă markerii genetici moleculari. Principalele aspecte în care markerii genetici au putut fi utilizați cu succes au vizat: (i) identificarea individuală (cazul certificării clonelor valoroase, atât în vederea îmbunătățirii calității materialelor de reproducere, cât și pentru apărarea drepturilor amelioratorilor – Rajora și Rahman 2003, De Luca et al. 2008, Schroeder și Fladung 2014, Martin et al. 2014), (ii) verificarea originii (provenienței) lotului de materiale forestiere de reproducere înainte de utilizarea acestora la împădurire, în vederea confirmării datelor înscrise în certificatul principal de identitate (Finkeldey et al. 2010), (iii) identificarea regiunii de proveniență (Deguilloux et al. 2003, Lowe 2007), (iv) verificarea respectării procedurilor de recoltare a semințelor referitoare la numărul minim de arbori seminceri (Ziegenhagen et al. 2003), dar și (v) identificarea speciei - acolo unde acest lucru este dificil de realizat pe baza caracteristicilor morfologice - împreună cu diferențierea hibridilor de

specia pură și estimarea gradului de introgresie (Curtu et al. 2007).

Pentru a permite diferențierea la nivelul dorit, este nevoie ca markerii genetici să fie aleși în raport cu capacitatea de discriminare a acestora. Prin caracterul uniparental de transmitere, markerii ADN extranucleari, mitocondriali (mtADN) și cloroplastici (cpADN) sunt foarte utili în studiile filogeografice, permițând identificarea originii arborilor la scară regională sau macrogeografică (Vendramin et al. 2000, Petit et al. 2002, Tollefsrud et al. 2008). Dintre markerii ADN nucleari, microsateleții (SSR - Secvențele Simple Repetitive) sunt cel mai des folosiți în sistemul de certificare, deoarece prezintă un polimorfism ridicat, transferabilitate interspecifică și, în cele mai multe cazuri, presupun o metodă de analiză simplă, bazată pe reacția PCR. În afară de acestea, prezintă posibilități de analiză cu ajutorul unor analizoare automate, chiar dacă referitor la costul unor astfel de analize, acesta este încă unul mare.

Tocmai datorită polimorfismului ridicat, chiar și în cazul unui număr redus de markeri, puterea de discriminare a microsateleților nucleari exprimată prin așa-numita probabilitate de identitate P_{ID} - este foarte ridicată. Probabilitatea de identitate, adică probabilitatea ca doi indivizi aleși la întâmplare să aibă același genotip, depinde de numărul și de gradul de polimorfism al markerilor genetici aleși. Pentru un plantaj de brad (*Abies alba* Mill.), la un număr de 7 microsateleți nucleari a fost calculată o valoare $P_{ID} = 0,00000000011(1,1E-10)$ (Teodosiu, nepublicat), în timp ce la *Acer pseudoplatanus* rata de discriminare este una ridicată chiar și analizând numai 4 microsateleți nucleari ($P_{ID} = 0,00008$) (Konnert et al. 2008). Rata de discriminare a microsateleților nucleari diferă de la o populație la alta, atât în funcție de frecvențele alelice specifice, cât și de prezența sau absența alelelor private (rare). Hasenkamp et al. (2011) au identificat, în cazul a două arborete surse de semințe de fag (*Fagus sylvatica* L.), o probabilitate de identitate de

$1,69 \times 10^{-7}$, respectiv $5,89 \times 10^{-8}$ pentru 6 nSSR. În funcție de obiectivele vizate, ca principiu de lucru pentru a asigura eficiența discriminării, se vor alege întotdeauna combinații de markeri în număr suficient și cu costuri rezonabile. Cu toate acestea, stabilirea cu certitudine a originii unui lot de materiale de reproducere se poate face doar în condițiile în care sunt cunoscute toate genotipurile surse, ca în cazul planta-jelor de semințe, unde profilul genetic al tutu-
ror arborilor ce îl compun se poate obține cu ușurință.

Când se impune stabilirea apartenenței unui lot de materiale de reproducere la populația de origine prin verificarea identității genetice, devine necesară analiza unor probe reprezentative, atât din lotul de puieți sau semințe comercializate, cât și din lotul de conuri sau de semințe, imediat după recoltare. Prin aceasta, rezultatul final este de fapt o „amprentare” genetică a colectivelor de comparat (semințe, puieți). În cazul plantajelor de semințe, plan-taje sau al livezilor semincere, atunci când populația este clar delimitată, se poate re-aliza amprenta genetică a tuturor membrilor populației (clonelor) și se poate renunța la proba de referință din semințele recoltate.

Pentru fundamentarea deciziei de confir-mare sau infirmare a identității genetice există mai multe abordări, respectiv deterministe sau probabilistice (Dalvit et al. 2007). Prima abordare are în vedere stabilirea pro-filului genetic al populației pe baza numărului și a frecvențelor alelice pentru fiecare locus analizat. Trebuie menționat faptul că unele dintre alele pot fi fixate doar la nivelul anumi-tor populații, cum de altfel pot exista diferențe semnificative și la nivelul frecvențelor alelice. Pe baza acestor frecvențe alelice se estimează apoi diferențierea și/sau distanța genetică. Pen-tru conformitate, compoziția genetică a lotului de semințe nu trebuie să difere semnificativ de cea a probei de referință.

Abordarea probabilistică se bazează pe o serie de metode statistice care au drept scop atribui-rea sau excluderea populației de referință ca

posibilă origine a indivizilor investigați (Piry et al. 2004). În acest sens, au fost dezvoltate o serie de metode pentru estimarea probabilității, bazate pe diferite criterii de atribuire cum ar fi: distanțele genetice (Cornuet et al. 1999), verosimilitatea maximă (Paetkau et al. 1995) sau utilizând metode bayesiene (Rannala și Mounatin 1997). Metodele bazate pe verosi-militatea maximă sau cele bayesiene dau cele mai bune rezultate, însă în cazul acestora se impune prezumția că populația este în echili-bru Hardy-Weinberg (Excoffier și Heckel 2006). În afară de asta, mai există o serie de as-pecte care influențează corecta atribuire, cum ar fi numărul de markeri analizați, variabilitatea acestora și gradul de diferențiere genetică. În cazul animalelor, la un grad de diferențiere genetică ridicat ($0.200 < F_{ST} < 0.259$), trei loci genici sunt suficienți pentru a avea o precizie de atribuire de 95% (Dalvit et al. 2007). Re-zultatele obținute în ultimii ani prin aplicarea acestor metode la arbori sunt promițătoare, mai ales cele referitoare la trasabilitatea lem-nului (Deguilloux et al. 2003, Jolivet și Degen 2012, Degen et al. 2013).

În cazul aplicării practice a metodei de atribuire a genotipurilor multilocus (eng. multi-locus genotype assignment), este nevoie de utilizarea unor probe prelevate din arborii maturi din arboretul sursă de semințe (proba de referință), controlul efectuându-se direct pentru loturile suspicioase de semințe sau puieți. Degen et al. (2010), utilizând probe recoltate din arborii maturi și puieți din cinci arborete surse de semințe și analizate la nive-lul a opt microsateliți nucleari (nSSR), au determinat o proporție de atribuire corectă a puieților de 65%, concluzionând că metoda poate fi fezabilă inclusiv în cazul controlului materialelor forestiere de reproducere.

Implementare și perspective

Germania este una dintre țările pionere în Eu-ropa în stabilirea unor metode de control al ma-

terialelor forestiere de reproducere, în prezent fiind funcționale două sisteme aproape identice, în măsură să garanteze trasabilitatea materialelor forestiere de reproducere: “Schema de certificare pentru verificarea originii materialelor forestiere de reproducere” (FRM) în sudul Germaniei (Züf, <http://www.zuef.de>) și „Asociația pentru materiale forestiere de reproducere” (FfV, <http://www.isogen.de>). Ambele sisteme au scopul de a verifica și urmări originea materialelor forestiere de reproducere, de la recoltarea și procesarea semințelor, până la producerea puietilor în pepinieră și comercializarea acestora. În esență, ambele sisteme se bazează pe probe de referință și pe compararea compoziției genetice utilizând markeri genetici moleculari specifici (Figura 1). Probele de referință sunt colectate în fiecare dintre etapele de producție a puietilor - recoltarea semințelor, procesarea semințelor, amestecarea loturilor și din lotul de puieti destinați împăduririlor. Toate aspectele tehnice legate de eșantionare,

reprezentativitatea și mărimea probei, optimizarea și standardizarea metodei de laborator, conservarea pe termen lung a probelor de referință și gestionarea bazei de date sunt incluse în manualele tehnice ale celor două sisteme (disponibile pe pagina web a acestora). Analizele comparative se realizează la cererea expresă sau, pentru a reduce din costuri, pentru un subset de probe selectat la întâmplare (Konnert și Behm 2006). Schema de certificare din sudul Germaniei (Züf) este organizată ca o asociație privată, având un comitet director ales de către membrii asociației, dar și un comitet științific care supervizează activitatea științifică.

La inițiativa Asociației Europene a Pepiniereilor Forestiere (European Forest Nursery Association - EFNA), ambele sisteme de control germane sunt deschise pentru toți producătorii de materiale forestiere de reproducere din țările membre UE. Ca principiu, schema de control nu se substituie aplicării

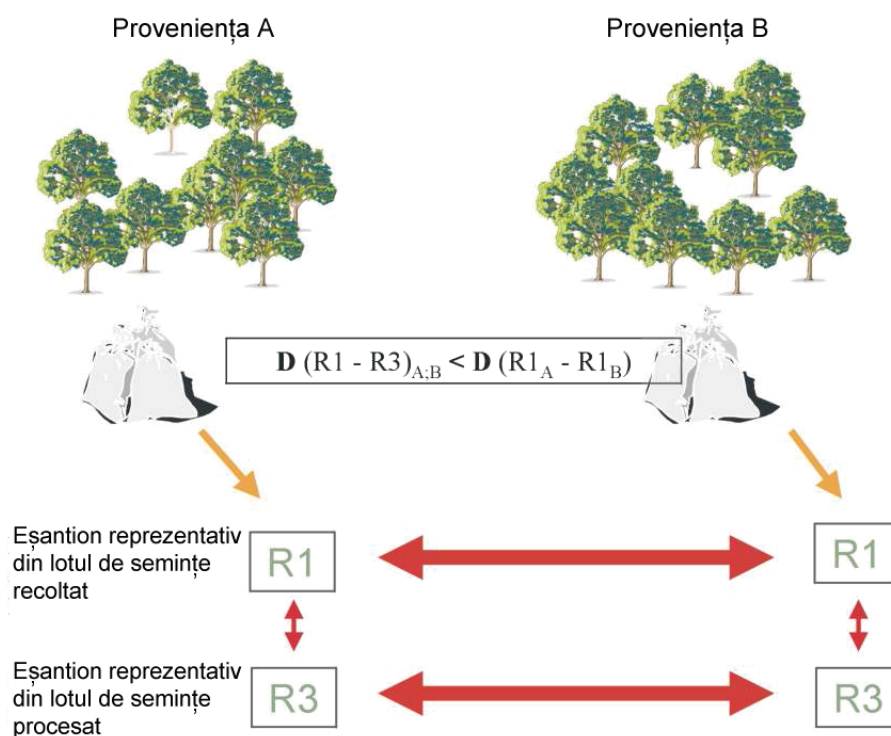


Figura 1 Analiză comparativă a probelor de referință pentru două proveniențe (după Konnert și Behm 2006). Abrevieri: D - distanța genetică, R1 - proba de referință preluată imediat după recoltare (conuri, semințe), R3 - proba de referință preluată din semințele prelucrate

prevederilor legale, însă impune o aplicare corectă a acestora. În cadrul schemei, proprietarul sau administratorul de pădure plătește o sumă în plus pentru materialul forestier de reproducere (plată care reprezintă contribuția la funcționarea schemei de control), însă are certitudinea că deține sau utilizează un material sigur cu beneficii pe termen lung în asigurarea productivității și stabilității pădurii (Konnert și Behm 2006).

Atât utilizarea prioritară a resurselor genetice naturale, cât și controlul circulației și utilizării materialelor forestiere de reproducere (trasabilitatea) în scopul asigurării calității și stabilității pădurii figurează drept coordonate de bază și în cadrul măsurilor ce privesc gestionarea durabilă a resurselor forestiere. Din nou, în cazul Germaniei, în standardele de certificare forestieră PEFC (“Programul de avizare a schemelor de certificare forestieră”) și FSC („Asociația pentru gestionarea durabilă a pădurilor”) se menționează - în cazul regenerării artificiale a aboretelor - atenția deosebită ce trebuie acordată alegerii proveniențelor și regulilor de transfer al materialelor forestiere de reproducere, prin utilizarea preferabilă a semințelor sau puieților cu origine verificabilă (PEFC 2009). Certificarea MFR poate fi utilă în procesul de certificare a pădurilor și în România, ambele standarde românești de certificare forestieră fiind în proces de elaborare și ameliorare.

Crearea unui sistem de amprentare a surselor de semințe figurează între preocupările actuale la nivelul UE, fiind concretizată prin interesul crescut pentru stabilirea de metode noi, lucru ce devine posibil numai în condițiile stabilirii unui sistem european de trasabilitate bazat pe probe de referință. În acest sens, în cadrul proiectului european Trees4Future (2010-prezent), pentru principalele specii forestiere de interes din Europa, una dintre componente se ocupă cu sinteza metodelor specifice existente, testate și implementate în diferite laboratoare, evidențiind și necesitățile pentru dezvoltarea unui astfel de sistem (baza de date cu probe de

referință, standardizarea metodelor de lucru în laborator, instrumente statistice etc.) (Fussi et al. 2012).

În contextul general existent, în care România este membru al UE, implementarea unor metode de trasabilitate reprezintă o cerință necesară pentru sectorul forestier național. Diversitatea formelor de relief și a condițiilor climatice din țara noastră a generat o mare diversitate a ecosistemelor forestiere naturale, ceea ce face ca utilizarea corespunzătoare a materialelor forestiere de reproducere să fie o condiție esențială pentru gestionarea durabilă a pădurilor. Ca exemplu, constituirea unei baze de date cu probe de referință din arboretele surse și anii de recoltă per nivel altitudinal poate face ca transferul pe altitudine al MFR să fie cu ușurință verificat.

În plus, în ultima perioadă România a devenit un important exportator de semințe forestiere la nivel european, citând exemplul bradului, unde principalii beneficiari sunt Germania și Anglia. În aceste condiții, este de așteptat ca rezultatele aplicării să se regăsească în beneficii direct cuantificabile, de exemplu materializate printr-o creștere a încrederii partenerilor externi și, implicit, a cererii, însoțită eventual și de deschiderea de oportunități pe noi piețe.

Concluzii

În scopul asigurării calității și stabilității pădurii, utilizarea prioritară a resurselor genetice naturale, precum și controlul circulației materialelor forestiere de reproducere (trasabilitatea) sunt coordonate de bază în cadrul măsurilor ce privesc gestionarea durabilă a resurselor forestiere.

Tehnicile bazate pe markeri moleculari au devenit un instrument esențial în verificarea identității genetice și în confirmarea originii, atât a materialelor forestiere de reproducere, cât și a lemnului. Amprentarea și identificarea materialelor de reproducere propagate vegetativ (părți de plante), dar și a semințelor pro-

venite din plantaje, este posibilă atunci când se cunoaște profilul genetic al clonelor. Pentru verificarea originii declarate a MFR sunt necesari o serie de pași, care implică compararea structurii genetice a probelor de referință pe tot parcursul etapelor de producție. Sistemul este implementat în schemele germane ZüF și FfV sau poate fi funcțional pe baza unor teste statistice de atribuire genetică, caz în care este de asemenea cunoscută structura genetică a populației de referință, fără a mai fi necesare alte probe suplimentare. În fiecare din aceste metode, microsateleții (SSR) sunt considerați cei mai eficienți, fiind totodată și cei mai utilizați.

Chiar dacă, cu unele excepții, este încă într-un stadiu de început, utilizarea markerilor genetici moleculari în certificarea materialelor forestiere de reproducere este în curs de dezvoltare la nivel european, un efort internațional pentru optimizarea și standardizarea metodelor de analiză fiind încă necesar. Implementarea procedurilor și la nivelul României ar reprezenta o conectare firească a domeniului cu tendințele existente, însoțită și de viitoare beneficii economice cuantificabile.

Mulțumiri

Studiul a fost realizat în cadrul proiectului “Trees4Future”, co-finanțat de Uniunea Europeană prin programul cadru FP7, prin grantul nr. 284181 “Trees4Future”.

Autorii mulțumesc referințelor pentru sugestiile aduse în vederea îmbunătățirii lucrării.

Bibliografie

- Botta R., Marinoni D.T., Bounous G., 2004. Molecular Markers and Certification, Proceedings from the Workshop Biotecnología Forestal, Global Biotechnology Forum, Chile, pp. 63-72.
- Comisia Europeană, 2000. Council Directive 1999/105/EC of 22 December 1999 on the marketing of forest reproductive material. Official Journal of the European Communities L11 15/1/2000: 17-40.
- Consiliul European, 2014. Materialul de reproducere a

- plantelor. Web: <http://www.european-council.europa.eu/ro/policies/animal-plant-health-package/plant-reproductive-material/>. Accesat: 12.2014.
- Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M., 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153: 1989-2000.
- Curtu A.L., Gailing O., Leinemann L., Finkeldey R., 2007. Genetic variation and differentiation within a natural community of five oak species (*Quercus* spp.). *Plant Biology* 9(1): 116-126.
- Dalvit C., De Marchi M., Cassandro M., 2007. Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science* 77: 437-449.
- Degen B., Holtken A., Rogge M., 2010. Use of DNA-Fingerprints to Control the Origin of Forest Reproductive Material. *Silvae Genetica* 59(6): 268-273.
- Degen B., Ward S.E., Lemes M.R., Navarro C., Cavers S., Sebbenn A.M., 2013. Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints.
- De-Lucas A., Santana J.C., Recio P., Hidalgo E., 2008. SSR-based tool for identification and certification of commercial *Populus* clones in Spain. *Annals of Forest Science* 65(1): 1-7.
- Excoffier L., Heckel G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics* 7(10): 745-758.
- Finkeldey R., Leinemann L., Gailing O., 2010. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1251-1258.
- Fussi B., Belle C., Konnert M., Blanc-Jolivet C., Liesebach M., Buiteveld J., Piotti A., Vendramin G.G., Wagner S., Petit R.J., Jahn D., Henze B., 2012. Report on review of available and tested methods for identification and on news marker development. Web: <http://www.trees4future.eu>. Accesat: 12.2014.
- Hasenkamp N., Ziegenhagen B., Mengel C., Schulze L., Schmitt H.-P., Liepelt S., 2011. Towards a DNA marker assisted seed sources identification: a pilot study in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Research* 130: 513-519.
- Kirst M., Cordeiro C.M., Rezende G.D.S.P., Grattapaglia D., 2005. Power of microsatellites markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. *Journal of Heredity* 96 (2): 161-166.
- Konnert M., Behm A., 2006. Proof of identity of forest reproductive material based on reference samples. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- u. Holzwirtschaft (BFH)* 221: 61-71.
- Konnert M., Hosius B., 2008. Zur Kontrolle und Zertifizierung von forstlichem Vermehrungsgut unter Nutzung von Labormethoden. Tagungband „Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden”. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden, pp. 132-139.

- Konnert M., Ruetz W., 2006. Genetic aspects of artificial regeneration of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in Bavaria. *European Journal of Forest Research* 125: 261-270.
- Konnert M., Cremer E., Förstel H., 2008. Umsetzung und Verbesserung des ZüF-Verfahrens mit Hilfe genetischer Analysen und der Stabilisotopen-Methode am Beispiel von Bergahorn, Fichte und Weißtanne. In: *Herkunfts-kontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden*, Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann Munden, pp. 85-100.
- Ministerul Mediului și Schimbărilor Climatice, 2013. Raport Național privind Starea Mediului anul 2012. Web: http://www.anpm.ro/anpm_resources/migrated_content/uploads/116008_RSM-2012.pdf. Accesat: 12.2014.
- Ministerul Mediului și Schimbărilor Climatice, 2013. Raport Național privind Starea Mediului anul 2013. Web: <http://www.anpm.ro>. Accesat: 12.2014.
- Parlamentul României, 2011. Legea nr. 107 din /15 iunie 2011 privind comercializarea materialelor forestiere de reproducere. *Monitorul Oficial* nr. 430/20.06.2011.
- Parlamentul României, 2004. Legea nr.161 din /14 mai 2004 pentru aprobarea Ordonanței Guvernului nr. 11/2004 privind producerea, comercializarea și utilizarea materialelor forestiere de reproducere. *Monitorul Oficial* nr. 466/25.05.2004.
- Liesebach H., Schneck v., Ewald E., 2010. Clonal fingerprinting in the genus *Populus* L. by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids. *Trees Genetics & Genomes* 6(2): 259-269.
- Lindgren D., Karlsson B., Andersson B., Prescher F., 2008. The Swedish seed orchard program for Scots pine and Norway spruce. In: Lindgre D. (ed.), *Seed Orchard Conference*, Umea, Sweden, 26-28 September 2007. Swedish University of Agricultural Science and TreeBreedEx.
- Martín J.A., Solla A., Venturas M., Collada C., Domínguez J., Miranda E., Fuentes P., Buron M., Iglesias S., Gil L., 2014. Seven *Ulmus* minor clones tolerant to *Ophiostoma novo-ulmi* registered as forest reproductive material in Spain. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, DOI: 10.3832/ifer1224-008.
- Ministerul Mediului și Schimbărilor Climatice, 2013. Regulament din 2 iulie 2013 privind controlul producătorilor, furnizorilor și beneficiarilor de materiale forestiere de reproducere. *Monitorul Oficial* 419/10 iulie 2013.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Neale D.B., Sederoff R.R., 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 212-216.
- Neale D.B., Sederoff R.R., 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 212-216.
- Guvernul României, 2004. Ordonanța nr.11 din/ 22 ianuarie 2004 privind producerea, comercializarea și utilizarea materialelor forestiere de reproducere. *Monitorul Oficial* nr. 85/30.01.2004.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck, C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4(3):347-354.
- PEFC, 2009. PEFC - Standards für Deutschland. Leitlinie für nachhaltige Waldbewirtschaftung zur Einbindung des Waldbesitzers in den regionalen Rahmen. Web: https://pefc.de/tl_files/dokumente/fuer_waldbesitzer/pefc_Standards_01012011.pdf. Accesat: 12.2014.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J. M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A., 2004. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95(6): 536-539.
- Rajora O.P., Rahman M.H., 2003. Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus x canadensis*) cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 470-477.
- Rannala B., Mountain J.L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9197-9201.
- Schroeder H., Fladung M., 2014. Differentiation of *Populus* species by chloroplast SNP markers for barcoding and breeding approaches. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, DOI: 10.3832/ifer1326-007
- MCPFE 2012. State of Europe's Forests 2011. Status and Trends in Sustainable Forest Management Europe MCPFE FOREST EUROPE Liaison Unit Oslo, 69 p.
- Stimm B., 1995. Experimental plantation of Douglas fir provenances and other conifers at Kaiserslautern established in 1912: results after eight decades of observation. *Proceedings IUFRO WP Meeting in Limoges, Grance, 01-04 August 1995*.
- Vendramin G.G., Anzidei M., Madaghiale A., Sperisen C., Bucci G., 2000. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 43: 68-78.
- Ziegenhagen B., Liepelt sS., Kuhlenkamp V., Fladung M., 2003. Molecular identification of individual oak and fir trees from maternal tissue of their fruits or seeds. *Trees: Structure and Function* 17(4): 345-350.