

STAȚIUNEA DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU POMICULTURĂ BISTRIȚA

Str. Drumul Dumitrei Nou, nr. 3, cod 420127, Bistrița

tel. 0263-217895, tel/fax. 0263-214752,

www.scdp-bistrita.ro



ADER 4.1.3. Studiul impactului prunului transgenic rezistent la Plum pox potyvirus asupra organismelor nevizate si evaluarea stabilității rezistenței și a performanțelor agronomice ale acestuia în contextul protejării mediului și a sănătății consumatorilor.

Plan Sectorial ADER

ADER 4.1.3/06.10.2015

- Titlul proiectului: *Studiul impactului prunului transgenic rezistent la Plum pox potyvirus asupra organismelor nevizate si evaluarea stabilității rezistenței și a performanțelor agronomice ale acestuia în contextul protejării mediului și a sănătății consumatorilor.*
- Valoarea proiectului: 762.500 lei
- Valoare faza 1/2015: 162.850 lei
- Perioada de derulare a proiectului: 06.10.2015-31.12.2018
- Perioada fazei 1/2015: 06.10.2015-15.12.2015

Finanțator: Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale (MADR)

Contractor: Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița (SCDP Bistrița)

- Director de proiect: Dr. Ing. Zagrai Ioan

Partener: Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca (USAMV Cluj) – P1

- Responsabil P1: Prof. Univ. Dr. Mărghițaș Liviu ALEXANDRU

Virusul *Plum pox* (PPV)



Foto 1. Căderea prematură a fructelor



Foto 2. Deformarea fructelor



Foto 3. Necroză în pulpă

Virusul *Plum pox* (PPV) care produce boala denumită Sharka, este cel mai distructiv agent patogen viral al speciilor pomicele sămburoase, deoarece provoacă grave pierderi de producție (până la 100% la soiurile sensibile), în principal prin căderea prematură a fructelor (Foto 1), dar și deprecieri calitative prin deformarea fructelor (Foto 2), necroze în pulpă (Foto 3), dezechilibre între zahăr și aciditate, fructele devenind practic improprii consumului.

Virusul *Plum pox* a fost identificat pentru prima oară în Bulgaria în 1918, iar apoi s-a răspândit progresiv pe tot continentul European, iar mai târziu și pe celelalte continente, devenind astfel o problemă de interes mondial.

Prunul transgenic – potențial de combatere eficientă a PPV

- Nu există nicio metodă curativă de combatere în livadă a virusului *Plum pox*.
- Este aproape unanim acceptat că obținerea unor soiuri de prun cu adevărat rezistente la PPV și cultivarea lor pe scară largă rămâne principala strategie de luptă eficientă împotriva acestui periculos patogen.
- Prunul transgenic HoneySweet, rezultat al biotehnologiei, pare să reprezinte o soluție pentru limitarea impactului PPV în special în țările endemice, cum este și cazul României.

1.Obiectivul proiectului vizează „studiul potențialului utilizării prunului transgenic în combaterea eficientă a virusului Plum pox, în contextul reducerii poluării mediului de abuzul utilizării pesticidelor și a efectului neutral asupra organismelor nevizate”.

2.Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului:

- Obținerea de date privind potențialul impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide vectoare;
- Analiza comparativă a preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali;
- Date privind potențialul productiv și calitativ al prunului transgenic în condițiile endemice de PPV din România;
- Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV și obținerea de fructe libere de virus;
- Evaluarea posibilității de reducere a numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor în scopul producerii de prune cu mai puține reziduuri de insecticide;
- Realizarea unei broșuri cu informații utile referitoare la prunul transgenic;
- Recomandări pentru politica națională referitoare la OMG-urile cu insert similar prunului transgenic.

3.Obiectivul fazei 1:

- Elaborare model experimental si metodologie de lucru.

4.Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului fazei 1:

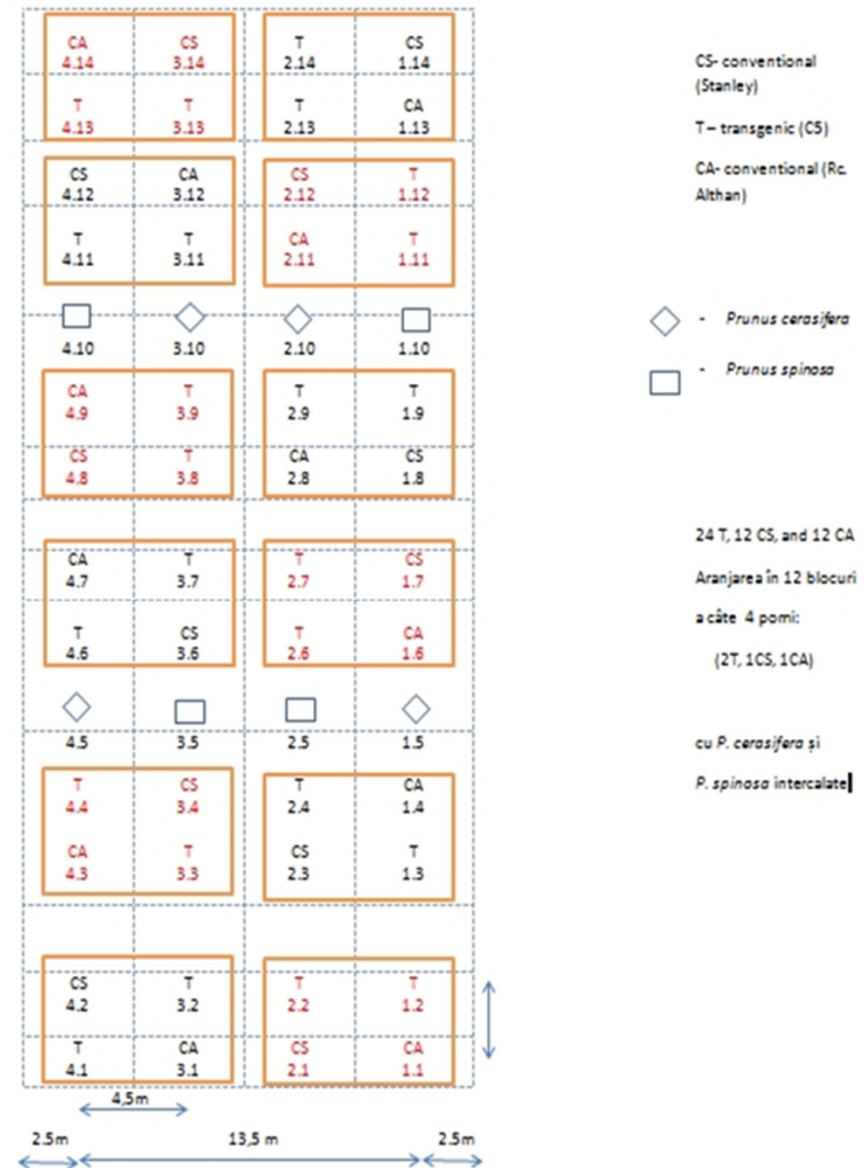
- Elaborarea schemei câmpului experimental după un design statistic și descrierea metodologiei de lucru conform practicilor internaționale.

Elaborare schemă câmp experimental

Pentru prima etapă (faza 1/2015) s-a prevăzut și realizat integral activitatea privind **elaborarea schemei câmpului experimental după un design statistic și descrierea metodologiei de lucru (A1.1)** conform practicilor internaționale.

Experiențele în câmp sunt organizate în cadrul unui lot experimental care conține atât pruni transgenici, cât și pruni convenționali, ceea ce permite o analiză comparativă (convențional-transgenic) care să conducă la atingerea obiectivelor asumate.

Lotul experimental, înființat în primăvara lui 2013, conține 56 de pomi, din care: 24 pruni transgenici (soiul HoneySweet), 24 pruni convenționali (12 pomi din soiul Renclod Althan și 12 din soiul Stanley), 4 pomi din specia *Prunus cerasifera* și 4 pomi din specia *Prunus spinosa*. Lotul este construit după un design statistic cu 12 blocuri a câte patru pomi fiecare (doi pruni transgenici – soiul Honey Sweet + doi pruni convenționali – soiurile Stanley și Renclod Althan).



Metodologia de lucru elaborată pentru întreaga perioadă de derulare a proiectului cuprinde trei piloni de bază, după cum urmează:

- ***Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide vectoare și stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali.*** Activitățile presupun:
 - Monitorizarea afidelor vectoare pe durata perioadei de vegetatie;
 - Evaluarea comparativă a preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali.
- ***Stabilirea potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.*** Activitățile presupun:
 - Evaluarea potențialul productiv și calitativ al fructelor ;
 - Determinări privind compoziția chimică a fructelor;
 - Efectuarea unui numar mai redus de tratamente cu insecticide.
- ***Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV.*** Activitățile presupun:
 - Evaluarea starii fitovirale;
 - Evaluarea stabilității și durabilității mecanismului de rezistență al prunului transgenic.

Schema sintetică de realizare a proiectului

Pentru fiecare din cele trei etape rămase (2 - 2016, 3 - 2017 și 4 - 2018) se va aplica o metodologie de lucru structurată pe baza celor trei piloni menționați anterior, astfel:

2015		2016-2018
A 1.1. Elaborare model experimental și metodologie de lucru (CP).		A 1. Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide vectoare și stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali (CP).
		A 2. Evaluarea potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor (CP, P1).
		A 3. Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV (CP).
		A 4. Diseminare, exploatare a rezultatelor (CP, P1).

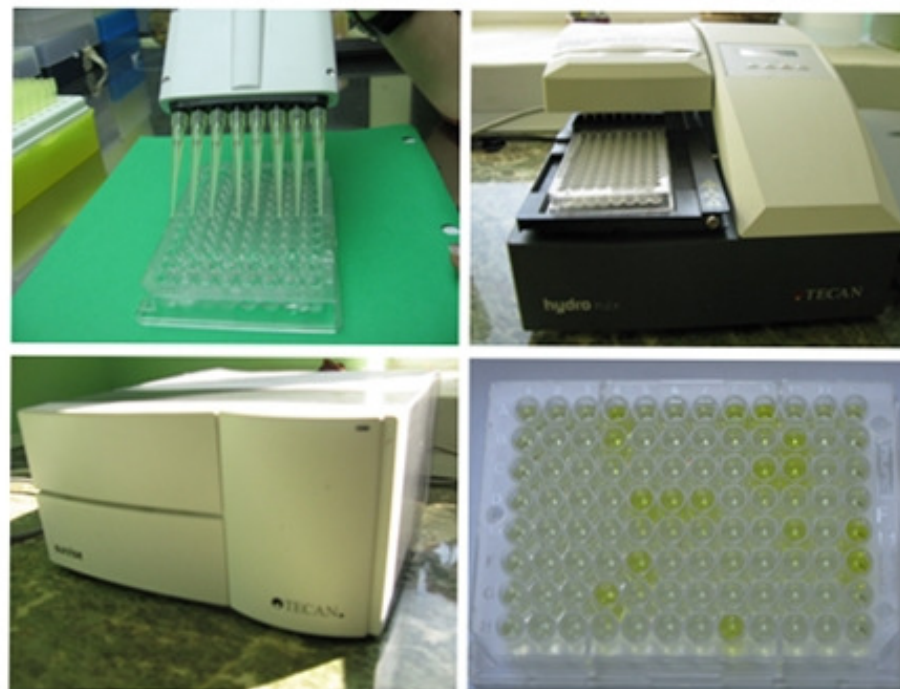
Instrumente, echipamente, software utilizate pentru realizarea proiectului

- SCDP Bistrița deține un laborator de virusologie dotat cu echipamente performante și resursă umană specializată în cercetări de virologie și biosecuritate, unde vor fi efectuate analizele serologice (DAS/TAS-ELISA) și moleculare (IC-/RT-PCR) de diagnostic viral, precum și tehnica de monitorizare a afidelor (Sticky shots).
- USAMV Cluj-Napoca deține un laborator de control al calității produselor apicole și personal specializat pentru efectuarea analizelor biochimice la fructe (aciditate titrabilă, spectrul glucidic, vitamina C, cenușa, umiditate, lipide, proteine, minerale, polifenoli, etc).

Tehnicile și metode care vor fi utilizate pe parcursul derulării acestui proiect

a). Tehnici serologice de diagnostic viral

Tehnica enzimei legata de antigen sau prescurtat prin initialele **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) este utilizată în mod larg pentru detectarea rapidă a fitovirusurilor. Există multe variante ale testului de bază, însă cea mai folosită metodă este tehnica Double Antibody Sandwich sau prescurtat prin initialele DAS (Clark și Adams, 1977). Principiul metodei este ca din componența sandwichului anticorp-antigen-anticorp conjugat, partea de enzimă specifică hidrolizează substratul și astfel, culoarea acestuia se schimbă (antigenul este legat de anticorpul fixat și peliculizat pe plăcile de polistiren) realizându-se evidențierea virusului. Această reacție de culoare se poate detecta prin intermediul unui fotometru, a cărui intensitate este direct proporțională cu concentrația virală. Proba în cauză se poate considera infectată dacă valoarea extincției depășește media controalelor sănătoase de două ori (Maxim și colab 2003).



Pentru diagnostic serologic se pot folosi atât antiseruri policlonale, cât și monoclonale universale. Pentru identificarea sușelor virale se utilizează antiseruri monoclonale specifice. Varianta TAS/DASI-ELISA face posibilă diferențierea serologică a tulpinilor PPV prin utilizarea antiserurilor monoclonale specifice care ținesc diferite părți ale proteinei capsidale (specifice fiecărei tulpini) – Cambra și colab., 2006.

b). Tehnici moleculare de diagnostic viral

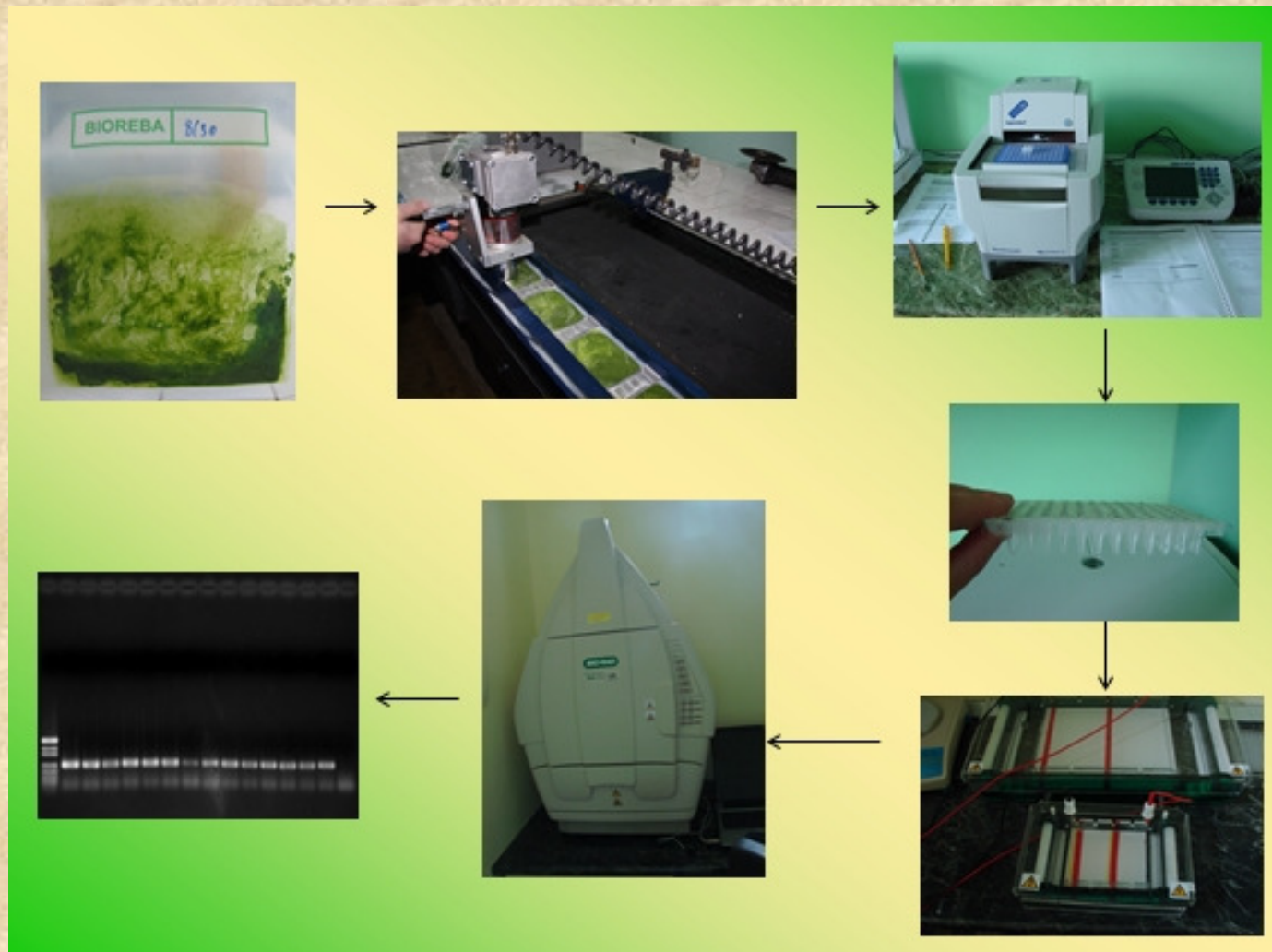
Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction) permite o detectare rapidă, specifică și sensibilă, care se poate aplica pentru o arie largă de agenți patogeni virali (Wetzel și colab., 1991, Hadidi și colab., 1995). Reacția PCR este un proces enzimatic, care realizează amplificarea exponențială a moleculei de ADNc țintă. Prin intermediul tehnicii PCR, ARN-ul nu se poate amplifica direct. De aceea, pentru diagnosticarea virusurilor se folosește tehnica RT-PCR (PCR de tip reverstranscripțional).

Transcrierea ARN viral în ADNc (ADN complementar) este realizată de către o enzimă denumită reverstranscriptaza. Pentru realizarea detectării trebuie izolat ARN total sau ARN viral. Deși are mare sensibilitate în comparație cu tehnica ELISA, metoda are un dezavantaj, și anume că atât izolarea acizilor nucleici cât și amplificarea sunt mai costisitoare. De aceea, pentru analiza unui număr foarte mare de probe, se recurge adesea doar la tehnica DAS-ELISA.

Metodologia de lucru utilizată în laboratorul de virusologie de la SCDP Bistrița pentru detecția virusului *Plum pox* prin **RT-PCR**, (după Wetzel și colab., 1991, 1992, Levy și Hadidi, 1994, Olmos și colab., 1997) presupune parcurgerea următoarelor etape:

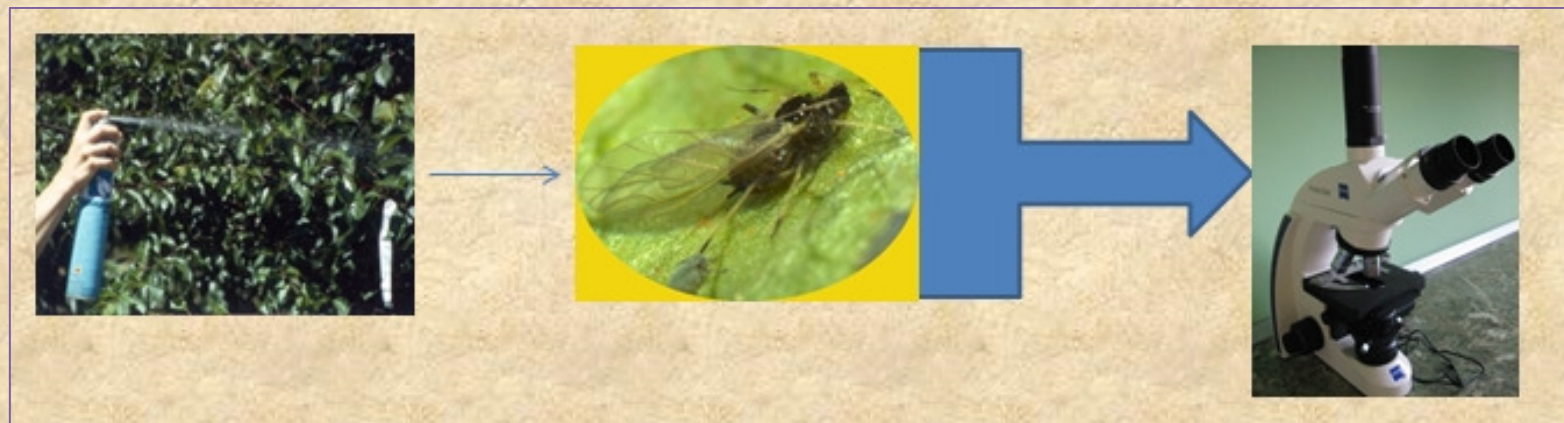
- Extracția ARN-ului total din frunzele de prun care prezintă simptome ale infecției cu *Plum pox*;
- Revers-transcrierea și amplificarea cu primeri specifici regiunilor genomice țintă;
- Electroforeza în gel de agaroză.

În cazul tehnicii **IC-RT-PCR** se poate elimina izolarea ARN, folosind unui antiser specific viral (Wetzel și colab., 1992). Primul pas este asemănător testului ELISA, probele sunt pregătite, iar virusul existent în extractul vegetal se leagă de antiserul fixat în prealabil pe peretii interiori ai tubului PCR (immunocapture - IC). Ulterior, odată cu degradarea proteinei capsidale și transcrierea ARN, ADN complementar se poate amplifica în mod similar tehnicii anterioare.



c) Tehnici de monitorizare pentru afide

Afidele vectoare vor fi monitorizate utilizând metoda '**Sticky Shot**' (Avinet și colab., 1993; Cambra și colab., 2000; 2004; Marroquin și colab., 2004).



d). Analize biochimice la fructe

Analizele biochimice la fructe vor fi efectuate de către P1 (USAMV Cluj) într-un laborator acreditat, echipat cu aparatură performantă, ce constă în: termometru digital, balanță tehnică, balanță analitică, centrifugă cu răcire, microscop, ultrapurificator, bidistilator, extractor în fază solidă, agitator, pH-metru, baie termostatăată cu indicator de temperatură (de sonicare), rotavapor, pipete semiautomate, analizor multiparametru, refractometru, lichid cromatograf, gaz cromatograf, termocycler, hota cu flux laminar, linie de elctroforeză, transiluminator, autoclave.

Concluzii

În prima fază a fost realizat integral obiectivul, respectiv activitatea cuprinsă în Planul de realizare, și anume *A1.1 - Elaborare model experimental și metodologie de lucru*, documentarea științifică fiind focalizată pe realizarea unui plan coerent, care să ducă la îndeplinirea sarcinilor asumate.