

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 2/2016: 200.000 lei
- Perioada de derulare a proiectului: 06.10.2015-31.12.2018
- Perioada fazei 2/2016: 16.12.2015-20.11.2016

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

Faza: 2

Termen de finalizare: 20.11.2016

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.Obiectivele fazei 2 vizează obținerea unor rezultate parțiale (primul an de experimentare) privind:

- 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.
- Stabilirea potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.
- Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV.

4. Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivelor fazei:

- Rezultatele primului an de studiu privind:
 - - potențialul impact al transgenelor asupra afidelor vectoare și a preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali;
 - - potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet;
 - - stabilitatea și durabilitatea rezistenței prunului transgenic la infecțiile naturale cu PPV.

Prezentarea la un simpozion a unor rezultate parțiale.

Faza II cuprinde patru activități care se regasesc și în fazele anilor 2017 si 2018, astfel încat prin cumulara rezultatelor să putem formula concluziile cercetărilor întreprinse.

Activitățile se referă la:

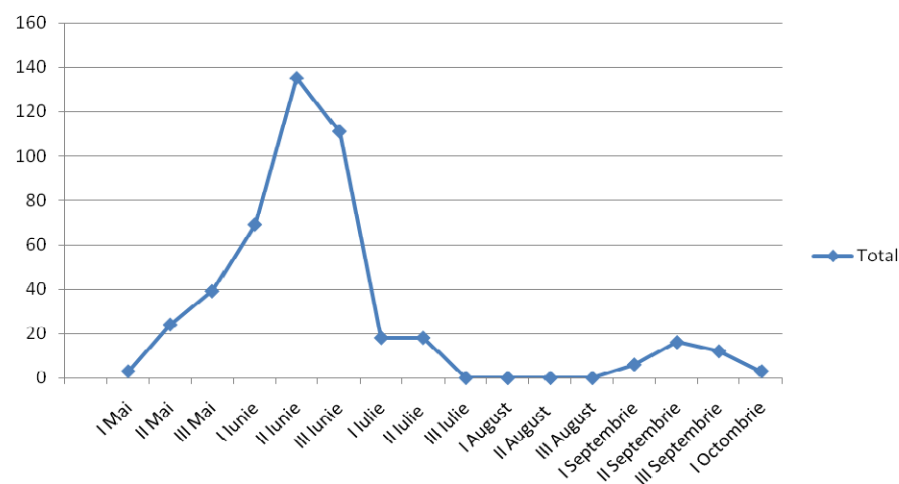
- **Activitate 2.1 - Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide vectoare și stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali.**
- **Activitate 2.2 – Evaluarea potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.**
- **Activitate 2.3 – Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV.**
- **Activitate 2.4 - Diseminare rezultate.**

Rezultate obținute

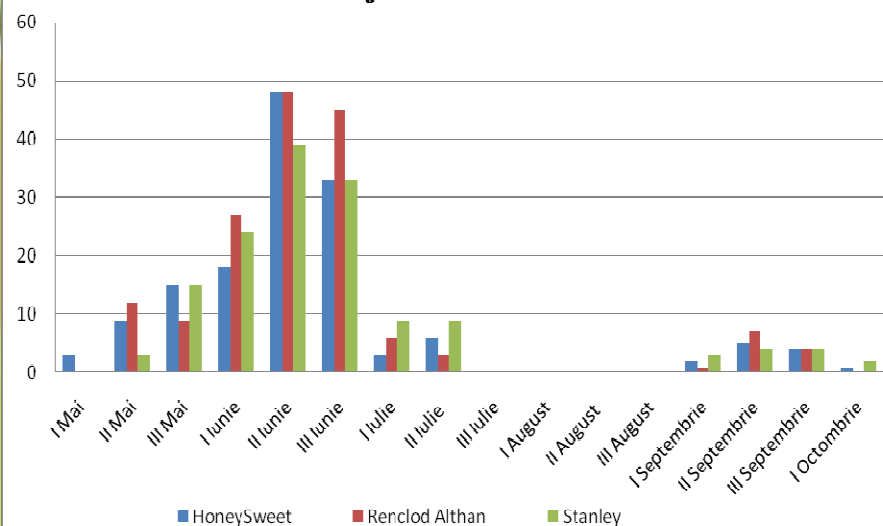
Activitate 2.1 - Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide vectoare și stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali.

a). Monitorizarea afidelor vectoare

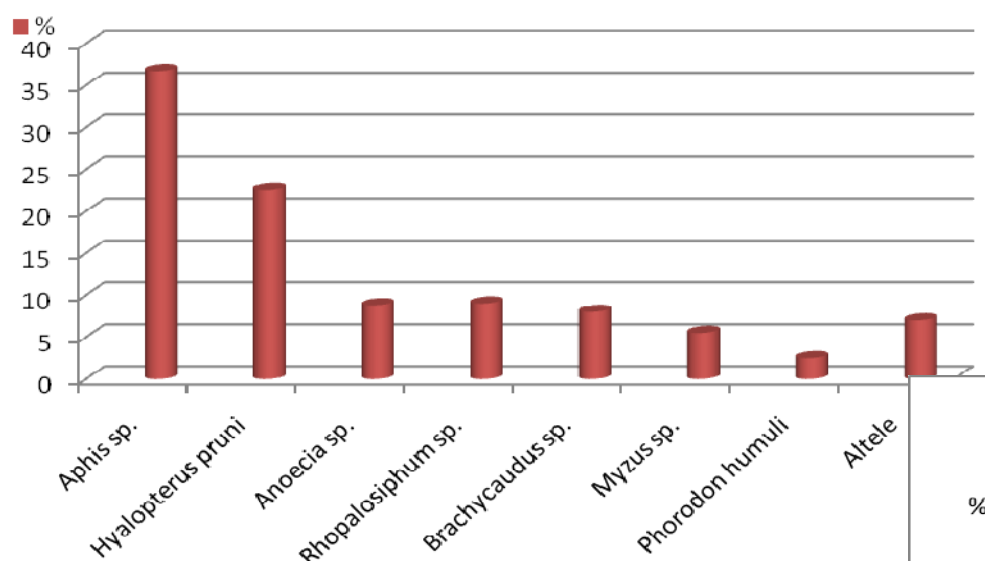
Curba de zbor a afidelor vectoare capturate in anul 2016 la SCDP Bistrita



Numarul total de afide colectate pe soiuri, pe parcursul perioadei de vegetatie a anului 2016

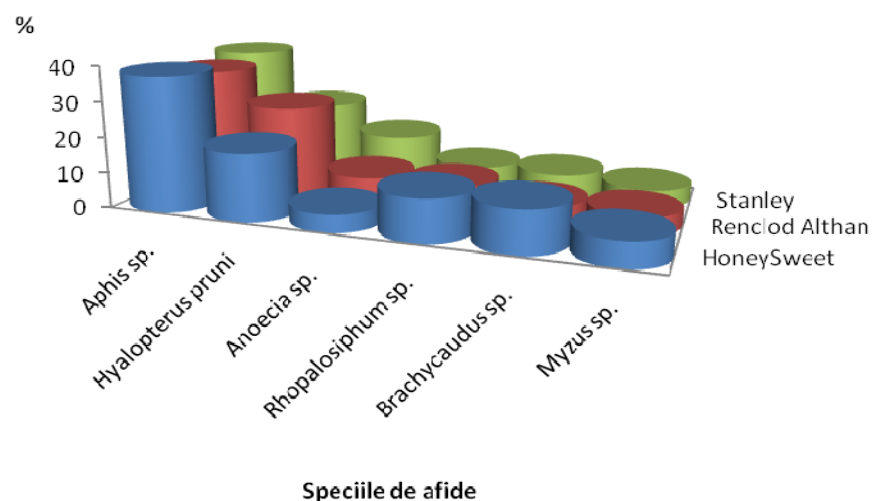


Rezultatele primului an de evaluare al potențialului impact al transgenelor asupra afidelor vectoare reliefează o similaritate a numărului și speciilor de afide care au populat cele două categorii de prun, ceea ce ar putea fi un prim indiciu al efectului neutral al prunului transgenic asupra populațiilor indigene de afide vectoare. Aceste rezultate sunt doar parțiale și necesită cumularea cu alte rezultate din următorii doi ani de observații și determinări pentru o concluzie finală. Cercetările continuă pe încă două perioade de vegetație (2017 și 2018) pentru a putea formula o concluzie pertinentă referitoare la această tematică de studiu.



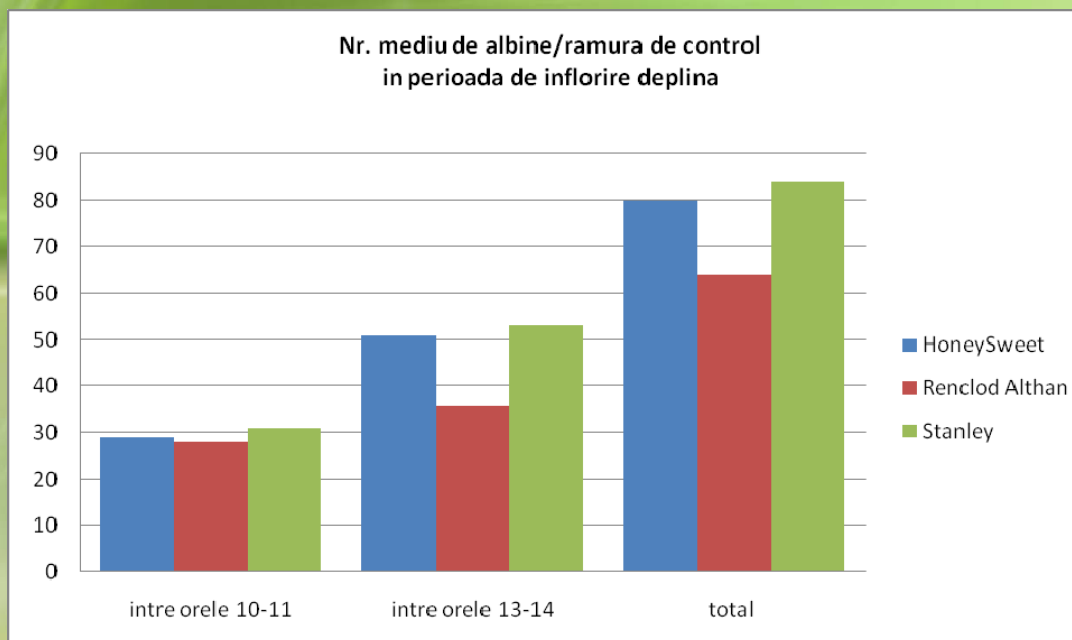
Speciile de afide capturate în anul 2016 la cele trei soiuri din lotul experimental

Speciile de afide capturate pe soiuri în anul 2016, la SCDP Bistrita



b) Stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali

Rezultatele primului an de evaluare privind potențiala preferință a albinelor pentru prunul transgenic sau convențional relevă o mare similaritate a numărului total de albine prezente la prunul transgenic HoneySweet (80 albine) și soiul Stanley (84 albine). A existat însă o diferență apreciabilă între numărul albinelor prezente la cele două soiuri menționate și soiul Renclod Althan. Privite în ansamblu rezultatele din anul 2016 relevă o situație interesantă privind prezența albinelor la cele trei soiuri de prun, în sensul diferenței înregistrate între două soiuri convenționale (Renclod Althan și Stanley) pe de o parte și între un soi convențional și unul transgenic pe de alta parte. Pentru o concluzie pertinentă sunt necesari mai mulți ani de cercetare. Prin urmare, cercetările continuă pe încă două perioade de vegetație (2017 și 2018) pentru a putea obține rezultate suficiente care să permită elaborarea unei concluzii referitoare la această tematică de studiu.



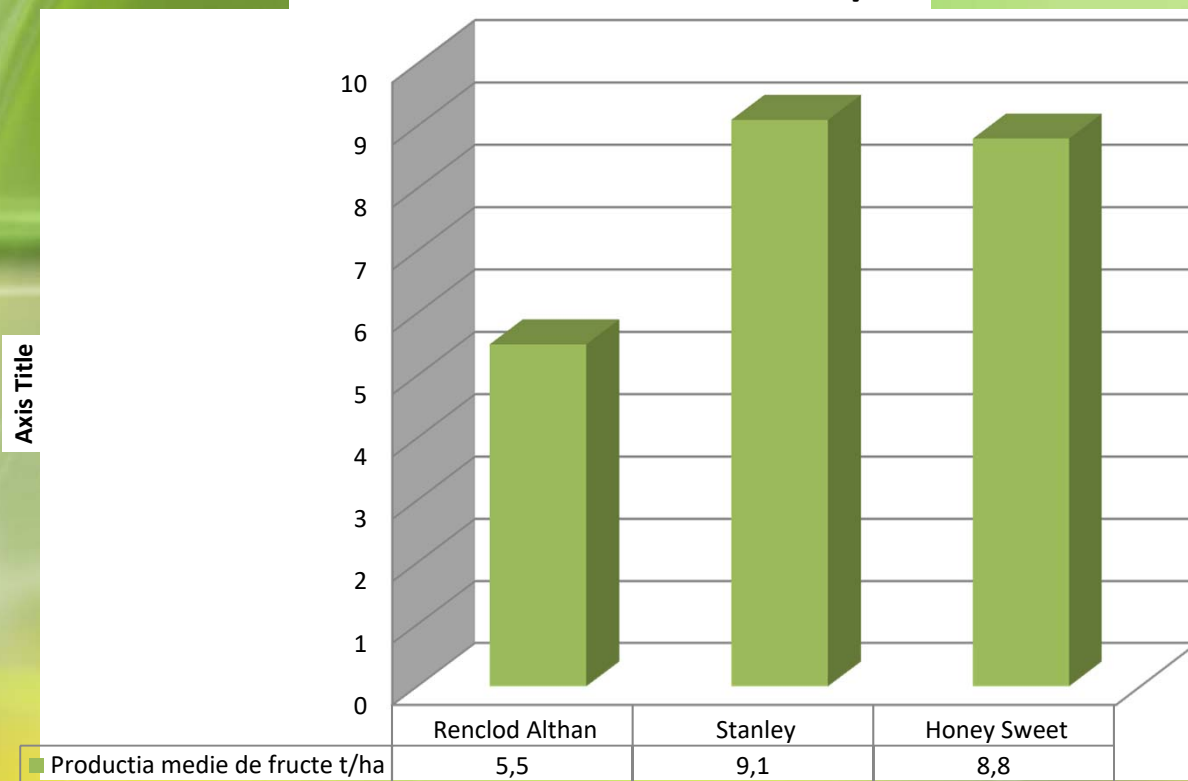
Reprezentarea grafică a numărului de albine care au vizitat cele trei soiuri de prun în perioada de suprapunere a înfloritului, în anul 2016

Activitate 2.2. Stabilirea potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.

Potențialului productiv:

- Rezultatele preliminare (primul an de evaluare) privind productivitatea relevă o similaritate a producției la soiul Stanley și la prunul transgenic HoneySweet, cu o tendință ușor favorabilă soiului Stanley. Astfel, soiul HoneySweet a înregistrat o producție medie de 8,8 t/ha, iar soiul Stanley de 9,1 t/ha. Soiul Renclod Althan a realizat o producție de 5,5 t / ha, mult mai mică decât la prunul transgenic HoneySweet și la soiul Stanley.

Productia medie de fructe t/ha

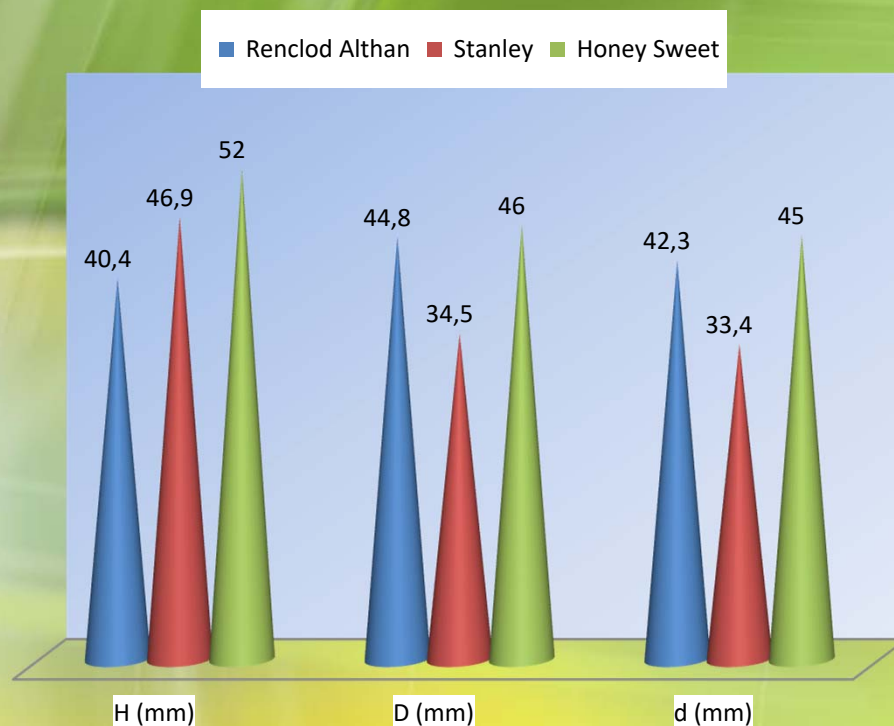


Potențialul calitativ:

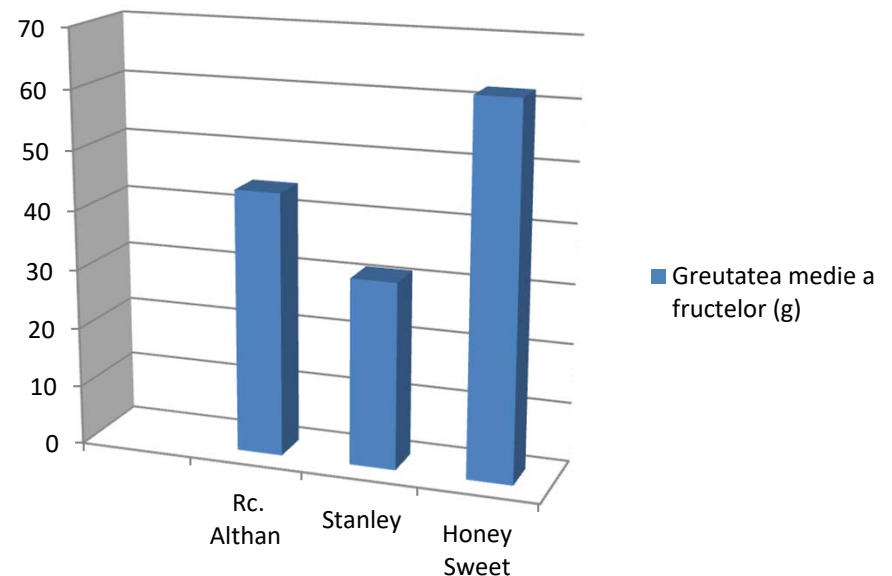
a) Biometrie și însușiri fenotipice

- **Greutatea medie a fructelor** reliefează superioritatea netă a soiului de prun transgenic HoneySweet față de soiurile de prun convențional Renclud Althan și Stanley pentru aceasta caracteristică. Greutatea medie a fructelor la soiul HoneySweet a fost aproape dublă față de cea a soiului Stanley (62,1 g față de 31,4 g) și la o diferență de 17,8 g față de soiul Renclud Althan. Mai mult, fructele soiului de prun transgenic au fost mai uniforme din punct de vedere a greutății comparativ cu cele două soiuri convenționale.

Biometria fructelor
înălțime (H), diametrul mare (D), diametrul mic (d)



Greutatea medie a fructelor (g)



Soiul transgenic HoneySweet a avut o pondere a sâmburilor în greutatea fructelor de doar 3,5 %, mai mică chiar decât a soiului Renclo Althan, la care greutatea sâmburilor a reprezentat 3.7%.

La soiul Stanley ponderea sâmburilor în greutatea fructelor a reprezentat 6,2%, aproape dublă față de cea înregistrată la prunul transgenic. Se constată astfel o superioritate a soiului de prun transgenic HoneySweet, în principal, față de soiul Stanley în ceea ce privește ponderea sâmburilor în greutatea fructelor.

Greutatea medie a sâmburilor (g)

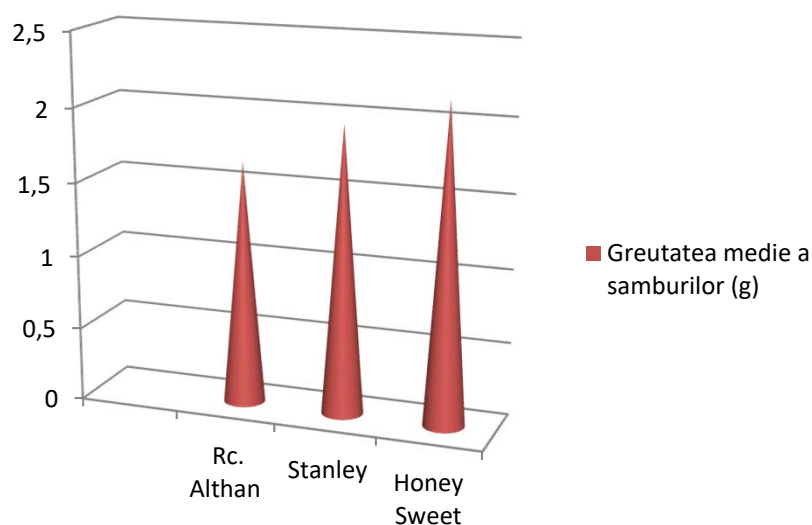
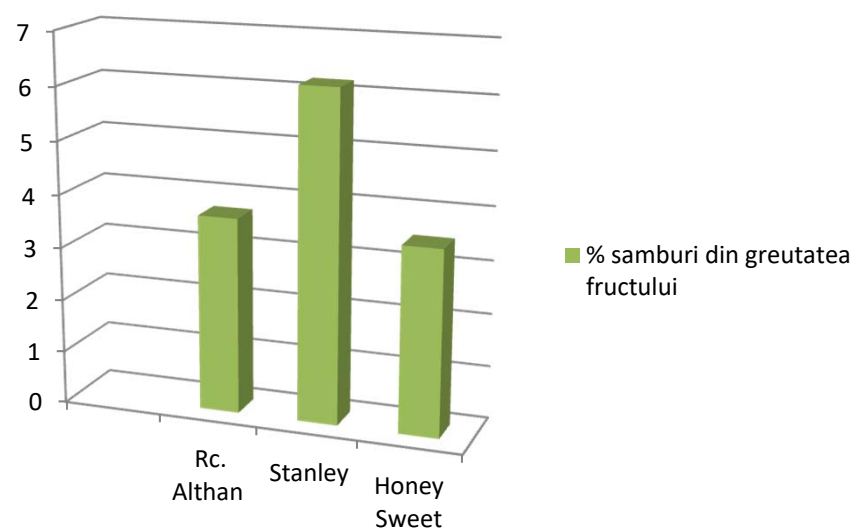


Fig. 12. % samburi din greutatea fructului



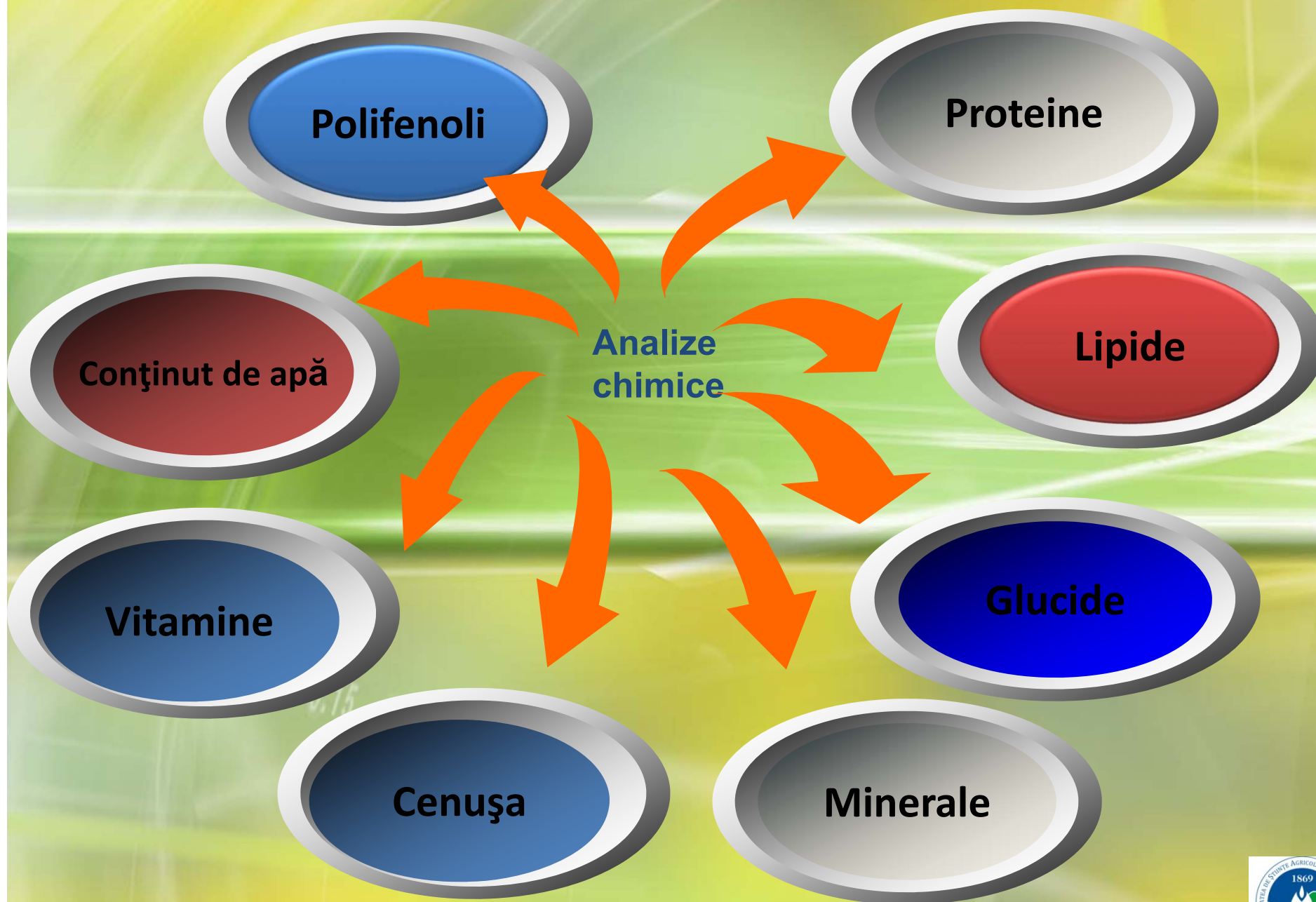
Măsurătorile biometrice relevă că nici unul dintre cele trei soiuri nu prezintă o simetrie perfectă. Totuși, soiul de prun transgenic HoneySweet are forma ovală, destul de regulată, comparativ cu soiul Stanley.

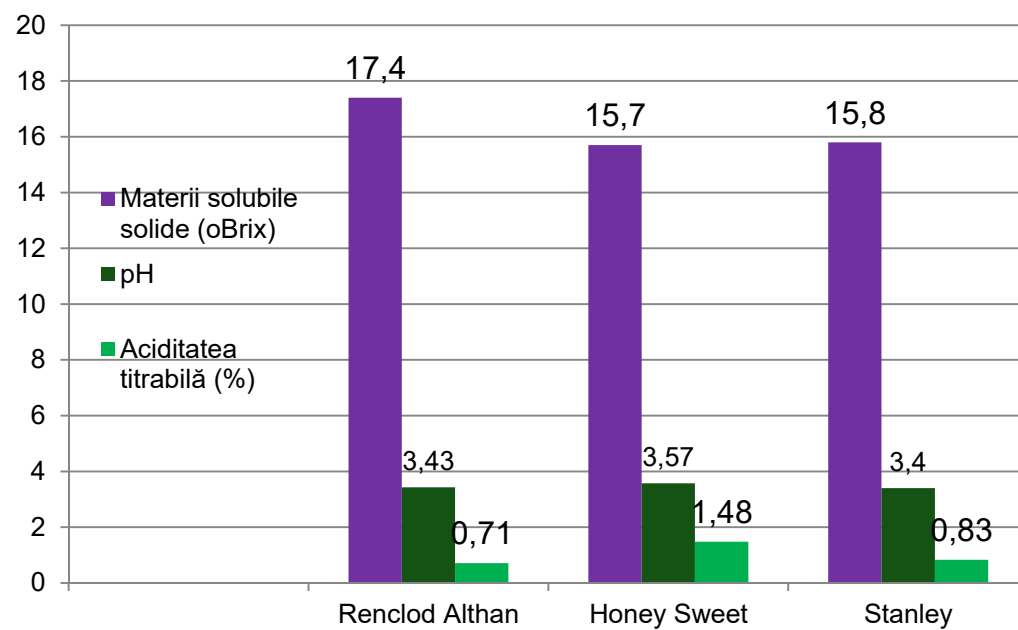
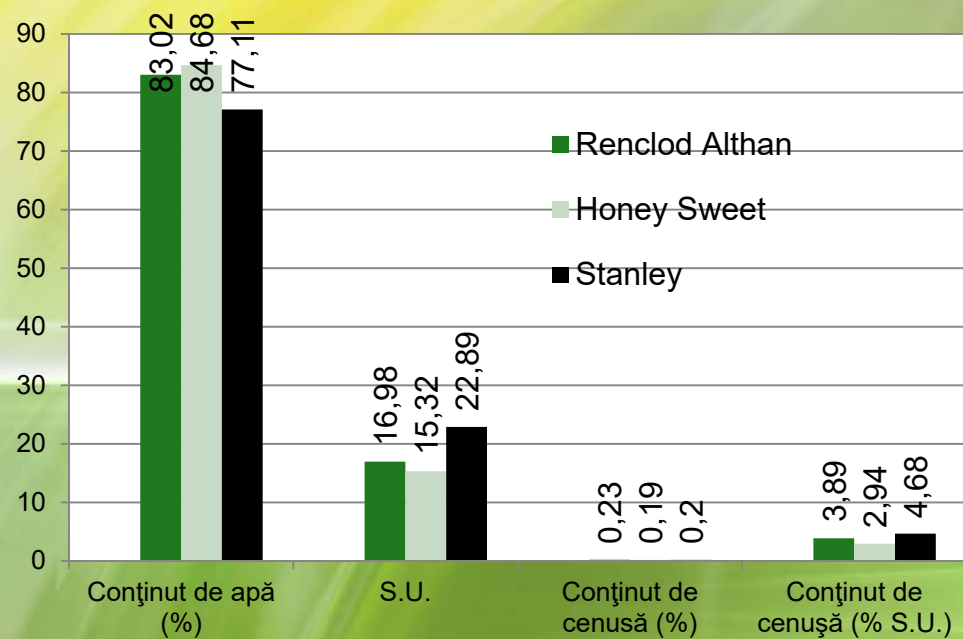
Din punct de vedere al **atractivității**, analiza comparativă cu soiurile Stanley și Renclod Althan reliefează superioritatea soiului HoneySweet. Astfel, mărimea fructului este net superioară comparativ cu celelalte două soiuri analizate. Forma fructului la soiul HoneySweet este una destul de regulată, ovală. În ceea ce privește mărimea și cololația fructelor, soiurile HoneySweet și Stanley au prezentat un grad de uniformitate mai ridicat comparativ cu soiul Renclod Althan.



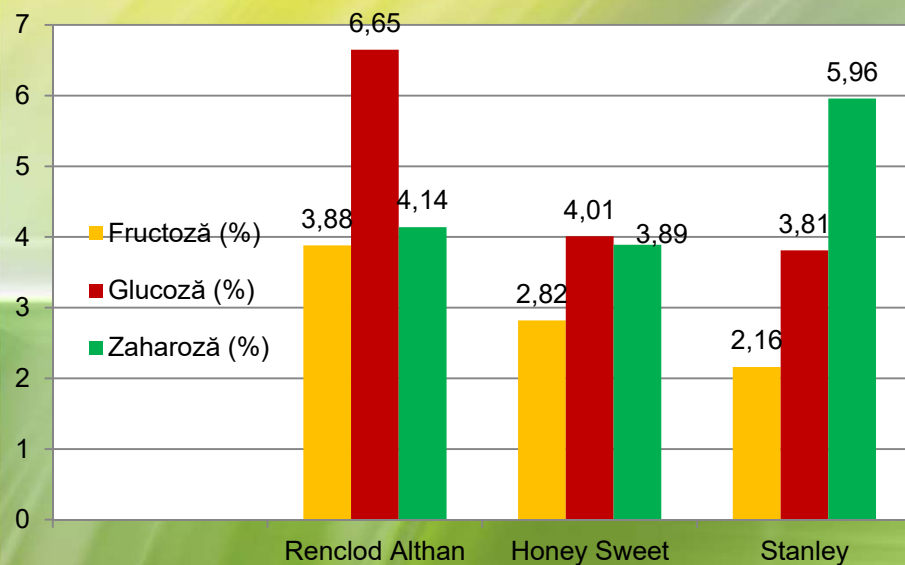
Aspectul fructelor la soiul de prun transgenic HoneySweet

b) Compozitia chimica a fructelor

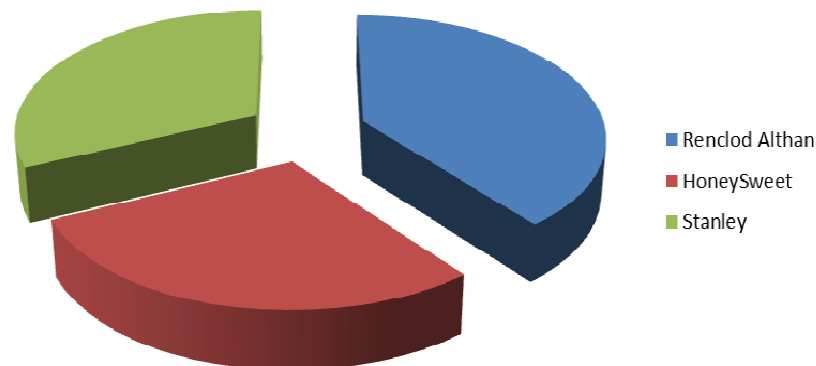




Determinarea glucidelor prin HPLC-IR



Continut mai ridicat de glucide a prezentat soiul Renclod Althan, cu evidențierea conținutului de glucoză. Soiul Stanley s-a remarcat printr-un conținut mai ridicat în zaharoză. Soiul Honey Sweet a avut un conținut echilibrat de glucide individuale



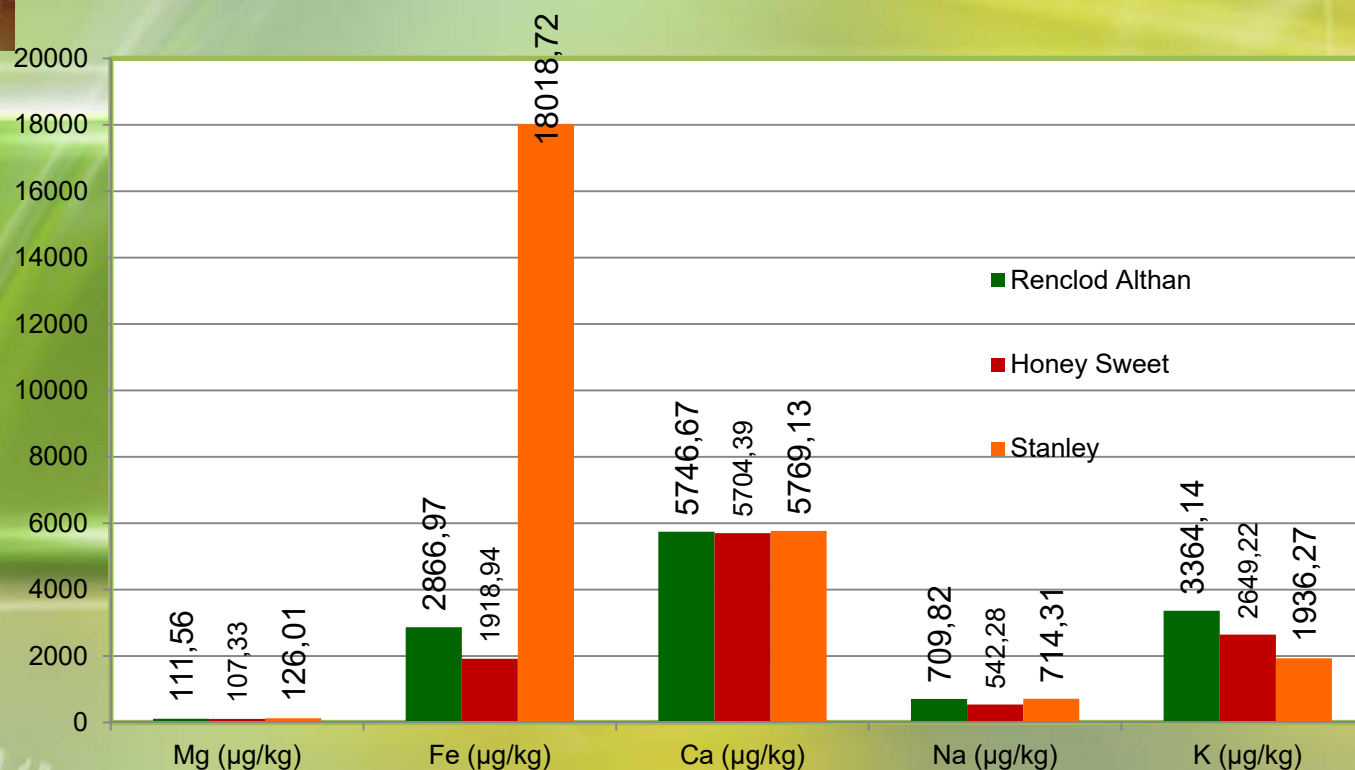
Conținutul de glucide totale la soiurile de prun din lotul experimental

Conținutului de lipide și proteine totale la soiurile de prune din lotul experimental



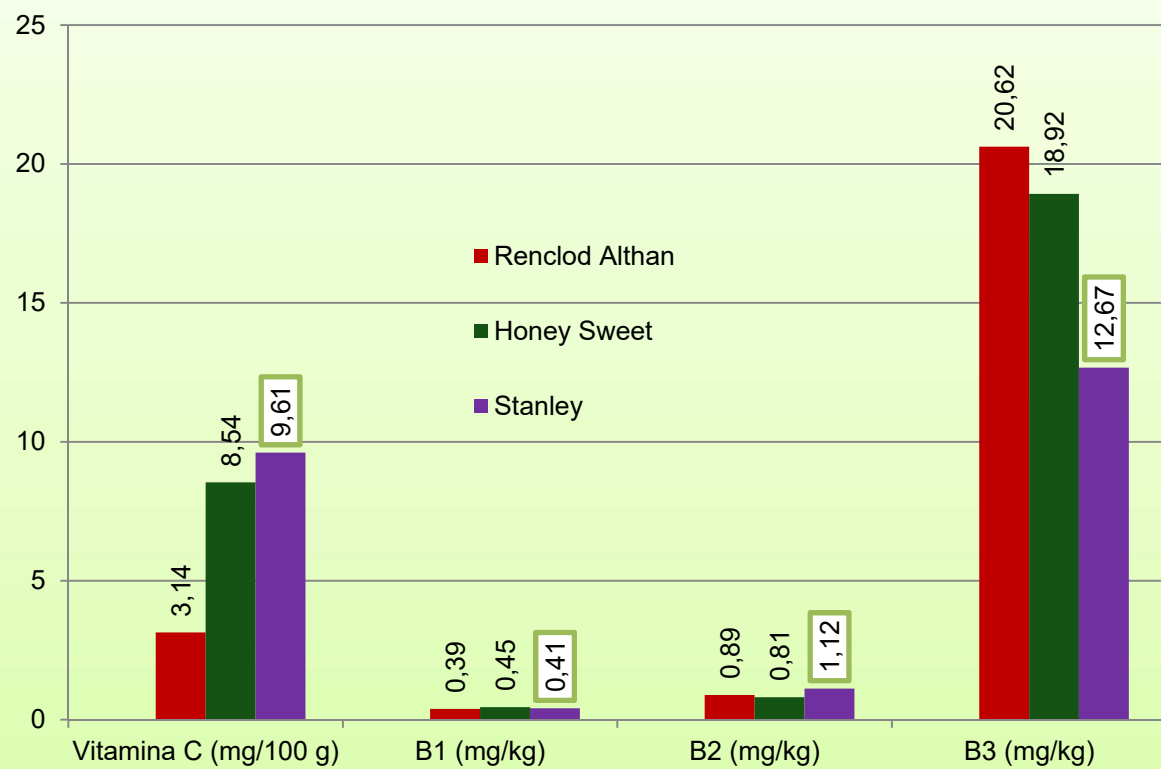
Conținutul de lipide totale a avut valori destul de apropiate la soiurile HoneySweet și Stanley, mult superioare soiului Renclod Althan. Soiul de prune transgenic HoneySweet a avut cel mai ridicat conținut în proteine totale. De asemenea, soiul Honey Sweet se remarcă printr-un conținut echilibrat de proteine și lipide

Continutul de minerale determinat prin Spectrometrie de Absorbție Atomică

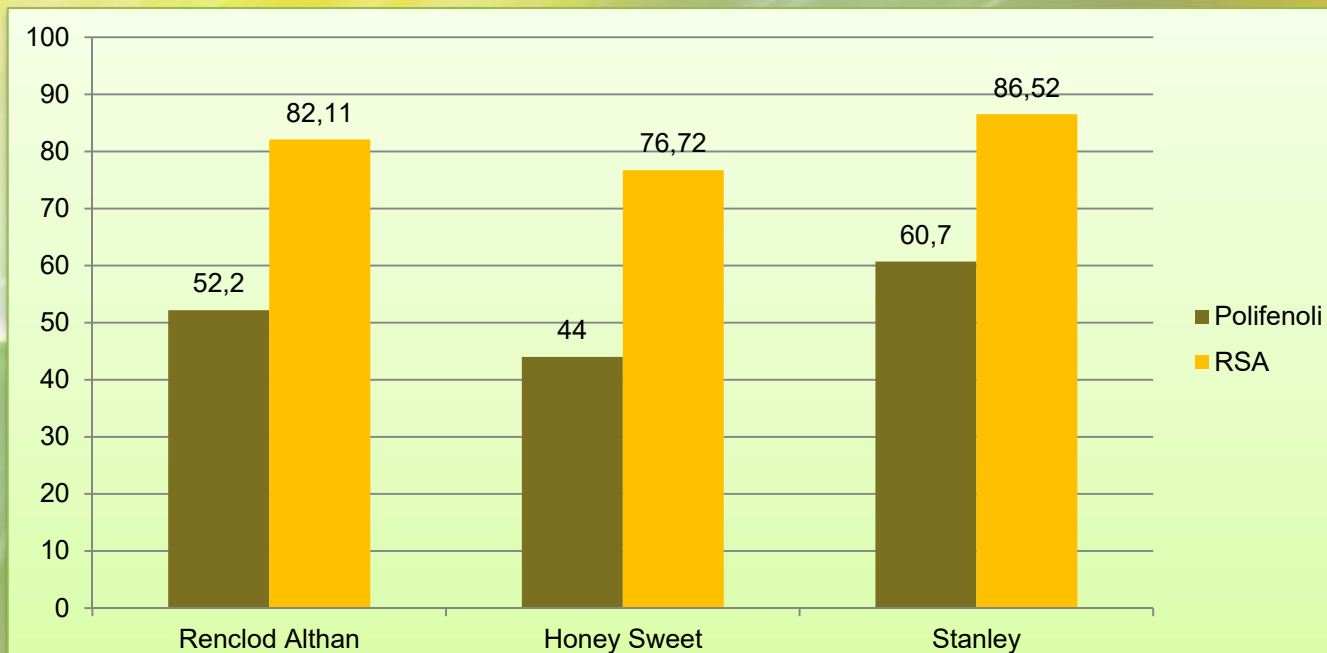


Soiul HoneySweet a avut în anul 2016 cantități similare de magneziu și calciu cu soiurile Renclod Althan și Stanley, cantități mult mai mici de fier decât soiul Stanley dar apropiate de soiul Renclod Althan, cantități mai mici de sodiu decât ambele soiuri convenționale și cantități mai mici de potasiu față de soiul Renclod Althan și mai mari față de soiul Stanley,

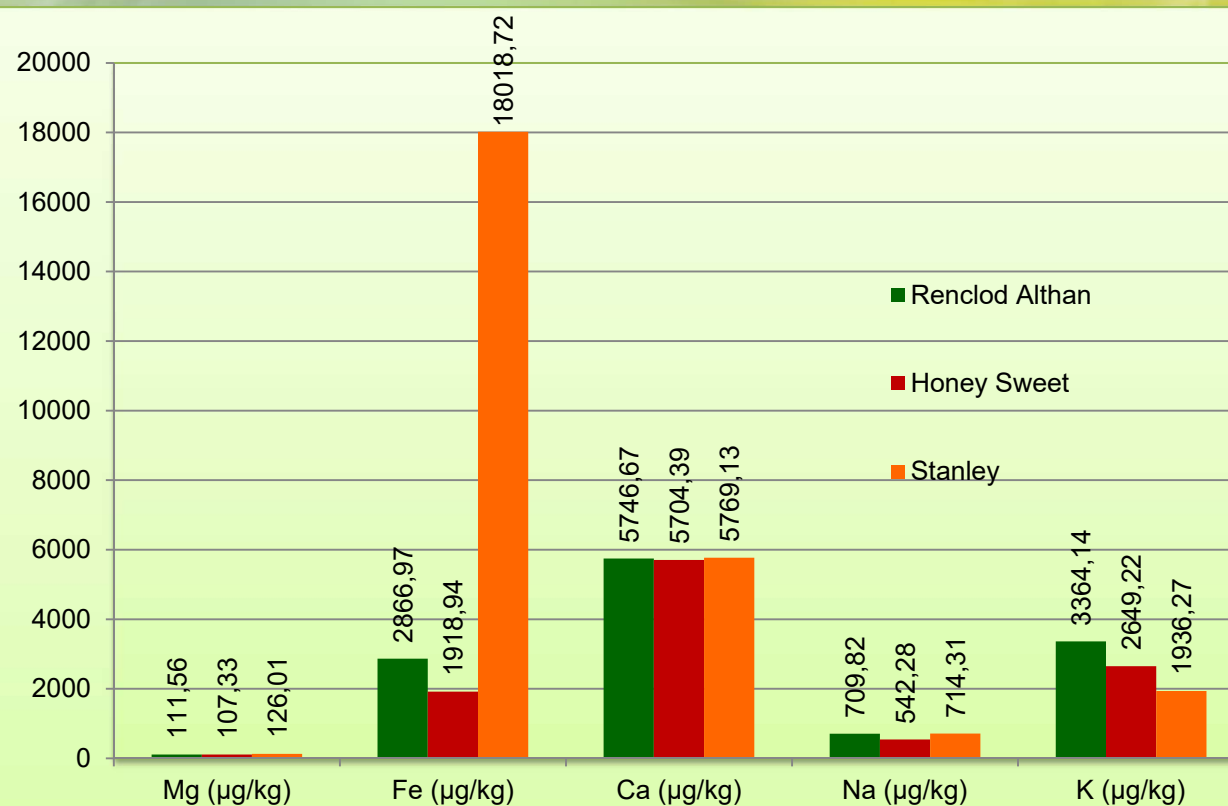
Continutul de vitamine B (determinat prin Cromatografie de lichide de inalta performanta) si vitamina C



Determinarea
continutului de
polifenoli si a
activitatii
antioxidante prin
Spectrofotometrie

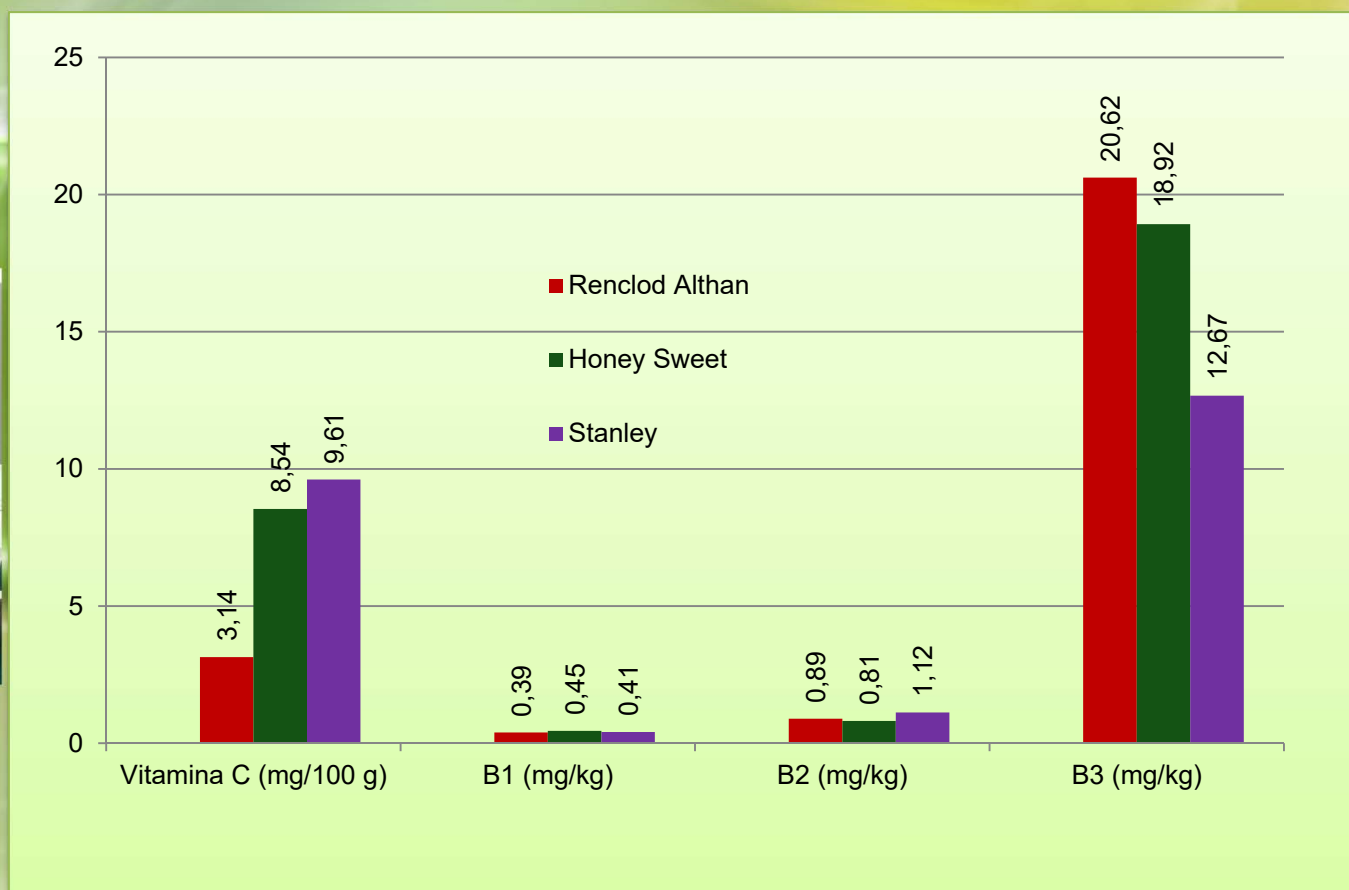


Continutul in minerale determinat prin Spectrometrie de Absorbție Atomică



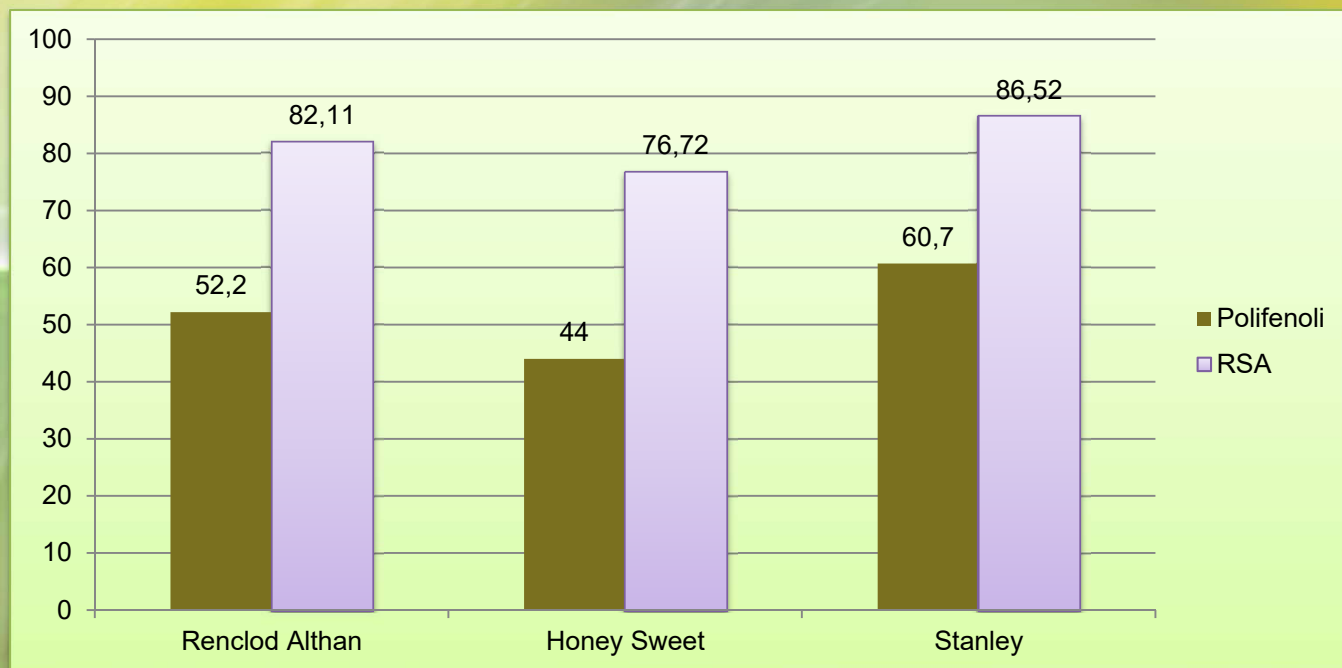
Soiul HoneySweet are cantități similare de magneziu și calciu cu soiurile Renclod Althan și Stanley, cantități mai mici de fier decât soiul Renclod Althan, dar mai mari decât soiul Stanley, cantități mai mici de sodiu decât ambele soiuri convenționale și cantități mai mici de potasiu față de soiul Renclod Althan și mai mari față de soiul Stanley.

Continutul in vitamine B (determinat prin cromatografie de lichide de inalta performanta) si C



Cel mai scăzut conținut de vitamina C a fost înregistrat la soiul Renclod Althan, celelalte doua soiuri având concentrații apropiate. Conținutul de vitamine B1 și B2 a fost relativ similar la toate soiurile. Conținutul în vitamina B3 a soiului HoneySweet a fost ușor mai scăzut decât a soiului Renclod Althan, dar mai mare decât a soiului Stanley.

Continutul de polifenoli si a activitatii antioxidante determinate prin **spectrofotometrie**



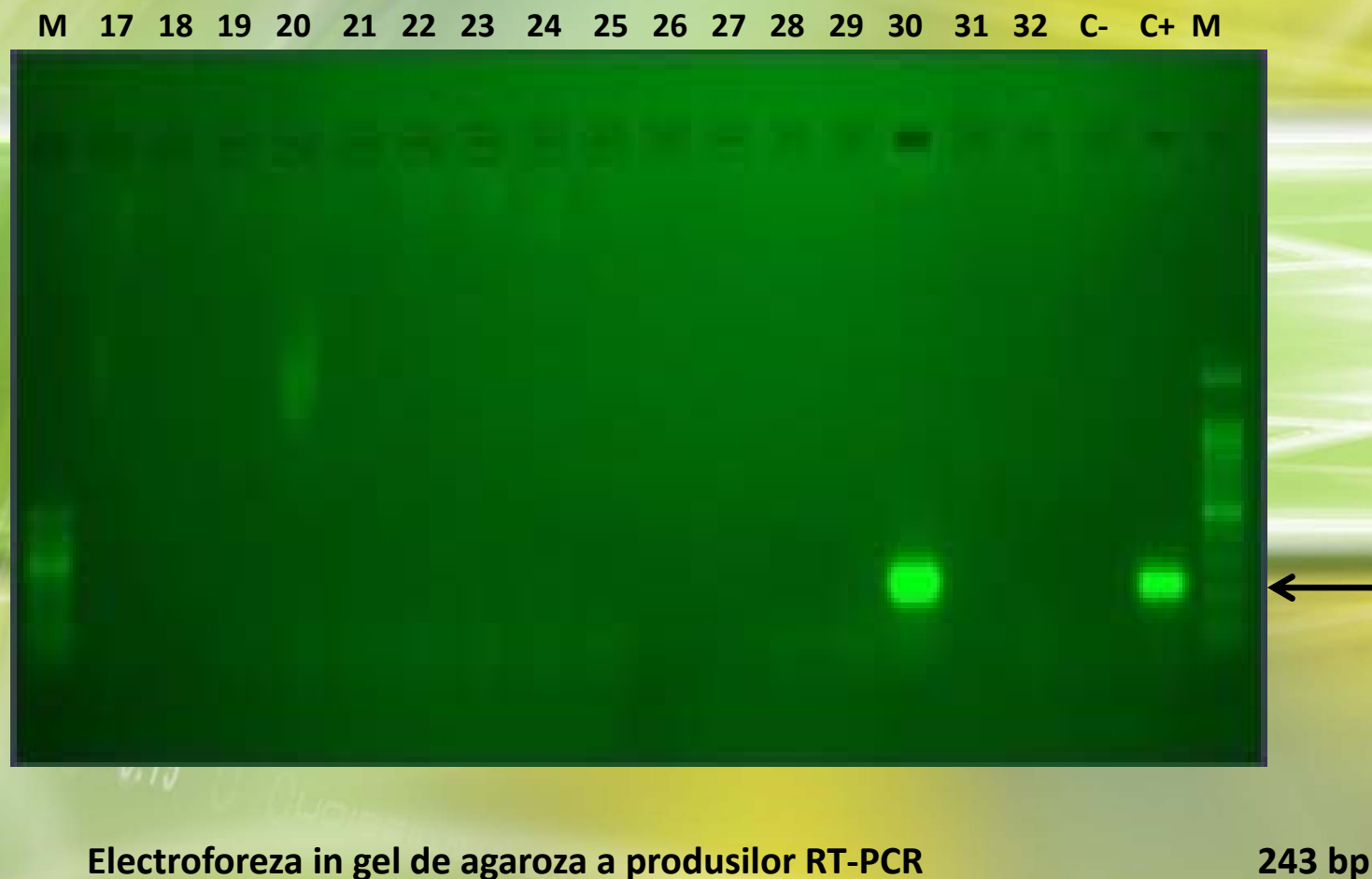
Conținutul de polifenoli totali în fructele de prune analizate a variat între 44.0 mgGAE/100 g (soiul Honey Sweet) la 60.7 mgGAE/100 g (soiul Stanley). Capacitatea de captare a radicalilor liberi (activitatea antioxidantă) este corelată cu conținutul de polifenoli, cea mai ridicată activitate antioxidantă fiind prezentă la probele ce au avut cea mai mare concentrație de polifenoli totali.



Activitatea 2.3 – Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV.

- Rezultatele testărilor serologice prin DAS-ELISA pentru *Prunus necrotic ring spot virus*, *Prune dwarf virus* și *Aple chlorotic ring spot virus*, arată că starea fitovirotică a lotului experimental este una bună, în sensul că un singur pom aparținând soiului Renclod Althan a fost găsit infectat cu PNRSV.
- Rezultatele testelor de diagnostic serologic (DAS-ELISA) și molecular (IC-RT-PCR) pentru detecția virusului *Plum pox a* indicat prezența virusului la o singură probă aparținând soiului Stanley. Testările continuă și în următoarele faze.
- În condițiile efectuării unui număr redus de tratamente pentru combaterea moniliozei infecțiile cu *Monilinia laxa* au fost sporadice, cu diferențe relativ mici între cele trei soiuri. Este posibil ca gradul redus de atac să fie datorat atât unei distanțe de izolare a lotului experimental față de alte livezi de prun, cât și rezervei biologice reduse de *Monilinia laxa*, având în vedere că plantația este foarte tânără.

Rezultatele privite în ansamblu reliefează prezența infecției cu PPV la varianta Stanley / (CS 3.6) și absența virusului la celelalte variante, rezultate confirmate la analizele IC-RT-PCR



Pomul aferent probei infectate a prezentat simptome tipice de PPV pe câțiva lăstari, iar sporadic slabe scurgeri gomoase pe fructe, care ar putea fi asociate infecției cu PPV.



a



b

Simptome tipice de PPV pe frunze (a) si scurgeri gomoase (b) la varianta Stanley / (CS 3.6)

2.4. Diseminare rezultate

Diseminarea rezultatelor fazei 2 s-a realizat, în principal, prin prezentarea și publicarea de articole și lucrări științifice

- În data de 20.04.2016, la sediul SCDP Bistrița, a avut loc Ședința Societății Române a Horticultorilor - filiala Bistrița –Năsăud ocazie cu care a fost prezentat referatul "*Prunul transgenic rezistent la virusul Plum pox – subiect de studiu într-un nou proiect național coordonat de SCDP Bistrița*". S-a discutat și necesitatea susținerii unui program de ameliorare a rezistenței prunului la virusul *Plum pox*, prin utilizarea prunului transgenic Honey Sweet ca donor al rezistenței la PPV. De asemenea, la nivel de popularizare a fost publicat și un articol intitulat "***Prunul transgenic rezistent la virusul Plum pox - subiect de studiu într-un nou proiect național coordonat de SCDP Bistrita***" în Buletinul Documentar Informativ Horticol - filiala Bistrița-Năsăud, nr. 36/2016: 6-8
- Rezultate preliminare obținute în anul 2016, în cadrul proiectului ADER 4.1.3, respectiv lucrarea intitulată "***Preliminary results on behaviour of transgenic and conventional plum to natural PPV infection in a new field trial***", a fost prezentată la cel de-al XV-lea Simpozion Internațional "Prospects for the 3rd Millennium Agriculture", care a avut loc la USAMV Cluj-Napoca în perioada 29 sept. - 1 oct. 2016.
- Unele rezultate obținute la SCDP Bistrița referitoare la prunul transgenic HoneySweet, au făcut obiectul publicării unui articol în revista HortScience (ISI- **Web of Science**) intitulat "***HoneySweet (C5), the First genetically Engineered Plum pox virus-resistant***" (Scorza și colab., 2016,
- În data de 3 august 2016 lotul experimental de la SCDP Bistrița a fost vizitat de o delegație a Departamentului de Stat pentru Agricultură a Statelor Unite ale Americii cu care laboratorul de virusologie al SCDP Bistrița colaborează încă din anul 1996, având publicate împreună numeroase articole care contribuie substanțial la creșterea vizibilității cercetării agricole românești, în domeniul virusologiei, pe plan mondial.

La realizarea activităților proiectului au contribuit:

CO - SCDP Bistrita la toate activitățile, exceptând compoziția chimică a fructelor

Director de proiect Dr. ing. Ioan ZAGRAI

Membri: Dr. ing. Luminița Antonela ZAGRAI

Dr. ing Zsolt JAKAB

Drd. ing. Angela FEȘTILĂ

Tehn. Sabin SUCIU

P1 – USAMV Cluj la determinările privind compoziția chimică a fructelor

Responsabil: Prof. Liviu Al. MĂRGHITAȘ

Membri: Prof. Daniel DEZMIREAN

Conf. Otilia BOBIS

Chim. Victorita BONTA

Drd. Claudia PASCA

Drd. Carmen MURESAN