

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 3/2017: 200.000 lei
- Perioada de derulare a proiectului: 06.10.2015-31.12.2018
- Perioada fazei 3/2017: 21.11.2016-20.11.2017

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: 3

Termen de finalizare: 20.11.2017

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 3 vizează obținerea unor rezultate parțiale (al doilea 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 celui de-al doilea 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.

Participare cu lucrare/ articol de popularizare la manifestări tehnico-științifice din domeniul specific proiectului.

Faza III cuprinde patru activități care se regăsesc și în fazele anilor 2016 și 2018, astfel încat prin cumulara rezultatelor să putem formula concluziile cercetărilor întreprinse.

Activitățile se referă la:

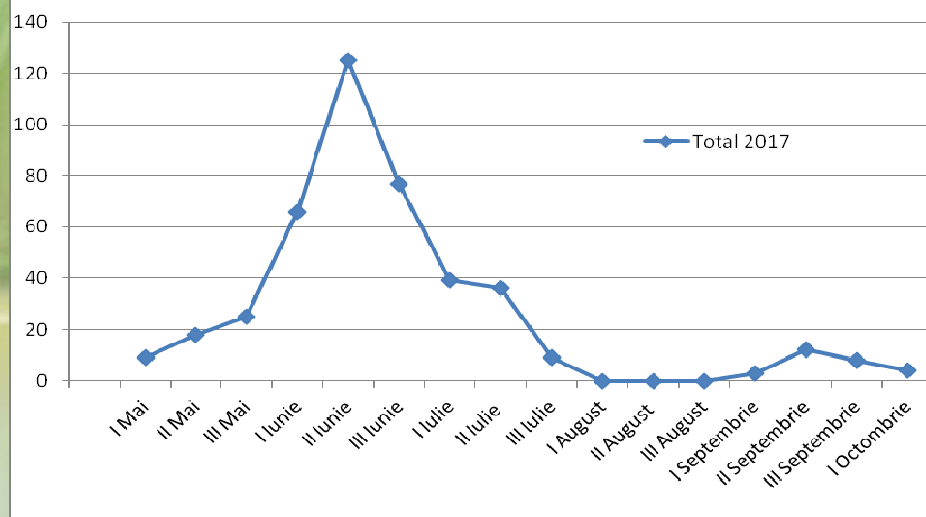
- **Activitate 3.1 - Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide vectoare și stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali.**
- **Activitate 3.2 – Evaluarea potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.**
- **Activitate 3.3 – Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV.**
- **Activitate 3.4 - Diseminare rezultate.**

Rezultate obținute

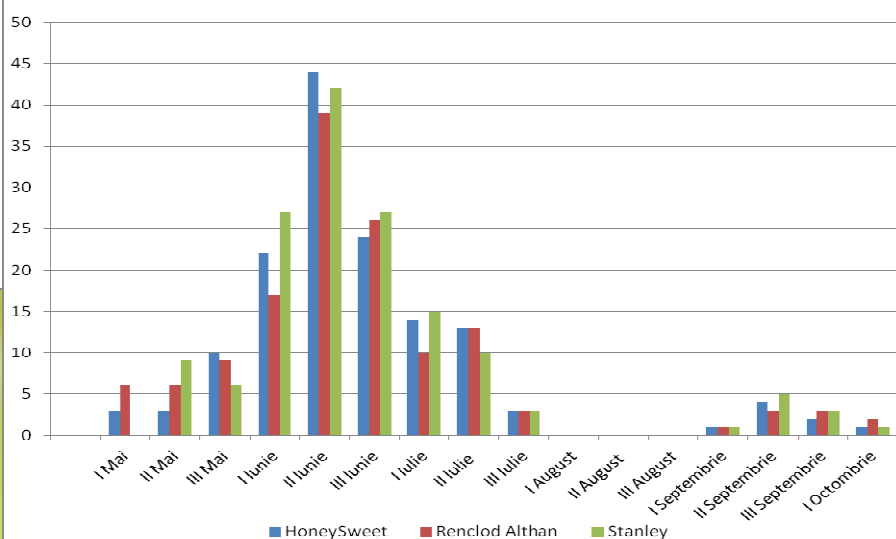
Activitate 3.1 - Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide vectoare și stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali.

a). Monitorizarea afidelor vectoare

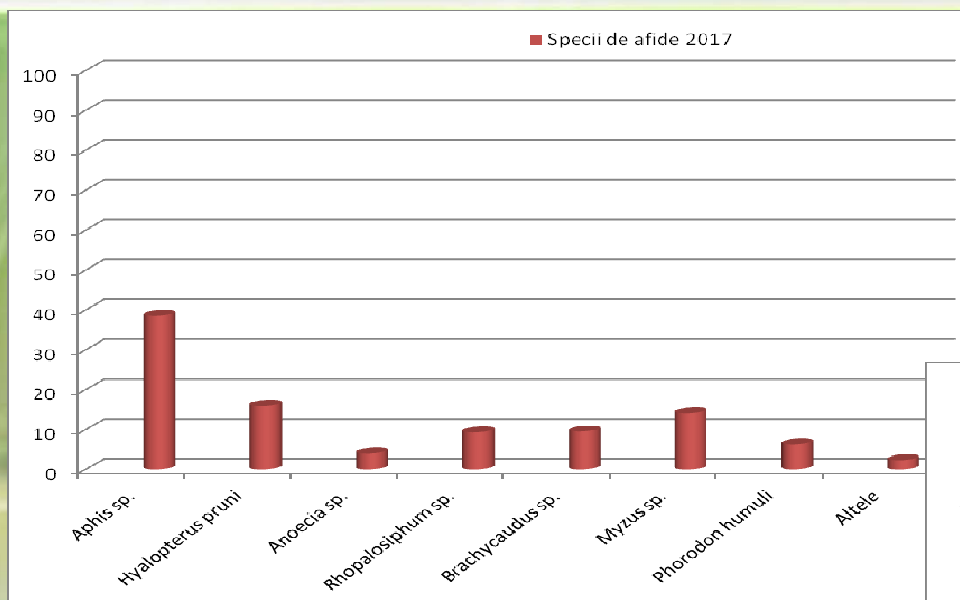
Curba de zbor a afidelor in anul 2017



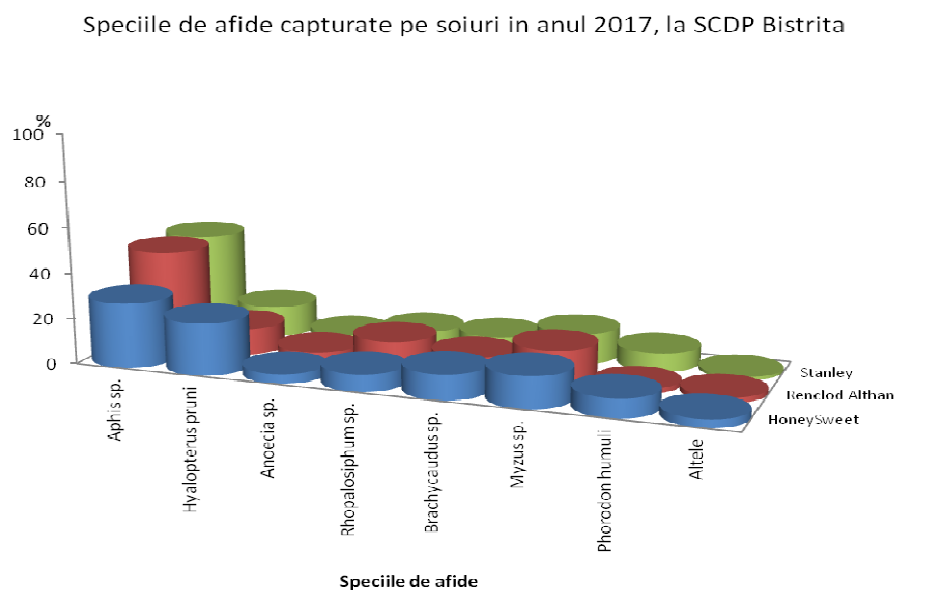
Numarul total de afide colectate pe soiuri, pe parcursul perioadei de vegetatie a anului 2017



Rezultatele celui de-al doilea an de evaluare al potențialului impact al transgenelor asupra afidelor vectoare relevă o similaritate a numărului și speciilor de afide care au populat cele două categorii de prun ceea, corelat cu rezultatele anului precedent, ar putea indica efectul neutral al prunului transgenic asupra populațiilor indigene de afide vectoare. După cumularea rezultatelor ce vor fi obținute și în anul viitor, vor fi emise concluziile finale referitoare la acest studiu.

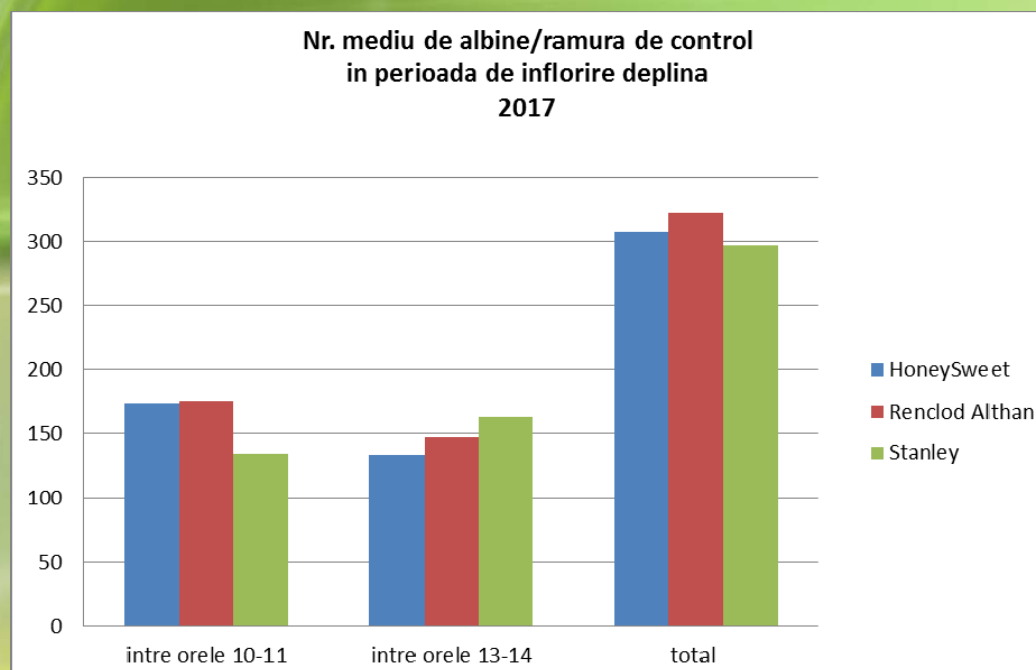


Speciile de afide capturate în anul 2016 la cele trei soiuri din lotul experimental



b) Stabilirea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali

- Rezultatele celui de-al doilea an de evaluare (2017) privind potențiala preferință a albinelor pentru prunul transgenic sau convențional sunt parțial diferite față de cele obținute în primul an de evaluare (2016). Mai precis, dacă anul 2016 a existat o mare similaritate a numărului total de albine prezente la prunul transgenic HoneySweet și soiul Stanley și o mare diferență față de soiul Renclod Althan, în anul 2017, rezultatele relevă o mare similaritate a numărului total de albine prezente la toate cele trei soiuri. Aceste rezultate ar putea reprezenta un indiciu a lipsei de preferință a albinelor pentru una din cele două categorii de prun, respectiv transgenic sau convențional. Cercetările continuă pe încă o perioadă de vegetație (2018) pentru a putea obține rezultate suficiente care să permită elaborarea unei concluzii referitoare la această tematică de studiu.



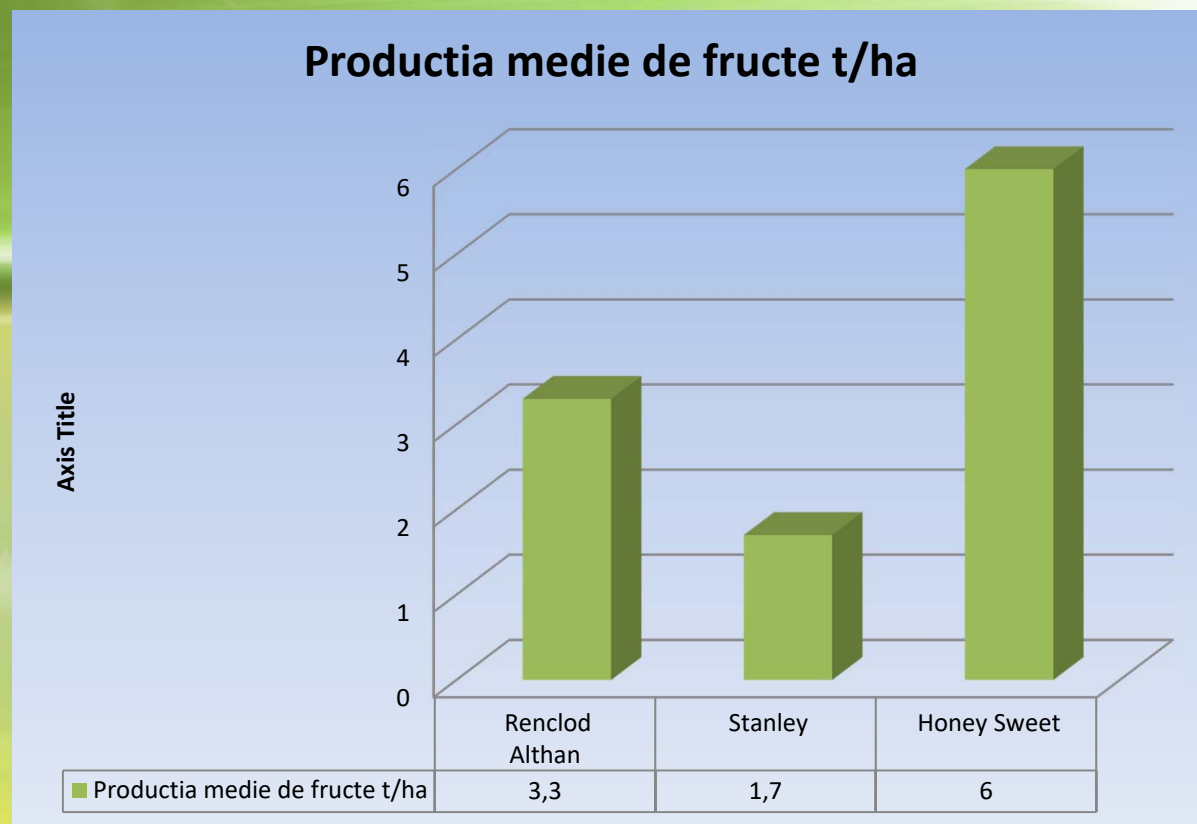
Reprezentarea grafică a numărului de albine care au vizitat cele trei soiuri de prun în perioada de suprapunere a înfloritului, în anul 2017

Activitate 3.2. Stabilirea potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.

a). Potențialului productiv:

- Producțiile medii de fructe la cele trei soiuri, realizate în condițiile climatice ale anului 2017 releva, pe de o parte, o diferență foarte mare de producție între prunul transgenic și cele două soiuri convenționale, în favoarea soiului HoneySweet. Mai precis, producția medie înregistrată la soiul HoneySweet (6 t/ha) a fost aproape dublă față de cea a soiului Renclod Althan (3,3 t/ha) și mai mult decât triplă față de cea a soiului Stanley (1,7 t/ha). Pe de altă parte, se constată o diferență mare de producție și între cele două soiuri convenționale, în favoarea soiului Renclod Althan.

- Producția soiului Stanley a fost mult diminuată de efectul înghețului din timpul înfloriturii, dar și de atacul masiv de *Eurytoma schreineri*, acest soi dovedindu-se foarte sensibil la atacul acestui dăunător. Soiul de prun transgenic HoneySweet a fost cel mai puțin afectat de temperaturile negative din timpul înfloriturii.

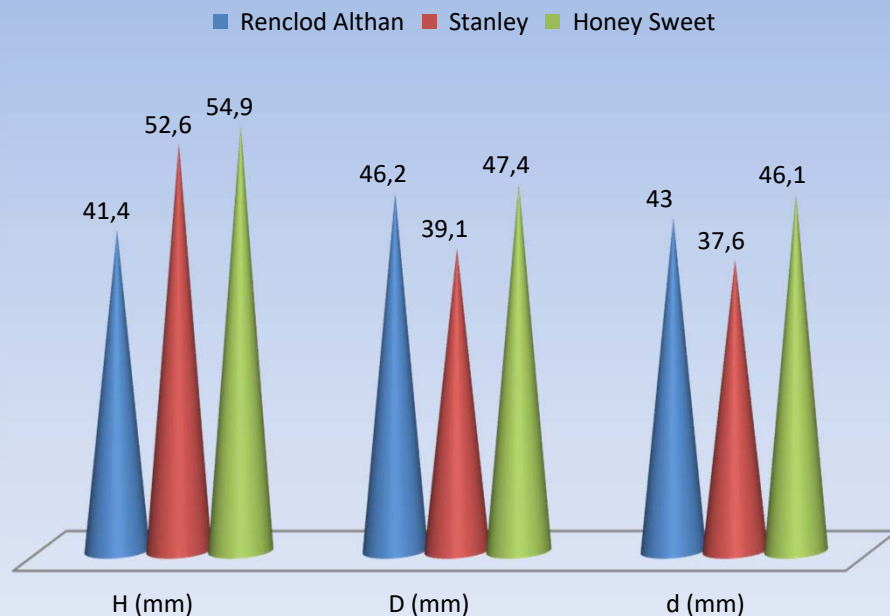


Potențialul calitativ:

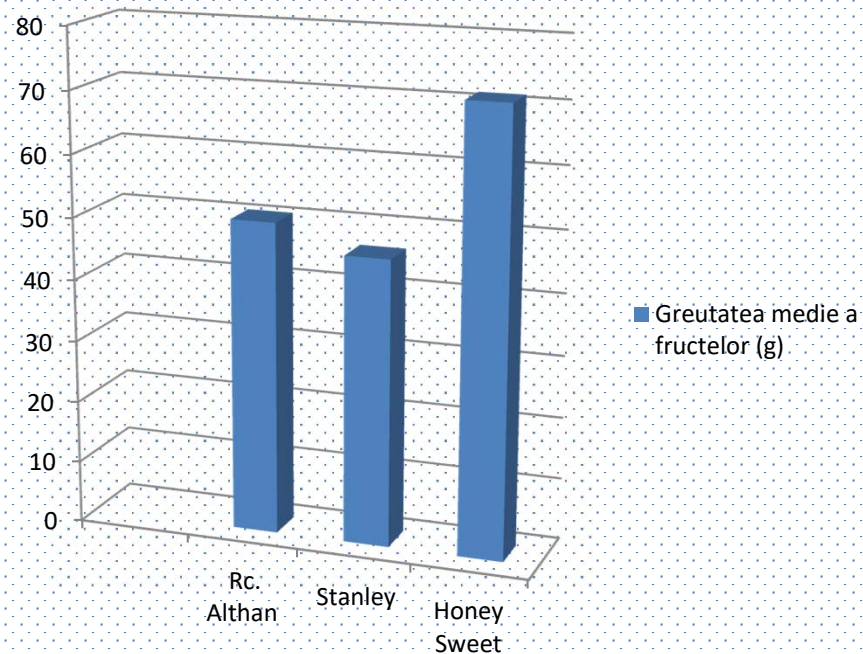
a) Biometrie și însușiri fenotipice

- Greutatea medie a fructelor, înregistrată în condițiile anului 2017, confirmă superioritatea netă a soiului de prun transgenic HoneySweet față de soiurile de prun convențional Renclod Althan și Stanley pentru aceasta caracteristică. Mai precis, greutatea medie a fructelor la soiul HoneySweet a fost de 71,3 g, în timp ce la soiurile Renclod Althan și Stanley s-a înregistrat o greutate medie de 50,5g, respectiv 46,3g. Creșterea semnificativă a greutatei fructelor la toate cele trei soiuri, dar în special la soiul Stanley, își găsește explicația în producția mult redusă comparativ cu anul 2016, ceea ce a permis o dezvoltare accentuată a fructelor.

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



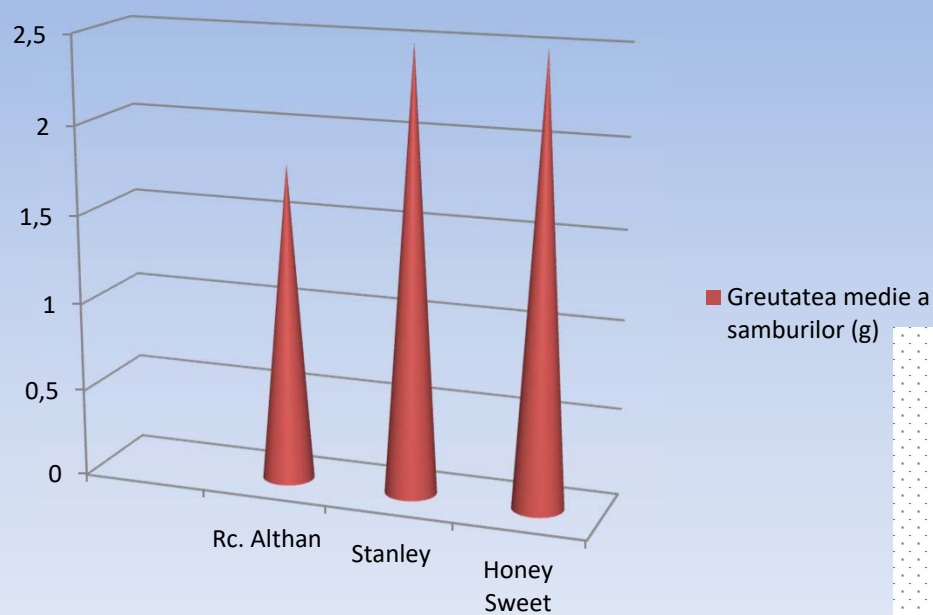
Greutatea medie a fructelor (g) -2017



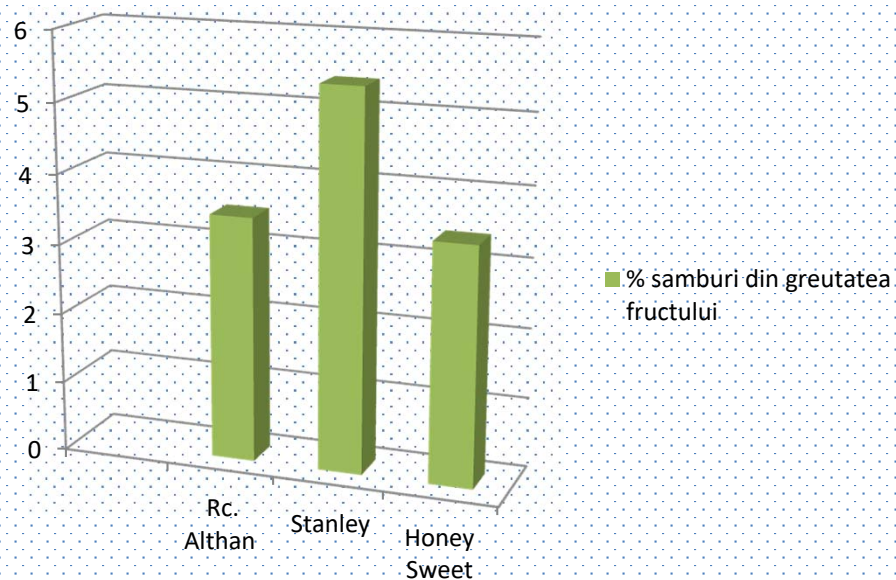
Măsurătorile biometrice confirmă că nici unul dintre cele trei soiuri nu prezintă o simetrie perfectă. Totuși, soiul de prun transgenic HoneySweet are forma ovala, destul de regulata, comparativ cu soiul Stanley.

- Soiul transgenic HoneySweet a avut o pondere a sâmburilor în greutatea fructelor similară soiului Renclod Althan, și mult mai redusă decât la soiul Stanley (3,4 % față de 5,4%). Se confirmă astfel superioritatea soiului de prun transgenic HoneySweet față de soiul Stanley în ceea ce privește ponderea sâmburilor în greutatea fructelor.

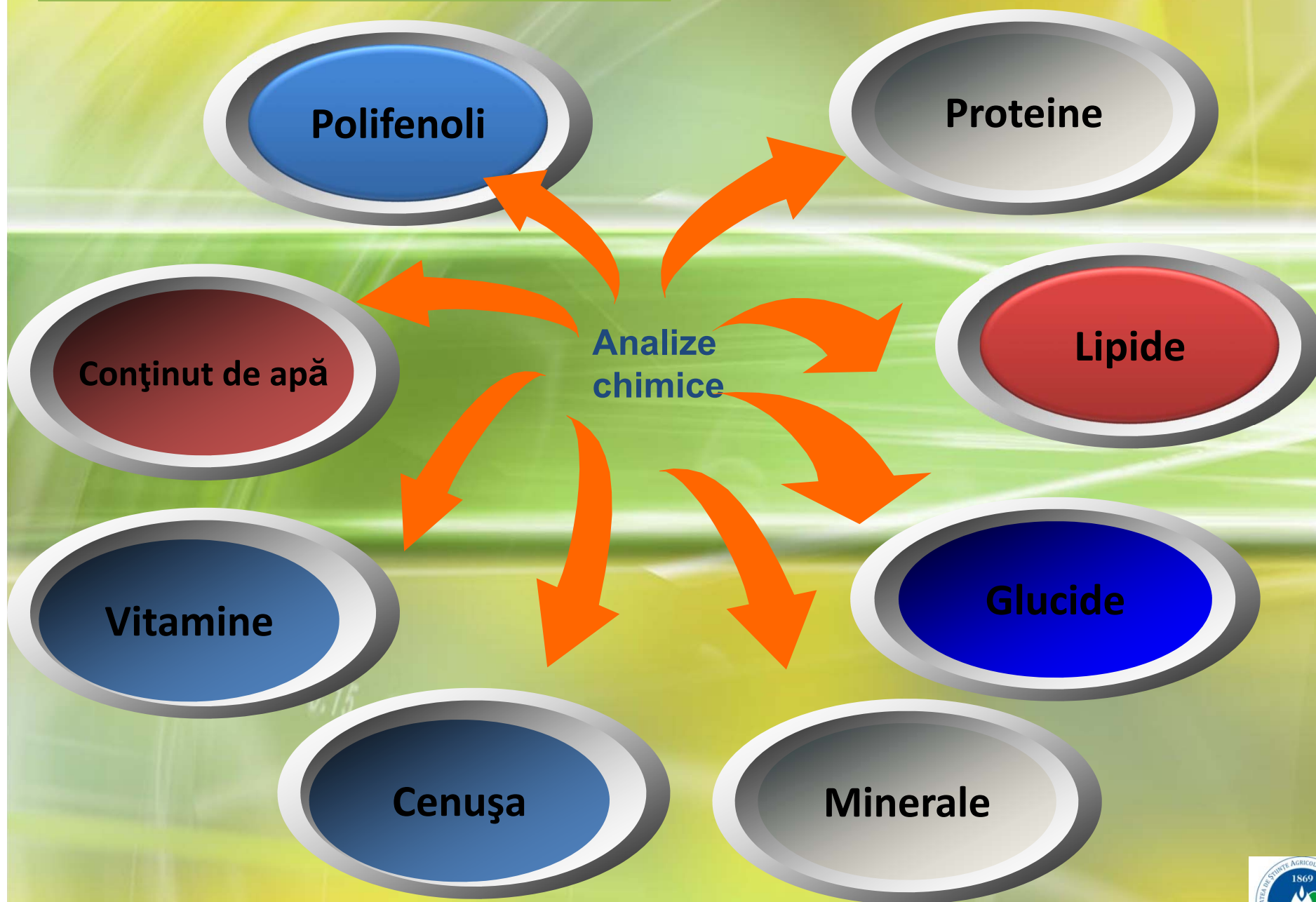
Greutatea medie a samburilor (g) - 2017

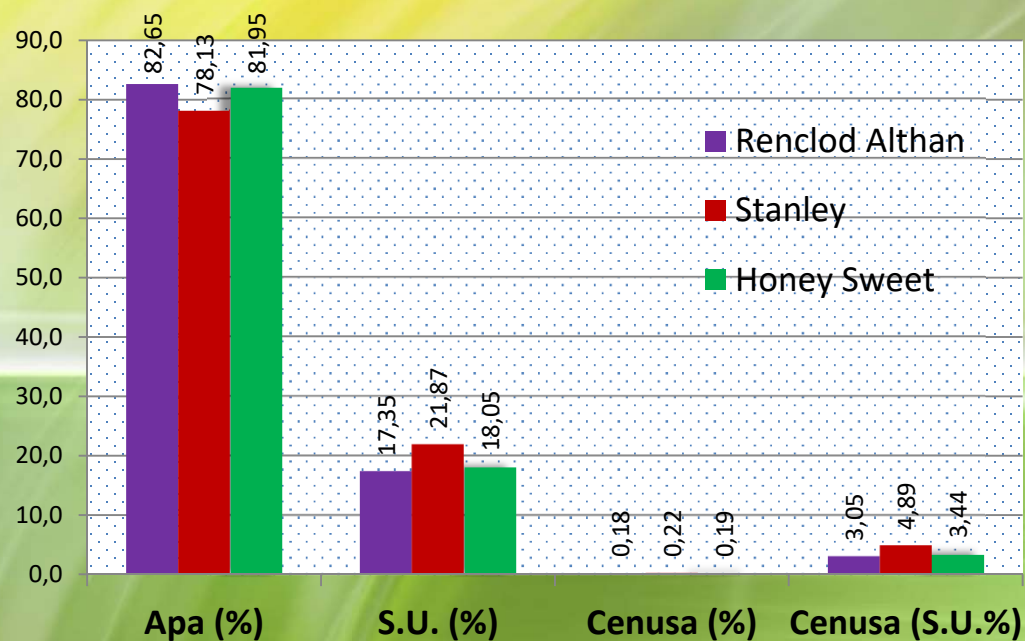


% samburi din greutatea fructului - 2017



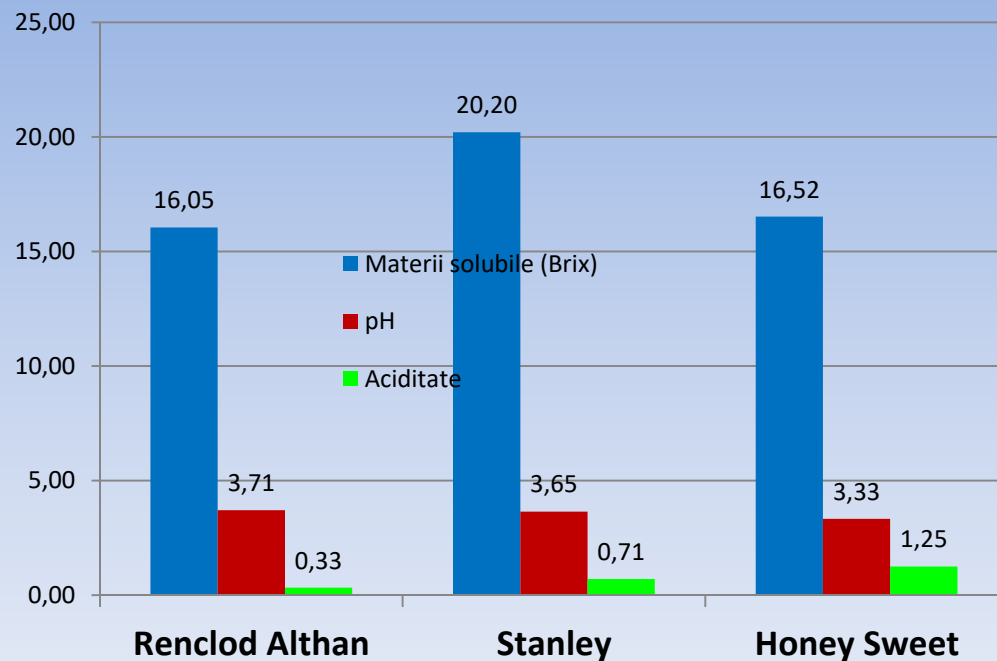
b) Compozitia chimica a fructelor



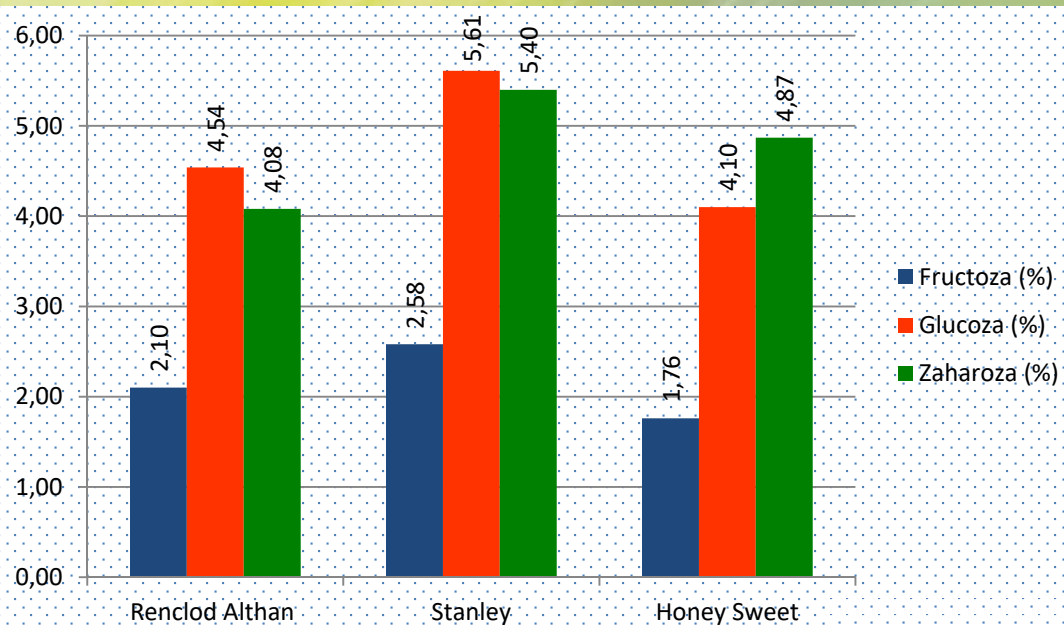


Soiul Stanley a avut cea mai mică concentrație de apă în fruct, iar soiul Honey Sweet și Renclod Althan cantități mai ridicate. Cea mai ridicată cantitate de cenușă a fost înregistrată la soiul Stanley, urmat de Honey Sweet și Reine Claude d'Althan, invers proporțional cu cantitatea de apă din probe.

Cea mai ridicată aciditate titrabilă a fost înregistrată la soiul Honey Sweet, urmată de soiul Stanley și Reine Claude d'Althan.

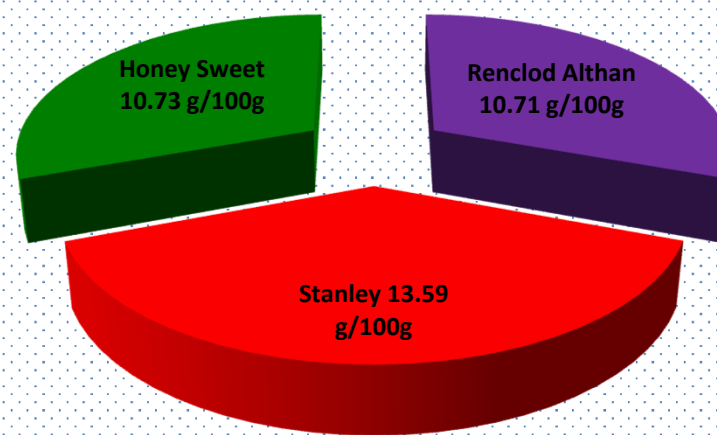


Determinarea glucidelor prin HPLC-IR

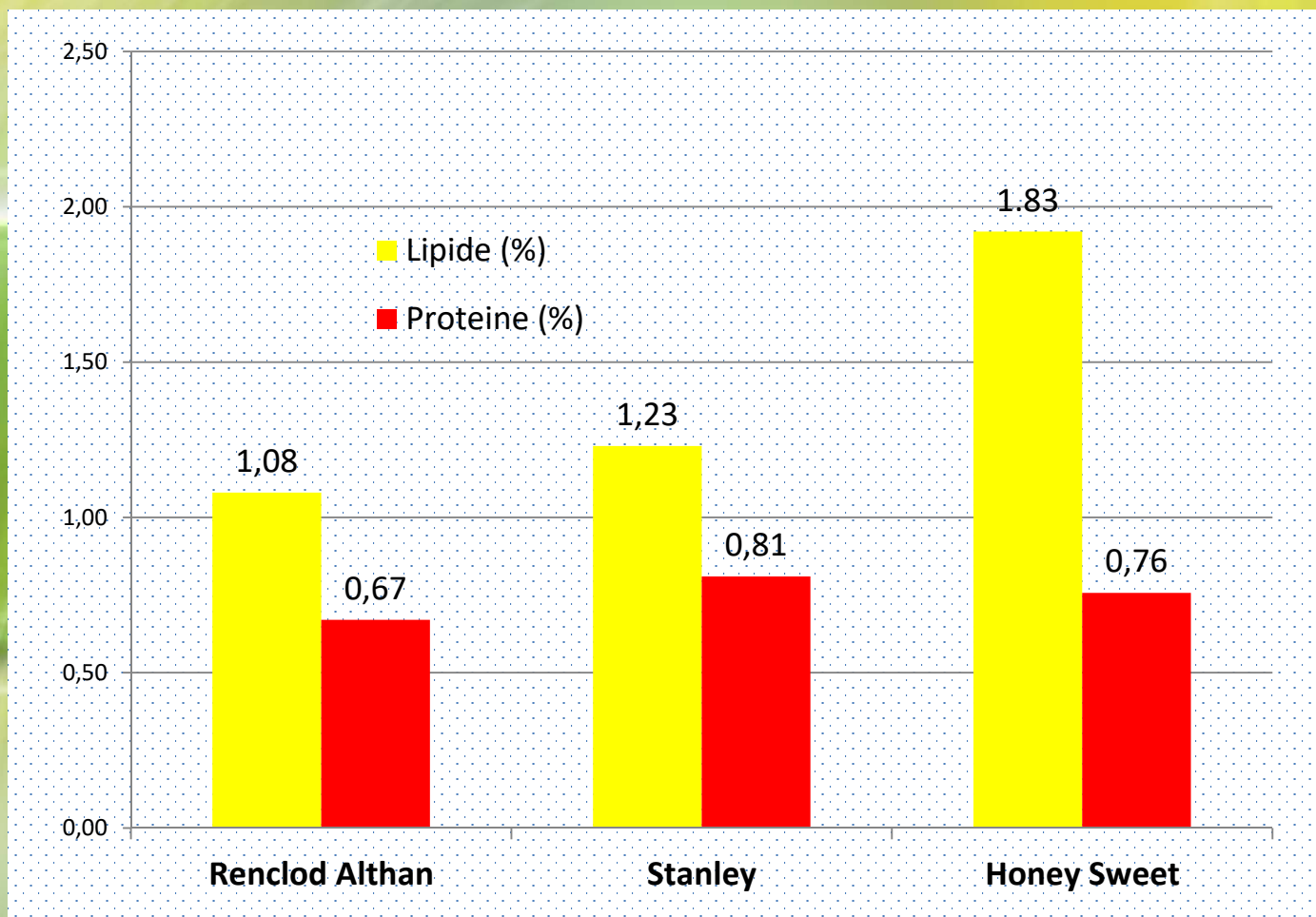


În anul 2017, conținut mai ridicat de zaharuri simple a prezentat soiul Stanley, soiurile Honey Sweet și Reine Claude d'Althan având cantități similare.

Conținutul de zaharuri simple



Conținutului de lipide și proteine totale la soiurile de prune din lotul experimental 2017

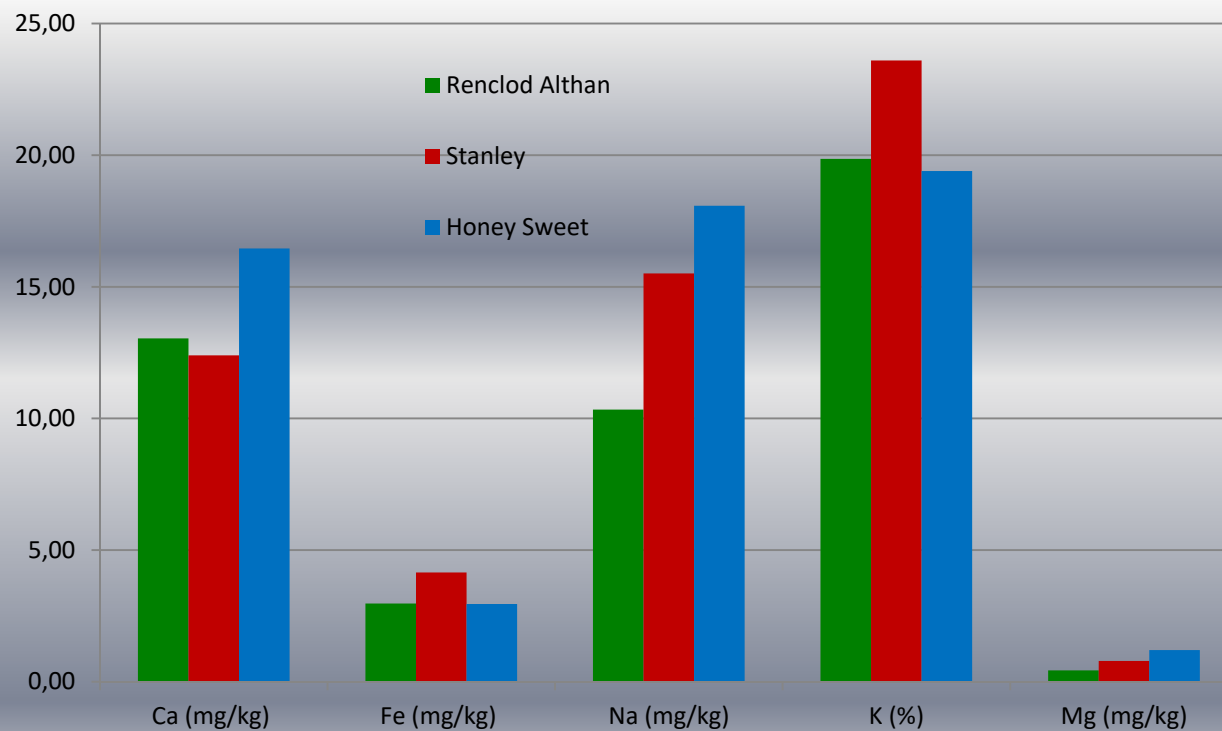


Conținutul de lipide totale a avut valori destul de apropiate la soiurile Renclod Althan și Stanley, mai mici însă decât la soiul Honey Sweet.

Conținutul de proteine totale a fost echilibrat în cele trei soiuri.

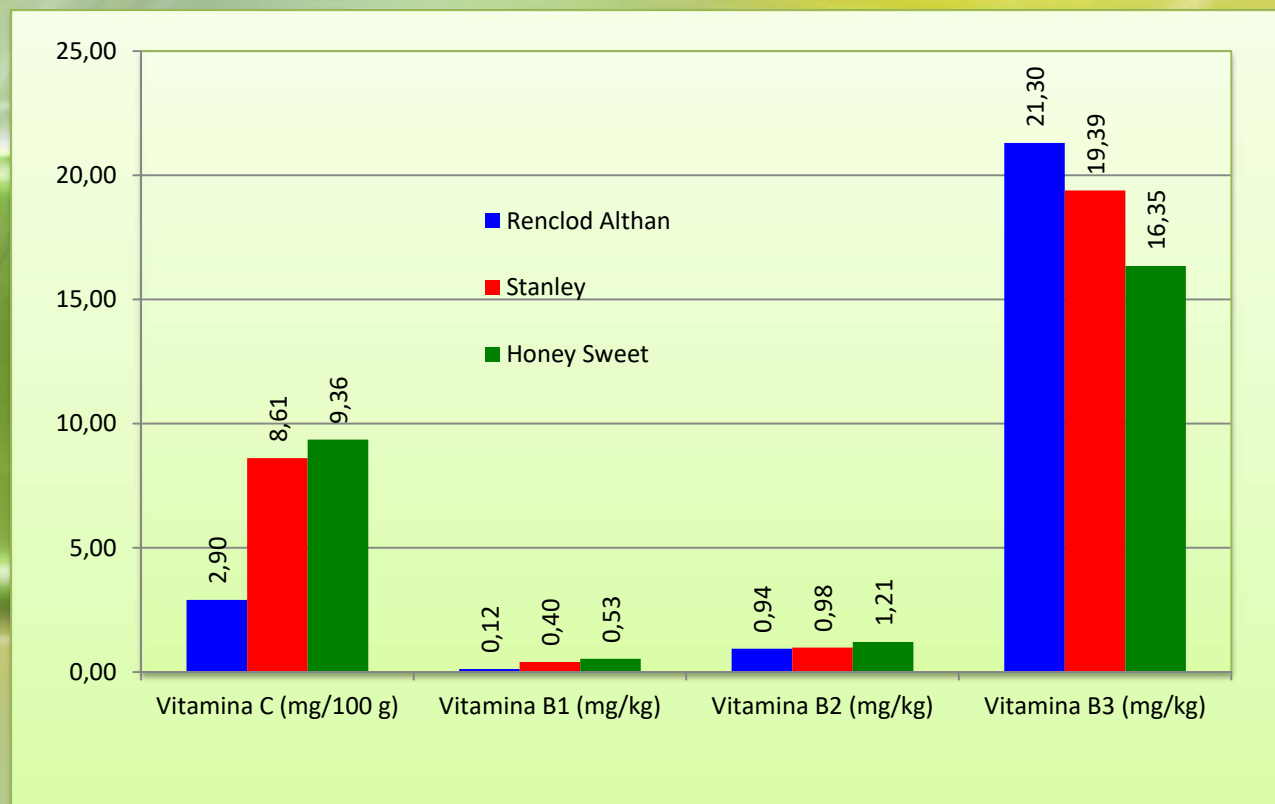


Continutul de minerale determinat prin Spectrometrie de Absorbție Atomică (2017)



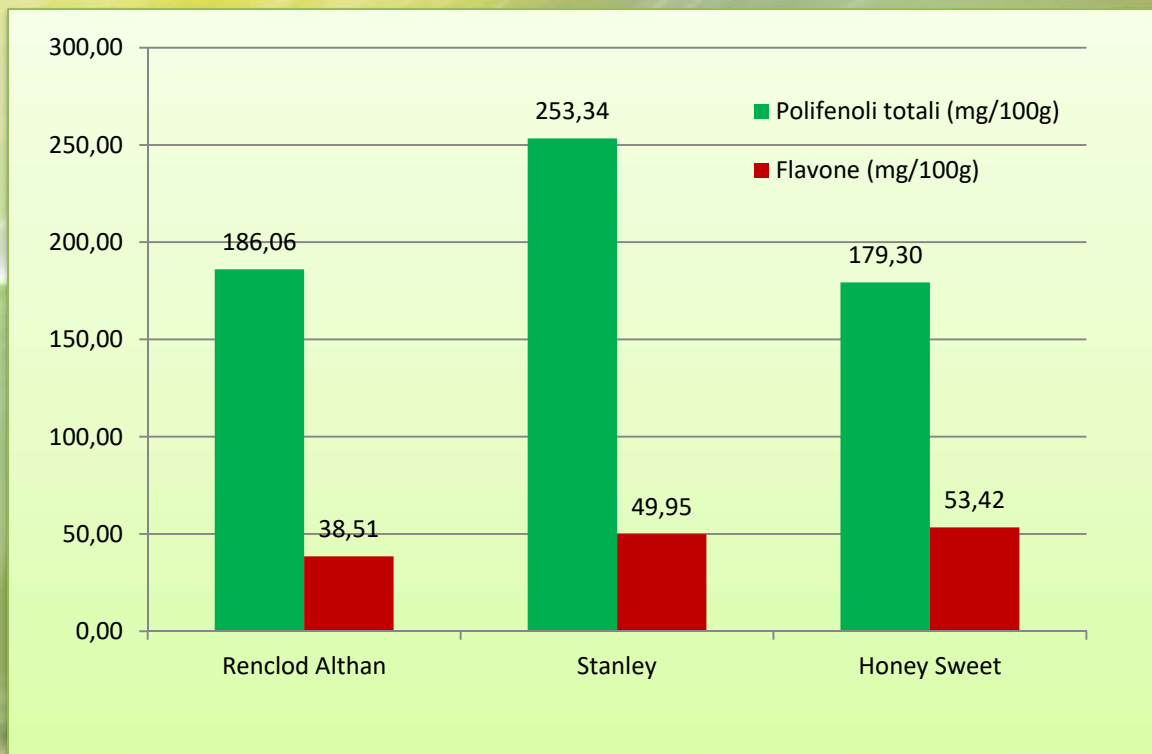
Soiul HoneySweet a avut in anul 2017 cantități mai mari de Ca, Na si Mg decat cele doua soiuri conventionale. Cel mai ridicat continut de Fe si K s-a inregistrat la soiul Stanley.

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. Soiul Honey Sweet a prezentat cele mai mari cantități de vitamina C, B1 și B2.

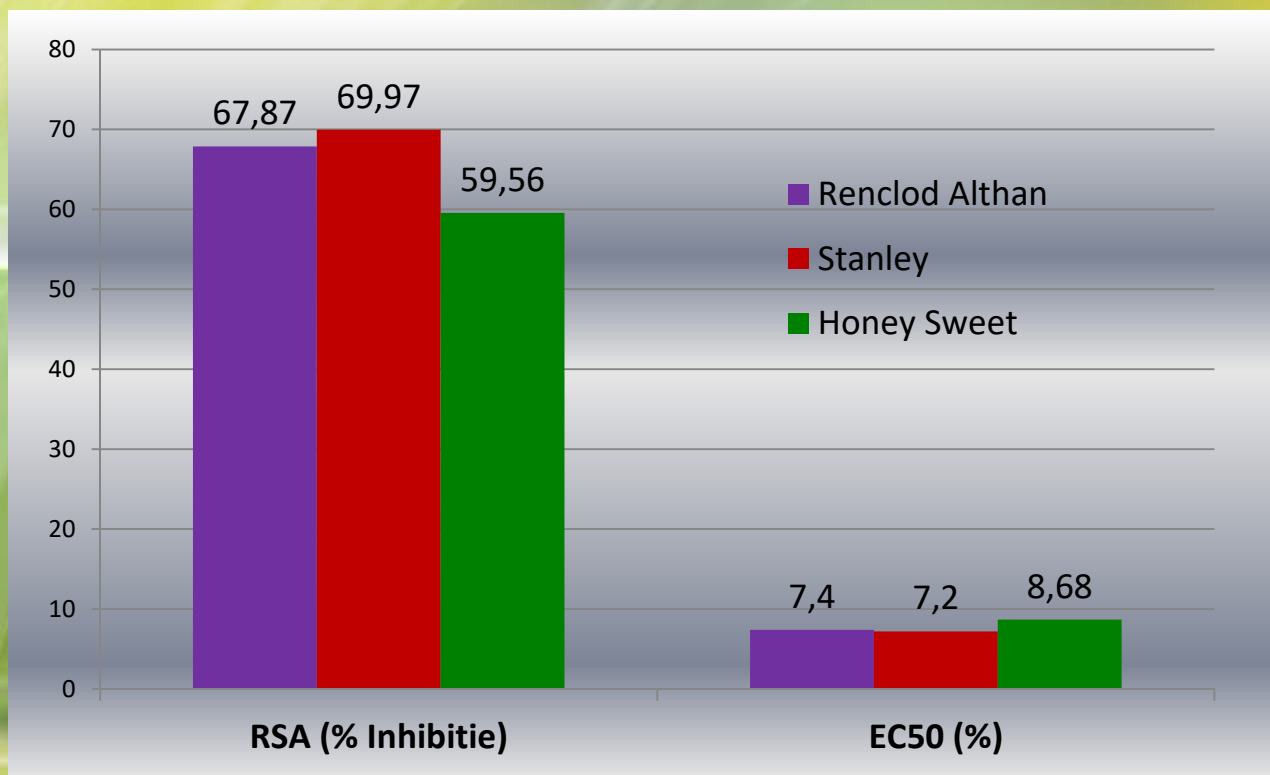
Determinarea continutului de polifenoli si flavone prin **Spectrofotometrie**



Cel mai mare continut de polifenoli totali s-a inregistrat la soiul Stanley, soiul Renclo Althan si Honey Sweet avand cantitati similare, insa mai mici. Cea mai mare cantitate de flavone s-a inregistrat insa la soiul Honey Sweet, urmat de Stanley si Renclo Althan.



Activitatea antioxidanta a extractelor de prune determinate prin **spectrofotometrie** -2017



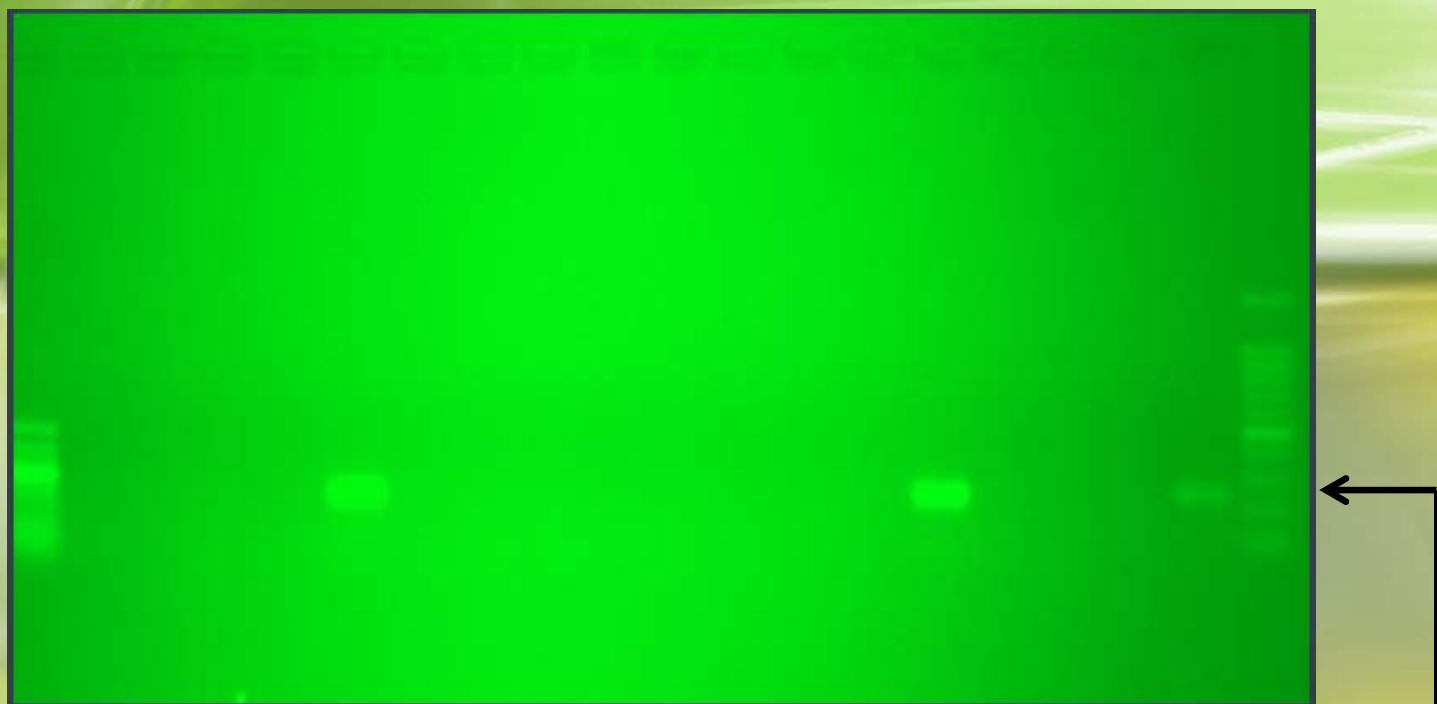
Capacitatea de captare a radicalilor liberi (activitatea antioxidantă) este corelată cu conținutul de polifenoli, cea mai ridicată activitate antioxidantă fiind prezentă la probele ce au avut cea mai mare concentrație de polifenoli totali(soiul Stanley). Valoarea EC50 este corelată cu % de inhibiție a radicalului DPPH.



Activitatea 3.3 – Evaluarea stabilității și durabilității rezistenței prunului transgenic în condiții de presiune de infecție naturală cu PPV.

- Rezultatele testelor de diagnostic serologic (DAS-ELISA) și molecular (IC-RT-PCR) pentru detecția virusului *Plum pox*, efectuate în anul 2017, au indicat prezența virusului la două probe, câte una pentru fiecare din cele două soiuri convenționale (Stanley și Renclod Althan). Prunul transgenic HoneySweet a rămas neinfectat. Testările continuă și în următoarea fază.

M 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 C- C+ M



Electroforeza in gel de agaroză a produsilor RT-PCR

243 bp

[probe pozitive: 21-Renclod Althan / (CA 2.11); 30 - Stanley / CS 3.6)]

Pomii aferenti probelor infectate au prezentat simptome tipice de PPV



a

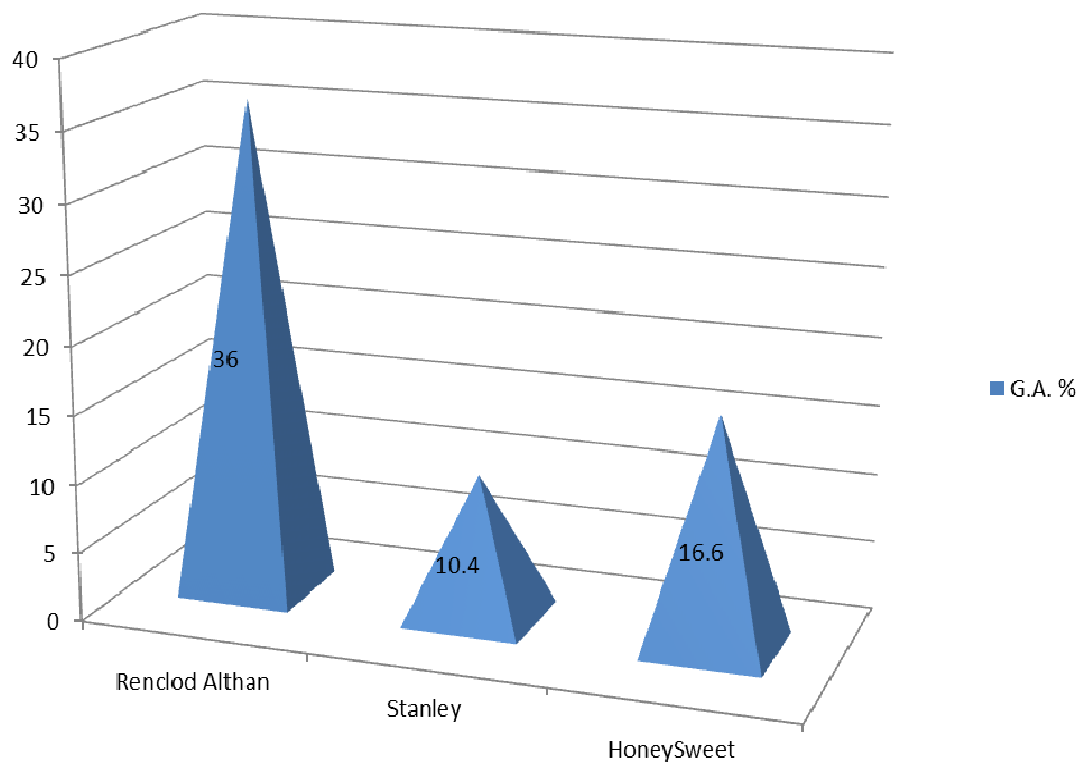


b

Simptome tipice de PPV pe frunze la variantele Renclod Althan / (CA 2.11)(a) si la varianta Stanley / (CS 3.6) (b)

- Rezultatele privind atacul de monilioză pe fructe arată ca, în condițiile efectuării unui număr redus de tratamente, soiul Renclod Althan a fost grav afectat de infecțiile cu *Monilinia laxa*, înregistrând un grad mediu de atac de 36,0%. Soiurile Stanley și HoneySweet au fost și ele semnificativ afectate, însă gradul de atac a fost mult mai redus (10,4 % la soiul Stanley, respectiv 16,6 % la soiul HoneySweet). Aceste rezultate ne îndreptătesc să opinăm că reducerea numărului de tratamente pentru combaterea moniliozei nu este oportună la cele trei soiuri, întrucât afecțiunile pot compromite în mare parte producția.

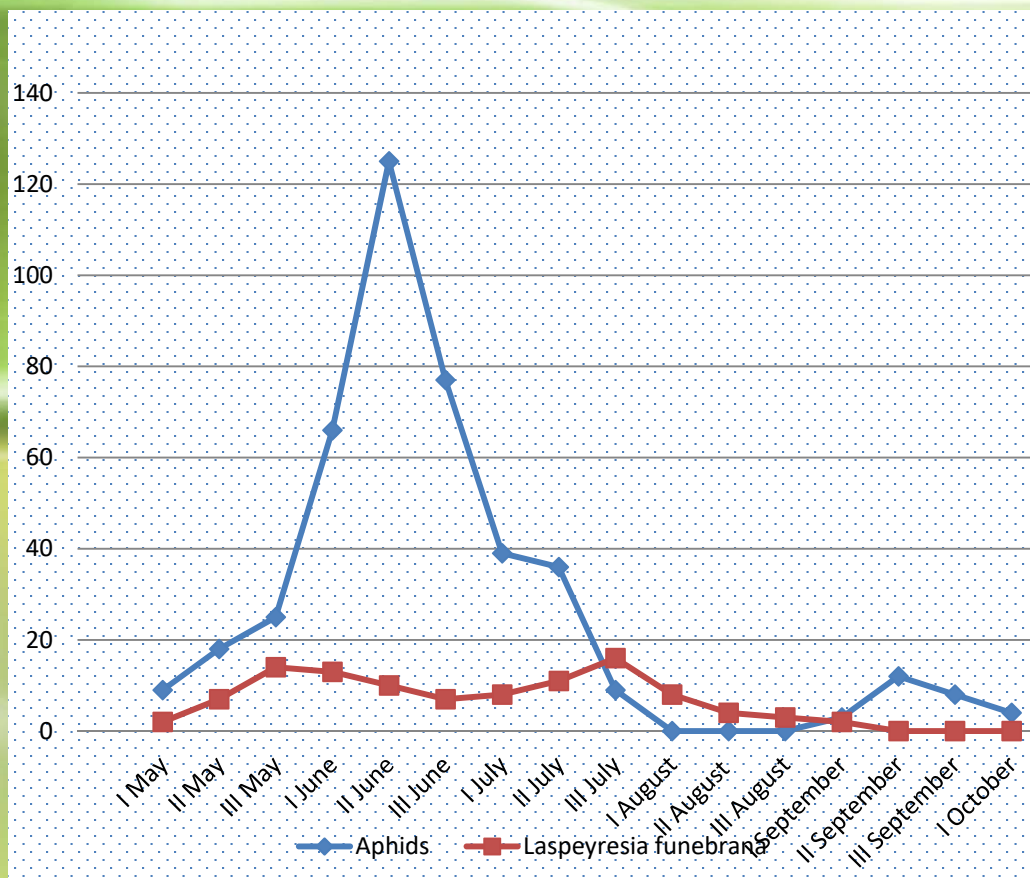
Gradul de atac al moniliozei pe fructe (2017)



Simptome de monilioză pe fructe la soiul Renclod Althan

- Rezultatele preliminare referitoare la evaluarea posibilitatii de evitare a unor tratamente cu insecticide in plantații cu soiuri de prun rezistente la PPV, precum prunul transgenic, releva ca, teoretic, acest lucru este posibil fără a stimula raspândirea virusului. Practic, situația este inasa mult mai complexă deoarece în plantațiile de prun există și alți dăunători problemă care pot provoca pagube economice însemnate. Cel mai important din acest punct de vedere este viermele prunelor (*Laspeyresia funebrana* Tr.) care depreciaza foarte mult calitatea fructelor. De aceea, pentru evaluarea potentialului de reducere a numarului de tratamente cu insecticide, dinamica zborului afidelor virulifere a fost urmarita in paralel cu cea a viermelui prunelor.

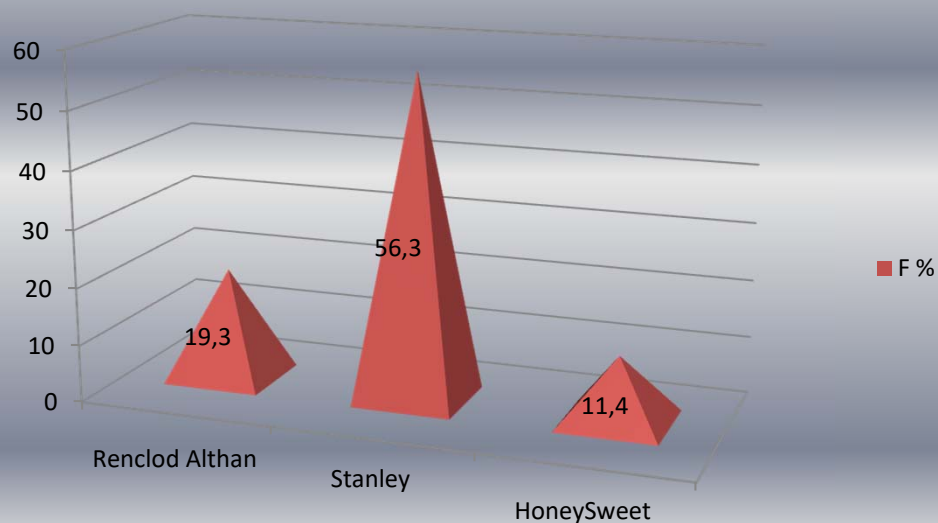
Prin analiza simultana a curbelor de zbor ale celor doi dăunători (afide și *Grapholita funebrana*) se poate observa că, desi exista fluctuații ale activității acestora, perioada de zbor coincide în cea mai mare parte. Prin urmare, tratamentele cu insecticide sunt necesare pentru combaterea viermelui prunelor, indiferent daca este sau nu necesara combaterea afidelor. Totuși, identificarea unor perioade scurte când curbele de zbor nu se suprapun ar permite evitarea unor tratamente cu insecticide, fara a stimula raspandirea virusului *Plum pox* la prunul transgenic HoneySweet. Rezultatele anului 2017 identifică o astfel de perioadă în luna septembrie când afidele isi reiau zborul pentru o perioada scurta, iar prezența zborului la *Grapholita funebrana* este practic inexistent.



Curbele de zbor ale afidelor și viermelui prunelor (*Laspeyresia funebrana*) în lotul experimental de la SCDP Bistrita - 2017

- Rezultatele privind comportarea la atacul produs de de viespea semințelor de prun (*Eurytoma schreineri*), în condițiile aplicării unui număr redus de tratamente cu insecticide, observațiile și determinările efectuate indică prezența acestui important dăunător la toate cele trei soiuri, însă cu predilecție la soiul Stanley , care a fost grav afectat (F% =56). Celelalte două soiuri au fost și ele afectate, însă frecvența atacului a fost mult mai redusă, respectiv 19,3 % la soiul Renclod Althan și 11,4 % la soiul HoneySweet.

Frecvența atacului de *Eurytoma schreineri* (2017)



Cădere masivă a fructelor cauzată de *Eurytoma schreineri* (a) și modul de dăunare (b) la soiul Stanley din lotul experimental (2017)



2.4. Diseminare rezultate

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

- Cu ocazia participării la *"1st COST iPLANTA Conference creating a plant RNAi research network COST Action CA15223"* (15-16 febr, Roma, Italia), echipa SCDP Bistrița a contribuit cu două referate:
 - ***"Field trials for Plum pox virus resistance of HoneySweet transgenic plum in Romania"*** (autori I. Zagrai, M. Ravelonandro, R. Scorza, L. Zagrai, N. Minoiu),
 - ***"Inducing RNAi mechanisms as a way of tackling of the PPV genome in woody perennial plants"*** (autori M. Ravelonandro, R. Scorza, I. Zagrai, C. Dardick, A. Callahan, L. Zagrai, P. Briard)
- Cu ocazia participării la *<i>PLANTA workshop on Biosafety issues associated with RNAi at the IOBC-WPRS Working Group "GMOs in integrated plant production">* (6-7 septembrie 2017 Gent, Belgia), echipa de cercetare de la SCDP Bistrița a contribuit cu trei lucrări:
 - ***"Preliminary assessment on the potential reduction of treatments with insecticides for aphids by using rnaï technology in plum against Plum pox virus"*** (autori I. Zagrai, L. Zagrai, M. Ravelonandro, R. Scorza, Z. Jakab, G. Guzu);
 - ***"Are there any issues in eating fruits bearing either rnaï or virus?"*** (autori M. Ravelonandro, I. Zagrai, L. Zagrai, R. Scorza, A. Callahan, C. Dardick, P. Briard) (abstract anexat).
 - ***"Making RNAi Plum pox virus resistant plum trees available to farmers for integrated orchard disease management "*** (autori Ralph Scorza, Michel Ravelonandro, Chris Dardick, Ann Callahan, Jaroslav Polak, Ioan Zagrai, Luminita Zagrai, Tadeusz Malinowski, Mariano Cambra, Ivanka Kamenova)
- Participarea a doi membri din echipa de cercetare, câte unul de la fiecare partener, la a-VIII-a conferință internațională CASEE *"Sustainable development in Europe - cooperation between science and practice - What's the position of Central and South Eastern Europe?"*, (14-16 mai 2017, Varșovia, Polonia), a făcut posibilă susținerea a două lucrări:
 - ***"Plum pox virus is detectable in symptomatic and symptomless fruits from infected plum trees"*** (autori: Zagrai Luminita, Michel Ravelonandro, Pascal Briard, Ioan Zagrai);
 - ***"Preliminary chemical composition of two conventional and one genetically engineered plum cultivars"*** (autori: Bobis Otilia, Ioan Zagrai, Victorița Bonta, Luminița Zagrai, Liviu Marghitas, Daniel Dezmirean, Claudia Pasca, Adriana Urcan). Cele două lucrări au fost prezentate și la *"16th International Symposium for the 3rd Millennium Agriculture"*, organizată de Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca (14-16 mai 2017). De asemenea, cu aceasta ocazie a fost prezentată o a treia lucrare cu rezultate ale proiectului intitulată ***"Preliminary comparative study on plum fruit moth (Grapholita funebrana, treitschke) flight curve in two plum experimental plots"*** (autori Zsolt Jakab-Ilyefalvi, Ioan Zagrai, Luminița Zagrai).
- Lucrarea ***"Comparative studies on chemical composition of two conventional bred and one genetically engineered plum-fruits"*** (autori Otilia Bobiș, Ioan Zagrai, Victorița Bonta, Luminița Zagrai, Liviu Al. Mărghițaș, Daniel Dezmirean) a fost publicată în Buletinul USAMV Cluj, vol.75.
- O parte din rezultatele obținute au fost publicate la un nivel accesibil fermierilor în lucrarea intitulată ***"Rezultate preliminare privind potențialul productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor"*** * (autori Ioan Zagrai, Luminita-Antonela Zagrai, Georgeta Guzu), revista Hortus, nr. 15 / 2017.

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

Ing. Georgeta GUZU

Tehn. Sabin SUCIU

P1 – USAMV Cluj la determinările privind compoziția chimică a fructelor

Responsabil: Prof. Liviu Al. Mărghițaș

Membri: Prof. Daniel Dezmirean

Conf. Otilia Bobiș

Chim. Victorita BONTA

Drd. Claudia PASCA

Drd. Adriana URCAN