

Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale
Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița

Dr. ing. Ioan ZAGRAI

Dr. ing. Luminița Antonela ZAGRAI

**TESTAREA PRUNULUI
TRANSGENIC ‘HONEYSWEET’
ÎN ROMÂNIA**

Editura MESAGERUL Bistrița

2018

Lucrarea fost elaborată în cadrul proiectului sectorial ADER 4.1.3/2015 - *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*, finanțat de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, România.

Autorii mulțumesc tuturor celor care de-a lungul anilor și-au adus aportul, într-o formă sau alta, la realizarea acestor studii de lungă durată.

Prefață

*Lucrarea **Testarea prunului transgenic ‘HoneySweet’ în România** înglobează o sinteză a cercetărilor care au vizat prunul transgenic cu rezistență derivată din patogen, cercetări efectuate la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură (SCDP) Bistrița, de-a lungul unei perioade de peste două decenii.*

În primul capitol sunt prezentate sintetic problematica virusului Plum pox (PPV) pentru cultura prunului și necesitatea obținerii de soiuri rezistente, ca soluție eficientă în combaterea acestuia, cu referire specială la prunul transgenic.

În cel de-al doilea capitol se regăsesc rezultate ale testării rezistenței prunului transgenic la infecțiile naturale cu virusul Plum pox în condiții endemice din România și ale verificării stabilității rezistenței prunului HoneySweet la infecțiile artificiale mixte cu PPV și virusuri heteroloage. Capitolul este completat cu prezentarea unor rezultate referitoare la ereditatea rezistenței la PPV a prunului transgenic HoneySweet.

Capitolul al treilea este destinat prezentării cercetărilor din România referitoare, pe de o parte, la potențialul impact al prunului transgenic asupra diversității populațiilor indigene a virusului Plum pox, iar pe de alta parte, asupra unor organisme non-țintă, în speță asupra populațiilor indigene de afide vectori, respectiv asupra albinelor.

Rezultatele cercetărilor privind performanțele agronomice și fenotipice ale prunului transgenic ‘HoneySweet’ în condițiile din România sunt sintetizate în cel de-al patrulea capitol, studiile fiind efectuate în

contextul producerii de fructe libere de virusul Plum pox și a reducerii poluării mediului.

Rezultatele de ansamblu obținute de-a lungul timpului, de la obținerea prunului transgenic și până în prezent sunt utilizate pentru construcția ultimului capitol dedicat unor recomandări privind politica națională referitoare la eventuala cultivare a prunului transgenic în România.

Obținerea rezultatelor prezentate în lucrare a fost posibilă atât prin colaborarea, la nivel național, dintre SCDP Bistrița și Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca și Universitatea Babeș Bolyai, Facultatea de Biologie, cât și la nivel internațional dintre SCDP Bistrița și USDA Appalachian Fruit Research-SUA, INRA Bordeaux-Franța, IVIA Valencia-Spania. Aceste cercetări au fost finanțate, în principal, în cadrul a două mari proiecte, unul național finanțat de către Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale (ADER 4.1.3 / 2015) și un altul internațional (FP5 -TRANSVIR-QLK3-CT-2002-02140) finanțat de către Comisia Europeană (cofinanțare Ministerul Educației, Cercetării și Tineretului). La acestea se adugă și alte proiecte finanțate de către Departamentul de Stat al Agriculturii –SUA și Black Sea Biotechnology Association, precum și un proiect de colaborare bilaterală SCDP Bistrița-INRA Bordeaux.

Lucrarea se adresează atât fermierilor din pomicultură, cât și altor specialiști din domeniu, precum și profesorilor, studenților și altor potențiali beneficiari (DAJ, UFJ, ITCSMS, etc). De asemenea, lucrarea oferă informații importante care pot fi utilizate de ministerele de resort în elaborarea politicii naționale referitoare la prunul transgenic și alte OMG-urile cu insert similar.

CUPRINS

CAP. I	INTRODUCERE.....	7
CAP. II	REZISTENȚA PRUNULUI TRANSGENIC LA VIRUSUL <i>PLUM POX</i>	13
	2.1. Studiul rezistenței prunului transgenic la infecțiile naturale cu virusul <i>Plum pox</i> în condițiile endemice din România.....	13
	2.2. Studiul stabilității rezistenței la virusul <i>Plum pox</i> a clonei de prun transgenic C ₅ în condițiile coinfectiei cu virusuri heteroloage.....	17
	2.3. Ereditatea rezistenței prunului transgenic la virusul <i>Plum pox</i>	21
CAP. III	IMPACTUL PRUNULUI TRANSGENIC ASUPRA VARIABILITĂȚII VIRUSULUI <i>PLUM POX</i> ȘI A ORGANISMELOR NON-ȚINTĂ.....	29
	3.1. Evaluarea impactului prunului transgenic asupra variabilității virusului <i>Plum pox</i>	29
	3.2. Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul modificat genetic asupra populațiilor indigene de afide.....	41
	3.3. Evaluarea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali.....	49

CAP. IV	POTENȚIALUL PRODUCTIV ȘI CALITATIV AL PRUNULUI TRANSGENIC ȘI POSIBILITĂȚILE DE REDUCERE A TRATAMENTELOR PENTRU COMBATEREA AFIDELOR.....	57
	4.1. Evaluarea potențialului productiv al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.....	59
	4.2. Evaluarea potențialului calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor.....	67
	4.3. Evaluarea posibilității de aplicare a unor practici de management prietenoase mediului pentru prevenirea răspândirii virusului <i>Plum pox</i>	83
CAP. V	RECOMANDĂRI PRIVIND POLITICA NAȚIONALĂ REFERITOARE LA EVENTUALA CULTIVARE A PRUNULUI TRANSGENIC ÎN ROMÂNIA	89
	Bibliografie.....	96

CAP. I. INTRODUCERE

Cercetările privind obținerea prunului transgenic cu rezistența derivată din patogen au fost inițiate și derulate în Statele Unite ale Americii (SUA), iar testarea rezistenței la virusul *Plum pox* s-a efectuat atât în SUA cât și în țări ale Uniunii Europene (UE), respectiv în Franța, Spania, Polonia, Cehia și România, ca o necesitate pentru identificarea unor soluții eficiente în combaterea virusului *Plum pox*.

Virusul *Plum pox* (PPV) este cel mai distructiv agent viral și patogen de carantină al speciilor pomicele sâmburoase, cauzând uriașe pierderi de producție și deprecieri calitative, în special în livezile din centrul și estul Europei, unde boala este larg răspândită (Nemeth, 1986). Virusul a fost semnalat pentru prima oară în Bulgaria (Atanassov, 1932), iar de atunci s-a răspândit progresiv în cea mai mare parte a continentului european, în jurul Bazinului Mediteranean, în Orientul Apropiat și Orientul Mijlociu, în sudul și nordul Americii (Argentina, Canada, Chile și SUA) precum și în Asia (China, Iran, Kazakhstan și Pakistan) (Capote și colab., 2006), iar recent în Japonia (Maejima și colab., 2010), devenind astfel o problemă mondială de maximă importanță pentru cultura speciilor pomicele sâmburoase. Acest virus este extrem de păgubitor deoarece poate deprecia foarte mult calitatea fructelor (prin deformări puternice - Foto 1, scurgeri de gome, dezechilibre între zahăr și aciditate, decolorări ale pielii etc.) și cauzează adesea căderea prematură a acestora (Foto 2), fructele devenind improprii consumului. Aceste efecte au serioase consecințe economice din cauza pierderilor uriașe de producție care se înregistrează an de an. Cheltuielile globale asociate cu managementul limitării impactului acestei boli la nivel mondial, excluzând costurile aferente pierderilor de producție, au fost estimate la peste 10 000 milioane de euro pe o perioadă de 30 de ani, ceea ce înseamnă un impact social considerabil (Cambra și colab., 2006).



a



b

Foto 1. Simptome ale virusului *Plum pox* pe fructe (a) si afectiuni ale pulpei (b)



Foto 2. Căderea prematură a fructelor provocată de virusul *Plum pox*

În țara noastră virusul *Plum pox* este răspândit în toate zonele de cultură ale prunului producând pagube deosebite, până la 85% și chiar compromiteră totală a producției la soiurile sensibile (Minoiu, 1997). O evaluare la scară națională, efectuată în perioada 2006-2009 dezvoltă situația extrem de critică și necontrolabilă la virusului *Plum pox* în plantațiile de prun din România. Nicio livada de prun nu a fost găsită liberă de PPV, iar rata medie de infecție s-a situat la 68,5 % (Zagrai și colab., 2010a). În ceea ce privește existența tulpinilor virale ale PPV în livezile de prun din România, rezultatele au relevat doar prezența PPV-D (Dideron sau clorotică) și PPV-Rec (recombinată), atât în infecții singulare cât și mixte (Figura 1), generatoare ale altor posibile variațiuni genetice prin recombinare (Zagrai și colab., 2010b). Este foarte interesant că, deși România este cunoscută ca un centru endemic al virusului *Plum pox*, tulpina PPV-M (Marcus sau necrotică), cunoscută ca cea mai epidemică și mai agresivă, nu a fost identificată în România (Zagrai și colab., 2006, 2008a, 2009, 2010b,c). Evident, pătrunderea acestei tulpini în România ar agrava și mai mult situația existentă. Oricum, în contextul actual, infecțiile cu PPV reprezintă factorul cel mai limitativ pentru profitabilitatea culturii prunului în România. Astfel, poate fi explicat în cea mai mare parte regresul producției acestei specii, deși în România prunul rămâne specia pomicolă dominantă.

Nu există nicio metodă curativă de combatere a acestui periculos patogen. Pentru eradicarea virusului *Plum pox*, metode stricte precum: carantina fitosanitară, propagarea materialului săditor liber de viroze, tratamente suplimentare pentru combaterea vectorilor viruliferi, eliminarea pomilor infectați ș.a. sunt recomandate a fi aplicate. Măsurile de carantină și programele de eradicare bazate pe eliminarea pomilor infectați s-au dovedit a fi adesea ineficiente pentru stoparea răspândirii PPV, mai ales în zonele endemice. În pofida pierderilor uriașe de producție, în foarte multe țări, printre care și România, se acceptă și acum coexistența cu boala.

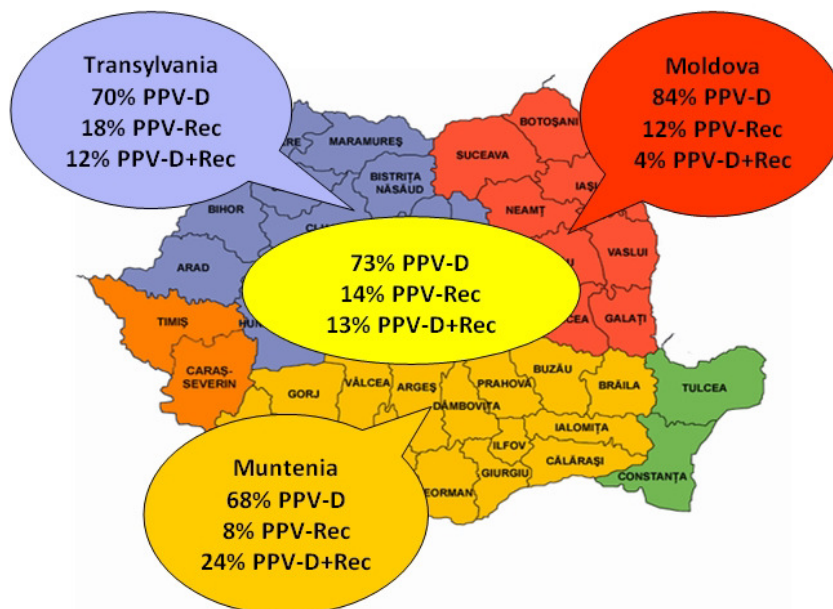


Figura 1. Distributia tulpinilor PPV la nivelul regiunilor Transilvania, Muntenia si Moldova (Zagrai și colab., 2010)

Datorită răspândirii rapide a PPV prin intermediul afidelor și existenței numeroaselor gazde potențiale, eradicarea bolii devine extrem de dificil de realizat odată ce prezența ei a fost semnalată într-o regiune. De aceea, cercetările privind posibilitățile de control ale virusului *Plum pox*, prin crearea unor soiuri rezistente, rămân de mare interes în viziunea oricărui ameliorator european, fiind cea mai sigură modalitate de luptă eficientă împotriva acestui distructiv patogen viral. Deși de peste 70 de ani s-au făcut eforturi considerabile pentru identificarea și cumulara genelor de rezistență naturale prin metode de ameliorare convențională (Kegler și colab., 1998), lipsa acută a surselor de rezistență la PPV au determinat o eficiență redusă a acestor eforturi în controlul *Plum pox*-ului. Un tip de rezistență naturală, prin hipersensibilitate, a fost, totuși, raportat la soiul de prun Jojo (Hartmann și Petruschke, 2002). Rezistența la PPV a soiului Jojo a fost însă contestată ulterior de către Polak și colab. (2005), care au arătat că virusul *Plum pox* poate fi prezent în țesuturile acestui soi deoarece se

transmite la portaltoi. De asemenea, a fost raportată depășirea barierei hipersensibilității acestui soi, întrucât la inocularea cu tulpina PPV-D, s-a constatat chiar o reacție sistemică cu simptome severe de PPV (Polak și Jarošová, 2011). În această situație, obținerea unor forme de prun rezistente la PPV prin utilizarea tehnicilor de inginerie genetică rămâne ca o soluție alternativă sau complementară la ameliorarea convențională.

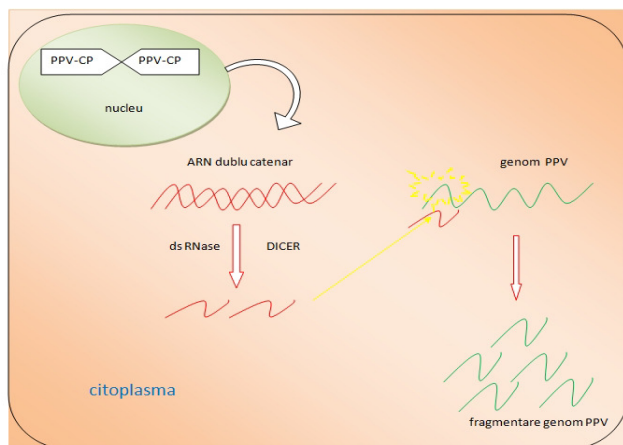
Sanford. J. C. și Johnston, S.A. (1985), Powel și colab. (1986) au arătat că, prin transgeneză, plantele transformate, exprimând învelișul proteic al virusului (CP), pot fi rezistente la infecțiile virale. Această strategie, denumită „rezistență derivată din patogen” (RDP), a fost aplicată în programele de ameliorare a rezistenței prunului la PPV ca o abordare complementară la ameliorarea convențională. Aplicarea strategiei RDP la *Prunus domestica* L. a condus la obținerea mai multor clone de prun transgenic ce conțin 1-3 copii ale genei ce codifică proteina capsidei virusului *Plum pox*, împreună cu doi markeri selecționabili (*npt II* - marker selecționabil în procesul de transformare și *uid A* - marker cromogenic) (Scorza și colab., 1994). Una dintre aceste clone, denumită C₅, patentată în Statele Unite ale Americii sub denumirea ‘HoneySweet’ (Scorza și colab., 2007), s-a remarcat, mai întâi, printr-un înalt grad de rezistență la virusul *Plum pox* în cazul inoculărilor efectuate în condiții de seră (Ravelonandro și colab., 1997; Hily și colab., 2004).

Reușita obținerii clonei transgenice C₅ este rezultatul cooperării dintre USDA - ARS Kearneysville (West-Virginia, USA) și INRA Bordeaux (Franța) și reprezintă un mare succes în lupta împotriva celei mai devastatoare maladii virale (*Plum pox* sau *Sharka*) întâlnită la speciile sâmburoase. De asemenea, prunul transgenic cu RDP deschide noi posibilități de ameliorare a rezistenței prin metode convenționale întrucât rezistența la PPV a clonei C₅ poate fi transmisă la descendenți după modelul caracterelor alternative (Scorza și colab., 1998; Ravelonandro și colab., 2001).

Dacă ne referim la mecanismul rezistenței, soiul „HoneySweet” a fost creat pe un principiu care se aseamănă cu vaccinarea la oameni. Prin inserarea în genomul plantei a unui fragment mic de ADNc din virusul *Plum pox*, se creează o reacție imunitară a plantei care recunoaște orice infecție cu acest virus și îl distruge.

Rezistența la PPV a prunului transgenic HoneySweet este de tipul RDP (rezistență derivată din patogen), bazată pe silențiere posttranscripțională care determină o inhibiție a replicării virale. Mecanismul rezistenței este prezentat schematic în figura 2.

Figura 2. Prezentarea schematică a mecanismului de rezistență la PPV prin silențiere posttranscripțională la prunul transgenic HoneySweet



Mai precis, două copii ale genei capsidale ale virusului *Plum pox* (PPV-CP) poziționate cap la cap (hairpin), inserate în genomul prunului HoneySweet, generează molecule de ARN dublu catenar la nivelul citoplasmei. Sub acțiunea unei endoribonucleaze specifice, numită DICER, ARN-ul dublu catenar este fragmentat, prin clivare, rezultând astfel molecule de „small interfering RNA”. Aceste molecule se atașează pe bază de complementaritate de ARN-ul viral infecțios în cadrul unui complex de silențiere indusă ("RNA induced silencing complex" – RISC). Rezultatul final al acestui proces complex este degradarea ARN-ului viral și stoparea infecției.

CAP. II. REZISTENȚA PRUNULUI TRANSGENIC LA VIRUSUL *PLUM POX*

Rezistența prunului transgenic a fost studiată atât sub presiune de infecție naturală cu PPV într-o zonă endemică, cât și sub presiune de infecție artificială, prin inoculare cu muguri infectați cu PPV. De asemenea, cercetările au fost extinse la studiul eredității mecanismului de rezistență.

2.1. Studiul rezistenței prunului transgenic la infecțiile naturale cu virusul *Plum pox* în condițiile endemice din România

În România, testarea rezistenței prunului transgenic în condiții de mare presiune a infecției naturale cu PPV s-a efectuat în trei loturi experimentale, situate în perimetrul Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură din Bistrița (Zagrai și colab., 2008b). Prunii transgenici, care au făcut obiectul acestor testări, au fost produși în Franța, la INRA Bordeaux. În concordanță cu recomandările Uniunii Europene, loturile experimentale au fost înconjurate de o zonă tampon care, la Bistrița, a fost constituită din livezi de măr.

Primul lot, înființat în anul 1996, a inclus 60 de pruni transgenici, din șapte clone (C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, PT3 și PT5). Prunii transgenici au fost plantați în interiorul unei livezi de prun în vârstă de 6 ani puternic infectată cu PPV. După un an de la plantare, 35 de pruni transgenici s-au uscat, probabil din cauza adaptării reduse a portaltoiului *Prunus marianna* la condițiile solului argilos din regiune. Pentru a corecta această aparentă inadaptare, au fost înființate alte două loturi experimentale în anul 1998, utilizându-se ca portaltoi mirobolanul (*Prunus cerasifera*).

Al doilea lot experimental a inclus opt pomi aparținând clonei transgenice C₅, care au fost intercalați în vecinătatea unor pruni convenționali, cunoscuți ca fiind toleranți la PPV. Presiunea de infecție cu

PPV a fost asigurată de alți pruni convenționali, infectați cu acest virus care se aflau la extremitățile lotului.

Al treilea lot experimental a inclus 21 de pruni transgenici aparținând clonelor C₂, C₄, C₅, C₆ și PT3, care au fost plantați randomizat într-o livadă de prun convențional în vârstă de doi ani. La data plantării prunilor transgenici, incidența PPV în această livadă era de 4,5%.

Monitorizarea PPV în cele trei loturi s-a realizat atât prin observații vizuale cât și prin diagnostic serologic (DAS-ELISA - Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Clark și Adams, 1977) și molecular (IC/RT-PCR - Immunocapture-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) (Wetzel și colab., 1991).

În primul lot experimental, după 10 ani de testare în câmp, s-au infectat 44% dintre prunii transgenici aparținând clonelor C₂, C₃, C₄, C₆ și PT3, în timp ce incidența PPV în prunii convenționali a crescut de la 23% (1996) la 76% (2006). Dinamica incidenței PPV a fost asemănătoare la prunii convenționali și la cei transgenici, cu excepția clonei transgenice C₅. Deși populații frecvent de afidele vectoare, pomii acestei clone nu au fost infectați, remarcându-se printr-un nivel înalt și durabil al rezistenței la PPV (Figura 3).

În al doilea lot experimental, după opt ani de testare, toți cei opt pomi aparținând clonei transgenice C₅ au rămas liberi de PPV. Majoritatea prunilor convenționali considerați toleranți la PPV, aflați în vecinătatea prunilor transgenici, s-au infectat cu acest agent patogen. Răspândirea PPV în cel de-al doilea lot a avut o evoluție crescătoare continuă la prunii convenționali, în timp ce rezistența clonei transgenice C₅ s-a dovedit durabilă (Figura 4).

Dinamica răspândirii PPV în cel de al treilea lot experimental a evidențiat faptul că, după cinci ani de testare în câmp, incidența patogenului a fost similară la prunii convenționali și la cei transgenici, cu excepția clonei C₅. La prunii convenționali, rata infecției a crescut de la 4,5%, în anul 1998, la 39,8%, în anul 2003, ceea ce demonstrează că

prunul transgenic a fost expus la o presiune considerabilă de infecție cu PPV mediată de afide virulifere. Rezultatele testelor de diagnostic serologic (DAS-ELISA) și molecular (IC-RT-PCR) au confirmat faptul că doar clona transgenică C₅ a rămas neinfectată cu PPV (Figura 5).

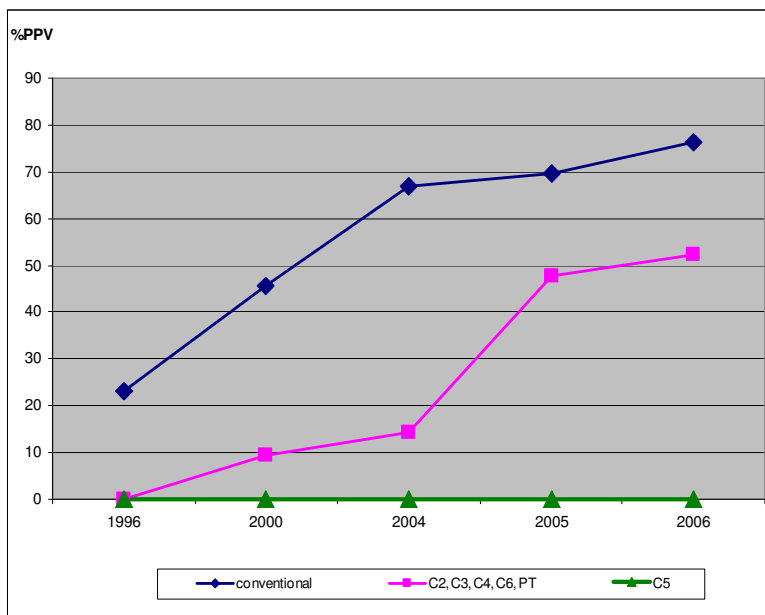


Figura 3. Dinamica răspândirii virusului *Plum pox* în primul lot experimental

Rezultatele obținute în cele trei loturi experimentale demonstrează existența unei presiuni de infecție naturală cu PPV corespunzătoare răspândirii virusului, condiții în care clona C₅ a rămas liberă de virus pe tot parcursul studiului. Se poate conchide astfel, că prunul transgenic C₅ posedă un nivel înalt și durabil al rezistenței la infecțiile naturale cu PPV.

Rezultate similare au fost obținute și la experiențele din Polonia, Spania și Cehia (Malinowski si colab., 2006; Polak și colab., 2005, 2017).

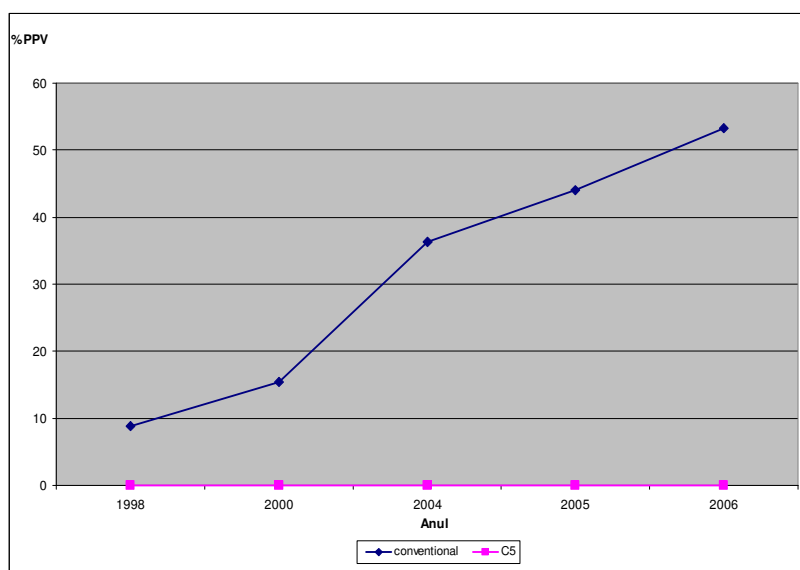


Figura 4. Dinamica răspândirii virusului *Plum pox* în al doilea lot experimental

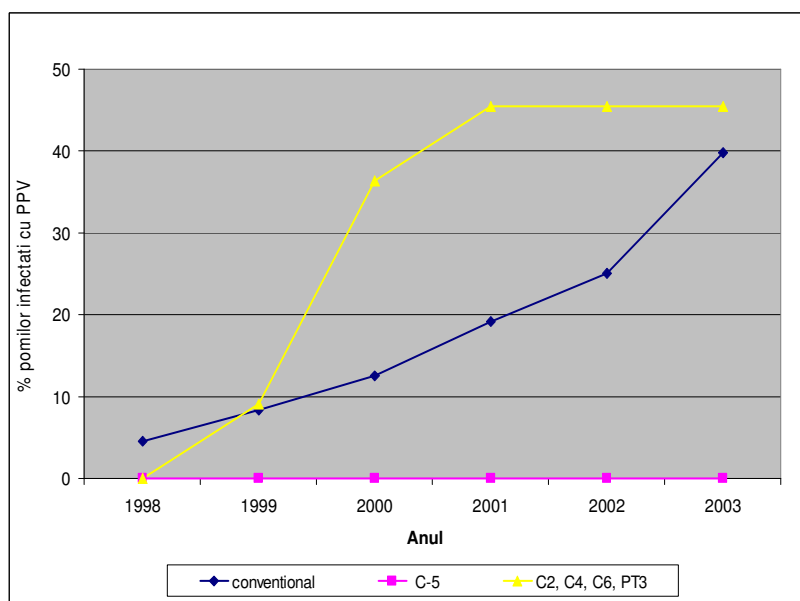


Figura 5. Dinamica răspândirii virusului *Plum pox* în al treilea lot experimental

2.2. Studiul stabilității rezistenței la virusul *Plum pox* a clonei de prun transgenic C₅ în condițiile coinfecției cu virusuri heteroloage

Plantele transgenice care exprimă gene virale pot avea diferite grade de rezistență față de virusul de la care au fost transferate respectivele gene (Beachy și colab., 1990). Genele virale cele mai frecvent utilizate în cadrul strategiei RDP (rezistență derivată din patogen) sunt cele care codifică proteina capsidului (coat protein - CP). De la prima raportare referitoare la rezistența tutunului transgenic, mediată de o genă CP, la virusul mozaicului tutunului (Abel și colab., 1986), această strategie a permis obținerea mai multor plante modificate genetic rezistente la diferite virusuri. Clona de prun transgenic C₅, denumită "HoneySweet", rezistentă la virusul *Plum pox*, este un exemplu notoriu. Rezistența la PPV a clonei transgenice C₅ se bazează pe mecanismul PTGS specific de degradare a ARN viral (Scorza și colab., 2001). Infecția virală poate declanșa mecanismul PTGS, care presupune sinteza ARNsi (ARN silencing) și degradarea ARN viral (Hamilton și Baulcome, 1999; Hily și colab., 2005). Ca răspuns la acest mecanism de apărare, unele virusuri activează gene supresoare ale silențierii (Anandalakshmi și colab., 1998; Voinnet, 2001). De exemplu, s-a demonstrat că gena *hc-pro* (helper component proteinase) a potivirusurilor poate fi un supresor al PTGS (Brigneti și colab., 1998; Kasschau și colab., 1998). Trebuie precizat însă că acest fenomen a fost raportat doar la plantele erbacee (García și Cambra, 2007) în condiții de seră. Nu există raportări care să confirme prezența unui astfel de fenomen la speciile de pomi fructiferi sau la alte plante, în condiții de câmp.

În România, cercetările privind stabilitatea mecanismului PTGS la clona transgenică C₅ în cazul infecțiilor mixte cu PPV și cu virusurile heteroloage *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) și *Prune dwarf virus* (PDV) s-au desfășurat la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură din Bistrița, în cadrul a două experiențe efectuate în câmp. Un experiment a fost organizat într-o livadă (lotul 3), iar un altul - într-o

pepinieră experimentală (Zagrai și colab., 2008c). Pomilor ce aparțineau clonei transgenice C₅ le-au fost inoculate tulpina PPV-D (Dideron sau clorotică) și combinațiile PPV + PDV sau PPV + PNRSV. Ca martori, au fost utilizați pruni convenționali supuși unor inoculări similare.

Infecțiile virale (PPV, PDV și PNRSV) au fost monitorizate prin observarea vizuală a simptomelor exteriorizate și prin diagnostic serologic și molecular. Diagnosticul serologic s-a bazat pe rezultatele testului DAS-ELISA, pentru a cărui efectuare au fost folosite antiseruri policlonale pentru PPV, PDV și PNRSV. Diagnosticul molecular s-a bazat pe rezultatele IC-RT-PCR, pentru care au fost utilizate perechile de amorse: P1/P2 pentru PPV (Wetzel și colab., 1991); PNRSV-10F/PNRSV-10R pentru PNRSV (Marbot și colab., 2003); PDV-17F/PDV-12R pentru PDV (Kummert și colab., 2001).

În experimentul organizat **în livadă**, la un an de la inoculare, în cazul clonei transgenice C₅ nu a fost observat vreun simptom specific bolilor generate de cele trei virusuri (PPV, PDV și PNRSV), iar rezultatele testului DAS-ELISA au fost negative. Prezența celor trei virusuri a fost însă confirmată pe lăstarii derivați din mugurii folosiți pentru inocul. De asemenea, concentrații reduse ale PPV și PDV au fost detectate în prunii convenționali pe care au fost făcute inoculări.

La doi ani după inoculare, rezultatele testelor DAS-ELISA au arătat că, la pomii transgenici C₅, virusurile heteroloage (PDV și PNRSV) au fost translocate de la locul inoculării. De asemenea, la aceiași pomi C₅, virusul *Plum pox* a fost detectat în concentrații foarte reduse și a indus simptome discrete numai pe câteva frunze de pe ramurile pe care au fost făcute inoculările. Dimpotrivă, la prunii convenționali (martori), concentrația virală a fost mare și au apărut simptome foarte evidente pe frunzele ramurilor pe care au fost făcute inoculările. Mai mult, simptomele induse de PPV pe ramurile pe care nu au fost făcute inoculări au indicat faptul că agentul patogen în cauză a invadat o mare parte din coroana prunilor convenționali.

La trei ani de la inoculare s-a constatat că virusul *Plum pox* nu s-a răspândit în coroana pomilor aparținând clonei transgenice C₅. În toate cazurile, atât în urma infecțiilor singulare cât și în urma infecțiilor mixte, la prunii C₅, virusul *Plum pox* a indus doar simptome sporadice, constând din pete difuze și discrete, fiind detectat prin DAS-ELISA și IC-RT-PCR numai în apropierea zonelor în care au fost făcute inoculările. Nu au fost observate simptome pe ramurile pe care nu au fost făcute inoculări, iar absența PPV a fost confirmată de rezultatele testelor serologice și moleculare. Se poate deci conchide, că la prunii transgenici C₅ replicarea PPV a fost inhibată și, prin urmare, infecția a fost localizată. În schimb, la aceiași pruni C₅, deși nu au generat simptome evidente în coroanele pomilor, virusurile *Prune dwarf* și *Prunus necrotic ring spot* au fost detectate atât pe ramurile pe care au fost făcute inoculări cât și pe ramurile pe care nu au fost făcute inoculări, fapt ce indică o infecție sistemică.

În experimentul efectuat **în pepinieră**, la plantele aparținând clonei transgenice C₅, virusul *Plum pox* a fost transferat de la locurile inoculării, respectiv din mugurii infectați, însă a fost detectat doar în partea bazală a pomilor C₅, adică în proximitatea inoculului. Deși virusul *Plum pox* a fost detectat la un an după inoculare, infecția nu a devenit sistemică în următorii doi ani, ceea ce demonstrează că a avut loc o inhibiție a replicării virale. Dimpotrivă, virusurile *Prune dwarf* și *Prunus necrotic ring spot* au produs infecții sistemice rapide, confirmate atât prin diagnostic serologic cât și molecular, deși PNRSV nu a generat simptome vizibile.

Atât în experimentul efectuat în livadă cât și în experimentul efectuat în pepinieră, la plantele transgenice C₅ nu au fost observate diferențe în privința exteriorizării simptomelor sau a răspândirii PPV între variantele de inoculare. Mai precis, între varianta în care a fost inoculat PPV și varianta în care a fost inoculată combinația PPV + virusuri heteroloage.

Privite în ansamblu, rezultatele arată că, indiferent de tipul de infecție (singulară cu PPV sau mixtă cu PPV+PDV/PNRSV), reacțiile clonei transgenice C₅ față de PPV au fost similare. Concret, la clona transgenică

C₅, virusul *Plum pox* poate produce doar o infecție limitată, independent de prezența virusurilor heteroloage. În ambele experimente, această infecție a rămas însă aproape de locul inoculării, nedevenind sistemică, iar simptomele induse de PPV au fost fie absente, fie sporadice și mijlociu evidente, indicând o inhibiție efectivă a replicării virale (Figura 6).

Rezultatele obținute în România, care relevă stabilitatea rezistenței la *Plum pox* a clonei transgenice C₅ în prezența unor virusuri heteroloage, au fost confirmate de rezultatele experiențelor desfășurate în Spania (Zagrai și colab., 2008c) și Cehia (Polak și colab., 2017). Mai mult, experiențele efectuate în Cehia au arătat ca infecția cu PPV a disparut complet după o perioadă lungă de timp (Polak și colab., 2017).

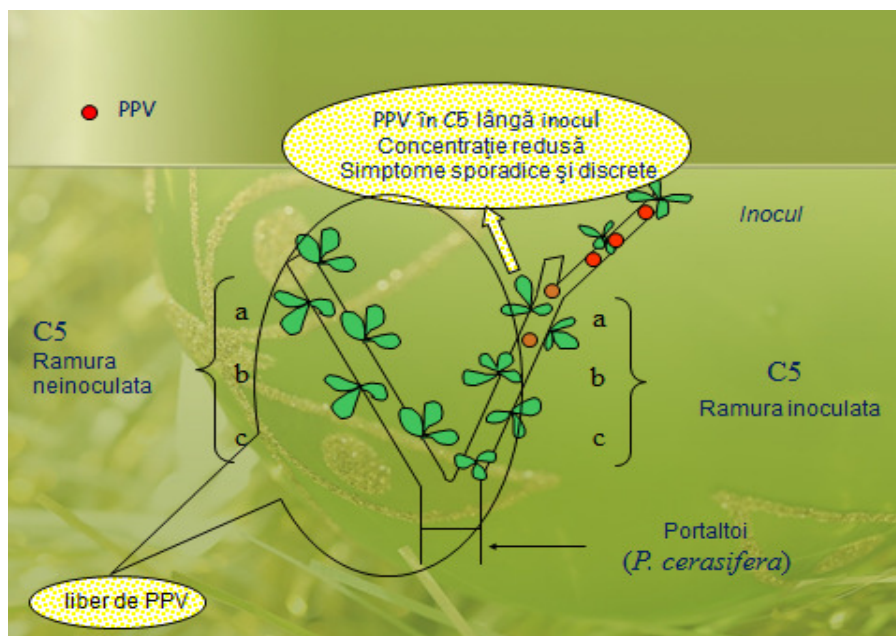


Figura 6. Prezentarea schematică a reacției prunului transgenic C₅ la inoculările artificiale cu PPV

2.3. Ereditatea rezistenței prunului transgenic la virusul *Plum pox*

Utilizarea clonei de prun transgenic C₅ (HoneySweet) în programele de ameliorare a rezistenței prunului la PPV este imperios necesară, în primul rând din cauza lipsei acute a surselor de rezistență la acest virus. În al doilea rând, nivelul foarte ridicat al rezistenței acestei clone oferă șansa obținerii, prin metode de ameliorare convențională, de noi soiuri de prun rezistente la PPV.

Șansele de reușită în ameliorarea rezistenței la PPV, prin utilizarea clonei transgenice C₅ ca sursă de rezistență depind, evident, de eficiența transmiterii în descendență a acestei însușiri. Se cunoaște că, în determinismul rezistenței la PPV a clonei C₅ sunt implicate multiple copii de transgene (CP) care formează un linkage (Scorza și colab., 1998). Problema care se pune este dacă în procesul de gametogeneză acest linkage va fi stabil sau, în caz contrar, cât de mare va fi instabilitatea lui. Acesta a fost unul dintre obiectivele cercetărilor efectuate la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița în perioada 1998-2002, dar s-a avut în vedere și studiul eventualelor probleme de incompatibilitate care ar fi putut apărea la hibridarea dintre soiurile speciei *Prunus domestica* cu prunul transgenic.

Pentru studiul transmiterii în descendență a rezistenței la PPV a prunului transgenic și a posibilităților de obținere a unor forme valoroase din acest punct de vedere s-a realizat o schemă ciclică de hibridare în care s-a folosit ca tester clona transgenică C₅ (genitor patern), iar ca genitori materni soiurile: Silvia, Minerva, Centenar, Carpatin, Dâmbovița și hibrizii P5/1, BN 6/260, BN 6/283.

Tehnica polenizării a fost cea obișnuită, practică în ameliorare. Izolarea florilor s-a făcut fără o prealabilă emasculație, deoarece majoritatea genitorilor materni sunt androsterili.

Pentru testarea viabilității polenului și pentru o justă interpretare a gradului de interfertilitate s-a determinat capacitatea germinativă a

polenului, prin însămânțarea acestuia pe un mediu agarizat; citirile s-au făcut la microscop, după 24 ore de la însămânțare, la 10 câmpuri microscopice, determinându-se procentul de polen germinat din totalul de grăunciori analizați. Determinarea proporției de fructe rezultate în urma polenizării s-a făcut la 35 de zile de la data polenizării.

Recoltarea fructelor rezultate din hibridări s-a făcut la maturitate deplină iar sâmburii extrași au fost stratificați în nisip după o prealabilă dezinfectare și păstrați la frigider. Semănatul sâmburilor s-a făcut la ghivece la sfârșitul lunii februarie iar puieții rezultați au fost transplantați în câmp la începutul lunii aprilie.

Pentru a se evita unele erori care ar fi putut apărea datorită neutilizării castrării în tehnica hibridării artificiale, studiul eredității s-a efectuat doar pe descendența P5/1 x C₅, cunoscut fiind faptul că genitorul matern este androsteril și, prin urmare, o eventuală autopolenizare care să influențeze raporturile de segregare este exclusă.

Menționăm că gena de interes (CP) integrată în genomul clonei C₅ poate fi ușor evidențiată indirect cu ajutorul a doi markeri selecționabili, frecvent utilizați în transgeneza vegetală (*uid A* și *npt II*). Astfel, pentru identificarea hibrizilor transgenic s-a evidențiat prezența genei *uid A* (marker) prin testul cromogenic GUS. Varianta utilizată pentru localizarea activității GUS și, indirect, a genei CP a fost cea indigogenică realizată conform protocolului descris de Vitha și colab. (1997).

Pentru confirmarea rezistenței la virusul *Plum pox* a descendenților purtători ai genei CP (evidențiată indirect prin analiza cromogenică GUS) s-a efectuat testul de rezistență. În acest sens, puieții în creștere au fost populați masiv cu afide virulifere din specia *Phorodon humuli*, transferate de pe un singur pom ce prezenta infecție generalizată cu PPV, folosindu-se astfel un singur izolat viral. La două săptămâni după transfer afidele au fost distruse printr-un tratament chimic cu insecticid.

Monitorizarea bolii s-a făcut, inițial, pe baza observațiilor vizuale (simptomatologie) iar, ulterior, diagnosticarea virusului s-a efectuat atât

serologic, prin intermediul testului imunoenzimatic DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay), cât și molecular prin IC-RT-PCR (Immunocapture - Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction). Materialul pentru testare a fost reprezentat de frunze prelevate de pe puieții infestați.

Din tabelul 1 rezultă că germinația polenului la clona C₅ (Foto 3), folosită ca genitor de rezistență la virusul *Plum pox*, nu ridică probleme în utilizarea ei ca formă paternă, în diferite combinații hibride. Rata medie de germinare, determinată în 10 câmpuri microscopice, a fost de 56,0%; au predominat tuburile polinice medii și lungi, capabile de fecundare.

Tabelul 1. Capacitatea de germinare a polenului la clona de prun transgenic C₅

Varianta	Număr de grăunciori/ câmp microscopic	Număr de grăunciori germinați	% germinare	Tuburi polenice		
				scurte	medii	lungi
C ₅	56	29	52	5	13	11
	48	27	56	5	11	11
	63	39	62	9	16	14
	61	36	59	9	13	14
	43	23	54	5	9	9
	45	21	47	3	10	8
	60	38	63	9	16	13
	57	34	60	6	15	13
	45	25	56	5	10	10
	52	28	54	6	12	10
Media	53	30	56	6	13	11

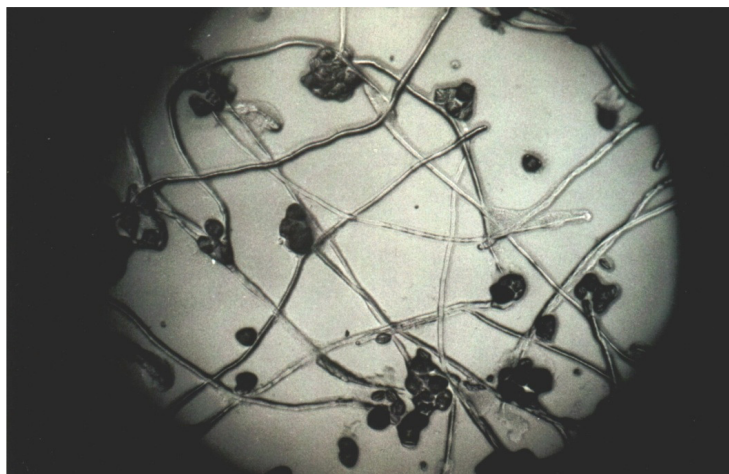


Foto 3. Germinarea grăunciorilor de polen la clona transgenică de prun C₅ pe mediu agarizat

Datele din tabelul 2 arată că, deși procente de legare a fructelor variază foarte mult în cadrul combinațiilor efectuate, putem afirma că folosirea ca genitor patern a clonei de prun transgenic C₅ în hibridări cu diferite soiuri din specia *Prunus domestica*, nu ridică, în general, probleme de incompatibilitate. Astfel, se constată o compatibilitate bună în cazul combinațiilor Carpatin x C₅, P 5/1 x C₅ și Minerva x C₅, la care proporția fructelor rezultate, în urma polenizărilor artificiale, a fost de 31,6%, 27,9% și 23,7%. Combinația BN 6/283 x C₅ s-a situat însă la extrema cealaltă, proporția de fructe rezultate fiind de 0,6%. Întrucât genitorul matern (BN 6/283) este androfertil iar pentru hibridare nu s-a efectuat castrarea, este posibil ca fructele să fie rezultatul autopolenizării. La celelalte combinații (Silvia x C₅, Centenar x C₅, Dâmbovița x C₅, BN 6/260 x C₅) valoarea procentului de legare s-a situat sub 10.

**Tabelul 2. Combinații hibride efectuate la prun, în anul 2001
-S.C.D.P. Bistrița-**

Combinația hibridă	Flori polenizate	Fructe rezultate (control I)	% fructe rezultate	Fructe recoltate
Silvia x C ₅	1350	32	2,4	11
Minerva x C ₅	1413	335	23,7	174
Centenar x C ₅	455	21	4,6	19
Carpatin x C ₅	832	263	31,6	108
Dâmbovița x C ₅	826	89	4,7	39
BN 6/260 x C ₅	1617	138	8,5	136
P 5/1 x C ₅	1375	383	27,9	317
BN 6/283 x C ₅	1037	6	0,6	3
TOTAL	8905	1267	-	807

Pentru studiul eredității și stabilității rezistenței prunului transgenic la PPV s-au analizat 30 de descendenți rezultați din combinația P 5/1 x C₅ (Tabelul 3).

Testul cromogenic GUS a evidențiat prezența genei marker (*uid A*) la 17 probe, respectiv la 56,7% din descendenți. Deci, gena de interes (CP) se transmite, în mod normal, la aproximativ jumătate din descendenți. Teoretic, pot exista însă situații când prezența genei marker nu înseamnă obligatoriu și prezența genei de interes cu care este linkată. Acestea se referă la posibilitatea ruperii înlănțuirii în urma unui crossing-over sau la apariția unor mutații genice sau cromozomale. De aceea, pentru o analiză cât mai obiectivă a transmiterii ereditare a acestei rezistențe și a stabilirii frecvenței apariției eventualelor fenomene genetice menționate anterior, ulterior analizei histogenice GUS, s-a efectuat și testul de rezistență.

Rezistența la PPV a descendenților purtători ai genei marker (transgenici) a fost confirmată prin testul de rezistență, în cadrul căruia, pentru transmiterea PPV-ului s-a utilizat afide virulifere.

Rezultatele au arătat că niciunul dintre descendenții transgenici nu au manifestat simptome de PPV, iar absența virusului a fost confirmată prin testele DAS-ELISA și IC-RT-PCR. Situația a fost total opusă în cazul descendenților netransgenici la care, deși simptomele au fost mai mult sau mai puțin evidente, prezența virusului a fost confirmată atât prin diagnostic serologic cât și molecular. Rezultatele obținute sugerează existența un linkage stabil atât între gena de rezistență și gena marker, cât și între copiile de transgene CP, întrucât descendenții ai căror genom conțin gena *uid A* au rămas neinfecțați confirmând astfel și prezența genei CP, respectiv rezistența la PPV precum și stabilitatea acesteia. Rezultatele relevă o separare distinctă în două clase de segregare, frecvența hibridilor transgenici reprezentând aproximativ jumătate din descendenți. Această segregare se încadrează în modelul mendelian de transmitere monogenică și confirmă alte rezultate conform cărora multiplele copii de transgene înserate în clona C₅ se comportă ca un grup de linkage stabil și, prin urmare, este transmis la descendenți ca o singură genă dominantă (Scorza și colab., 1998, 2013, Ravelonandro și colab., 1998, 2001). Totuși, posibilitatea apariției de genotipuri recombinante există, însă, frecvența acestora va fi, cu siguranță, redusă întrucât, se pare, intensitatea linkage-ului este foarte mare. Deși studiul s-a efectuat pe un număr relativ redus de descendenți, rezultatele obținute în România arată că prunul transgenic (clona C₅ - HoneySweet) reprezintă o sursă foarte importantă care poate fi folosită cu succes în programele de ameliorare a rezistenței la PPV a prunului.

Relatări similare au fost făcute și de către Ravelonandro și colab. (2001) care, în urma cercetărilor efectuate, au arătat că și hibridarea interspecifică dintre clona de prun transgenic C₅ (*Prunus domestica*) și

Prunus spinosa a dat rezultate bune, creând astfel șansele obținerii unor portaltui de vigoare redusă, rezistenți la PPV.

Tabelul 3. Transmiterea în descendență a genei CP și testarea rezistenței descendenților

Nr. crt.	Varianta	Rezultatul testului cromogenic GUS	Intensitatea simptomelor PPV	DAS-ELISA (PPV policlonal)	IC-RT-PCR (primeri P1/P2)
1.	P 5/1 x C ₅ - P ₁	+	-	-	-
2.	P 5/1 x C ₅ - P ₂	-	++++	+	+
3.	P 5/1 x C ₅ - P ₃	+	-	-	-
4.	P 5/1 x C ₅ - P ₄	+	-	-	-
5.	P 5/1 x C ₅ - P ₅	+	-	-	-
6.	P 5/1 x C ₅ - P ₆	-	+	+	+
7.	P 5/1 x C ₅ - P ₇	+	-	-	-
8.	P 5/1 x C ₅ - P ₈	+	-	-	-
9.	P 5/1 x C ₅ - P ₉	-	++++	+	+
10.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₀	+	-	-	-
11.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₁	+	-	-	-
12.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₂	-	++++	+	+
13.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₃	-	+	+	+
14.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₄	-	+++	+	+
15.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₅	+	-	-	-
16.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₆	+	-	-	-
17.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₇	-	++++	+	+
18.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₈	-	+	+	+
19.	P 5/1 x C ₅ - P ₁₉	+	-	-	-

20.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₀	+	-	-	-
21.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₁	-	++++	+	+
22.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₂	+	-	-	-
23.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₃	-	+++	+	+
24.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₄	+	-	-	-
25.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₅	+	-	-	-
26.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₆	+	-	-	-
27.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₇	+	-	-	-
28.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₈	-	+++	+	+
29.	P 5/1 x C ₅ - P ₂₉	-	++	+	+
30.	P 5/1 x C ₅ - P ₃₀	-	++++	+	+
TOTAL	pozitiv	17	13	13	13
	negativ	13	17	17	17

CAPITOLUL III. IMPACTUL PRUNULUI TRANSGENIC ASUPRA VARIABILITĂȚII VIRUSULUI *PLUM POX* ȘI ORGANISMELOR NON-ȚINTĂ

Prezența unui insert cu gene străine în genomul prunului transgenic a condus la invocarea unor potențiale riscuri asupra mediului derivate din prezența insertului respectiv. Un prim risc invocat s-a referit la posibilitatea ca gena capsidală (CP), devenită constitutivă, să afecteze diversitatea populațiilor indigene ale virusului *Plum pox* prin facilitarea apariției unor tulpini virale recombinante, cu patogeneză necunoscută. Un alt risc invocat a fost cel rezultat din interacțiunea dintre prunul transgenic și organismele non-țintă, în speță afidele care populează prunii transgenici și albinele polenizatoare.

3.1. Evaluarea impactului prunului transgenic asupra variabilității virusului *Plum pox*

Clonele de prun transgenic, obținute prin strategia RDP, conțin 1-3 copii ale genei ce codifică proteina capsidei virusului *Plum pox* (PPV-CP) (Scorza și colab., 1994). Astfel, a fost exprimat potențialul hazard conform căruia gena capsidală devenită constitutivă ar putea favoriza apariția unor noi tulpini virale. Prin urmare, a fost evaluată probabilitatea ca această genă, devenită constitutivă, să afecteze variabilitatea populațiilor virale indigene. Mai precis, a fost evaluat riscul potențial ca prunul transformat cu gena PPV-CP să faciliteze apariția virusurilor recombinante care pot avea proprietăți biologice noi (agresivitate, virulență) (Wintermantel și Schoelz, 1996).

Studiul impactului potențial al prunului transgenic asupra variabilității virusului *Plum pox* a fost efectuat în România și Spania, în cadrul unui proiect internațional (FP5-TRANSVIR-QLK3-CT-2002-

02140) la care au participat instituții prestigioase de cercetare din Franța, Spania, Germania, Italia, Slovenia și România.

În România, cercetările au fost efectuate la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură din Bistrița, în două loturi experimentale în care exista o mare presiune de infecție cu virusul *Plum pox*, înființate în anii 1996 și 1998 (Zagrai și colab., 2007, 2008b). În perioada 2004-2006, au fost analizate 15 izolate de la clonele de prun transgenic C₂, C₃, C₄, C₆ și PT3, infectate cu PPV în decursul a 8-10 ani de testare în livadă. În aceeași perioadă, au mai fost analizate, în mod similar, 54 de izolate PPV de la prunii convenționali, situați în jurul prunilor transgenici infectați. Analiza de probe de la clona transgenică C5 nu a fost posibilă întrucât aceasta nu s-a infectat în decursul celor 8-10 ani de testare în condițiile unei mari presiuni de infecție naturală cu PPV (Zagrai și colab., 2008c).

Variabilitatea serologică și moleculară a izolatelor de la prunii transgenici și convenționali a fost analizată, comparativ, în vederea evaluării potențialului risc de impact al genei ce codifică proteina capsidei asupra populațiilor PPV. Identificarea și selecția pomilor infectați a fost efectuată, în prealabil, pe baza simptomelor tipice induse de PPV; ulterior, prezența virusului a fost confirmată atât prin diagnostic serologic (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay - DAS-ELISA) (Clark și Adams, 1977) utilizând antiseruri policlonale, cât și prin diagnostic molecular (Immunocapture-Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction - IC-RT-PCR) utilizând amorse polivalente (Wetzel și colab., 1991).

Diferențierea serologică a izolatelor PPV s-a realizat prin intermediul tehnicii imunoenzimatică TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay), folosind antiseruri monoclonale pentru tulpinile virale PPV-D (Dideron sau clorotică) (Cambra și colab., 2004) și PPV-M (Marcus sau necrotică) (Boscica și colab., 1997). Diferențierea moleculară s-a realizat prin IC-RT-PCR, folosind amorse specifice regiunilor genomice (*Cter*)CP (Olmos și colab., 1997), (*C-*

ter)Nib/(N-ter)CP (Subr și colab., 2004) și *CI* (Glasa și colab., 2002) (Figura 7).

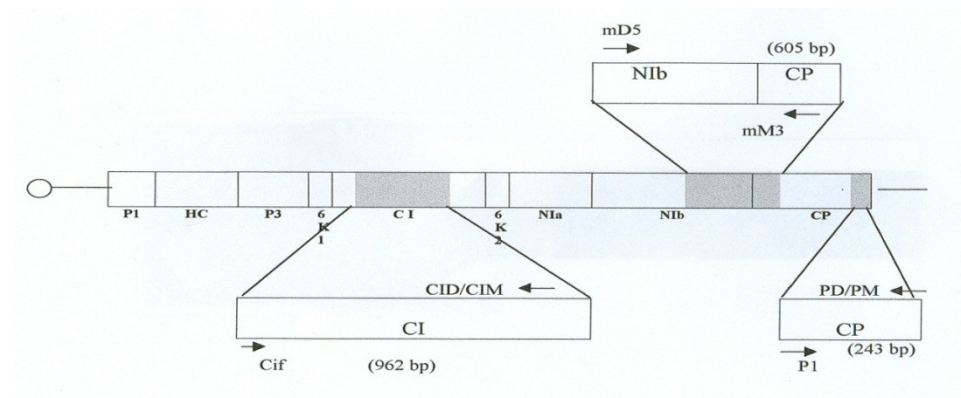


Figura 7. Diferențierea tulpinilor PPV în diferite regiuni genomice

Produșii PCR, corespunzători regiunii (*Cter*)CP, au fost diferențiați prin RFLP (Restriction Fragments Length Polymorfism), folosind enzima de restricție *RsaI*. Caracterizarea moleculară a fost finalizată prin secvențierea a 44 de produși PCR corespunzători regiunii genomice (*Cter*)CP și a șapte produși PCR corespunzători regiunii genomice (*C-ter*)Nib/(*N-ter*)CP. Ulterior, secvențele rezultate au fost înregistrate în GenBank și comparate cu cele disponibile în această bază de date.

Rezultatele diferențierii izolatelor PPV de la prunii transgenici prin TAS-ELISA, utilizând antiseruri monoclonale D și M, și prin IC-RT-PCR, utilizând amorse specifice D și M, au fost identice (Tabelul 4). Toate izolatele au reacționat pozitiv la unul dintre cele două antiseruri monoclonale, precum și la una dintre amorsele specifice tulpinilor D și M. De asemenea, analizele RFLP au diferențiat cele două tulpini pe baza situsului *RsaI* specific sușei clorotice. Astfel, dintre cele 15 izolate care au infectat prunii transgenici, opt au fost identificate ca fiind PPV-D iar șapte ca fiind PPV-M.

Tabelul 4. Diferențierea serologică și moleculară [regiunea (Cter)CP] a izolatelor PPV de la prunii transgenici

Izolatul	DAS / TAS-ELISA				IC-RT-PCR (P1/P2 și P1/PD sau PM)				RFLP <i>RsaI</i>		
	PPV poly	PPV-D	PPV-M	PPV-D+M	PPV poly	PPV-D	PPV-M	PPV-D+M	PPV-D	PPV-M	PPV-D+M
<i>Lotul 1</i>											
C6-2 (3/21)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C6-2 (3/23)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
PT3-2 (3/25)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C6-2 (3/22)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C3-9 (3/6)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
C3-9 (3/8)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
C3-9 (3/9)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
C3-9 (3/10)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C4-6 (3/15)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C2-10 (3/2)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Lotul 2</i>											
PT3-2 (9/11)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-

PT3-2 (9/12)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C4-6 (9/21)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
C6-2 (15/20)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
C2- 10(16/36)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
TOTAL	15	8	7	0	15	8	7	0	8	7	0
%	100	53.3	46.7	0.0	100,0	53.3	46.7	0.0	53.3	46.7	0.0

Similar izolatelor de la prunii transgenici, toate izolatele PPV de la prunii convenționali au reacționat pozitiv la cel puțin unul dintre cele două antiseruri monoclonale, precum și la cel puțin una dintre amorsele specifice tulpinilor D și M. Diferențe foarte mici au apărut între rezultatele analizelor serologice și rezultatele analizelor moleculare la nivelul regiunii (*Cter*)CP (Tabelul 5). Rezultatele analizelor serologice au arătat că din cele 54 de izolate aparținând prunilor convenționali, 28 au fost identificate ca fiind PPV-D, 24 ca fiind PPV-M iar două ca infecții mixte (PPV-D + PPV-M). Rezultatele diferențierii prin IC-RT-PCR la nivelul regiunii (*Cter*)CP au confirmat prezența PPV-D la 28 de izolate, infecțiile singulare cu tulpina PPV-M doar la 23 de izolate, iar infecțiile mixte la 3 izolate. Rezultatele analizelor RFLP au confirmat rezultatele obținute prin IC-RT-PCR. Profilul de restricție rezultat după digestia cu *RsaI* a permis diferențierea celor două grupe majore (D și M) și evidențierea cu ușurință a infecțiilor mixte.

Aceste rezultate au permis însă doar o diferențiere preliminară a celor două tulpini majore (Kerlan și Dunez, 1979).

Tabelul 5. Diferențierea serologică și moleculară [regiunea (Cter)CP] a izolatelor PPV identificate la prunii convenționali situați în jurul prunilor transgenici

Lot	Număr de izolate	DAS / TAS-ELISA test (OD=405nm)				IC-RT-PCR (P1/P2 and P1/PD or PM)				RFLP <i>Rsa</i> I		
		PPV poly	PPV-D	PPV-M	PPV-D +M	PPV poly	PPV-D	PPV-M	PPV-D +M	PPV-D	PPV-M	PPV-D+M
1	37	37	25	11	1	37	24	10	3	24	10	3
2	17	17	3	13	1	17	4	13	0	4	13	0
Total	54	54	28	24	2	54	28	23	3	28	23	3
%	100	100	51.9	44.4	3.7	100	51.9	42.6	5.5	51.9	42.6	5.5

Gruparea filogenetică a izolatelor PPV pe baza secvenței nucleotidelor corespunzătoare regiunii C-terminus a proteinei capsidei virusului *Plum pox* a confirmat diferența majoră dintre cele două tulpini și similaritatea variabilității moleculare la izolatele PPV de la prunul transgenic și de la prunul convențional (Figura 8). În această regiune genomică, nu au fost identificate recombinări, cel mai probabil datorită hipovariabilității existente la acest nivel. Secvențele de PPV-D au fost identice cu secvențele din baza de date GenBank; secvențele de PPV-M au fost similare secvențelor din baza de date GenBank în proporție de 98-99%. Nu au fost identificate mutații la nivelul secvențelor PPV-D. La tulpina PPV-M au fost detectate patru substituții, una în izolatele de la un prun transgenic (clona C4-6) și trei în izolatele de la prunii convenționali [Piteștean (8/9), C. Rodna (15/36), Diana (8/21)].

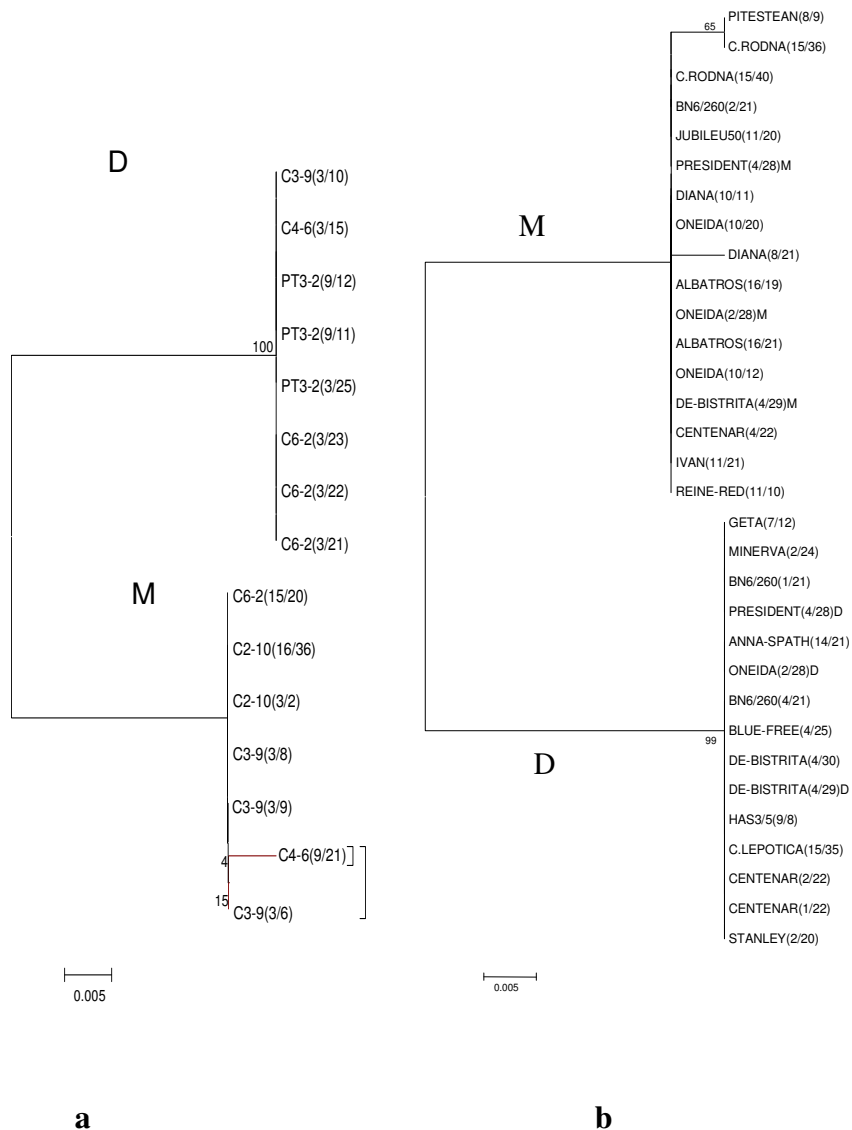


Figura 8. Gruparea filogenetică a izolatelor PPV pe baza secvenței nucleotidelor corespunzătoare regiunii C-terminus a proteinei capsidei; a – prun transgenic; b – prun convențional

Prin utilizarea unei perechi de amorse care detectează direct o tulpină rezultată din recombinarea PPV-M cu PPV-D, denumită PPV-Rec, raportată anterior (Glasa și colab., 2002, 2004), a fost evidențiat faptul că toate izolatele PPV identificate ca fiind tulpina PPV-M în regiunea (*C-ter*) *CP* sunt de fapt PPV-Rec în regiunea (*C-ter*) *Nib/(N-ter)* *CP*. Atât cele provenite de la prunii transgenici (Tabelul 6) cât și cele provenite de la prunii convenționali (Tabelul 7). Nu au fost observate diferențe serologice între PPV-M și PPV-Rec. Prin utilizarea unor amorse specifice pentru diferențierea tulpinilor D și M în regiunea *CI*, au fost detectate numai fragmente aparținând sușei PPV-D, fapt ce a confirmat prezența PPV-Rec. Mai precis, toate izolatele identificate inițial ca fiind PPV-M sunt, de fapt, PPV-Rec.

Tabelul 6. Diferențierea moleculară a izolatelor PPV identificate în prunii transgenici cu amorse pentru diferite regiuni genomice

Numărul lotului	Număr de izolate	Regiunea țintită		
		(<i>C-ter</i>) <i>CP</i>	<i>C-ter (Nib)/(N-ter)</i> <i>CP</i>	<i>CI</i>
1	6	D	-	D
	4	M	REC	D
	0	D+M	REC	D
2	2	D	-	D
	3	M	REC	D
	0	D+M	REC	D
total	8	D	-	D
	7	M	REC	D
	0	D+M	REC	D

Tabelul 7. Diferențierea moleculară a izolatelor PPV identificate în prunii convenționali cu amorse pentru diferite regiuni genomice

Numărul lotului	Număr de izolate	Regiunea țintită		
		<i>(C-ter) CP</i>	<i>C-ter (Nib)/(N-ter) CP</i>	<i>CI</i>
1	24	D	-	D
	10	M	REC	D
	3	D+M	REC	D
2	4	D	-	D
	13	M	REC	D
	0	D+M	REC	D
total	28	D	-	D
	23	M	REC	D
	3	D+M	REC	D

În vederea determinării locului recombinării, suspectat a fi localizat în regiunea *(C-ter)Nib-(N-ter)CP*, au fost secvențializați șapte produși PCR, patru aparținând izolatelor de la prunul transgenic și trei aparținând izolatelor de la prunul convențional (Figura 9). Multiplele aliniamente au indicat faptul că recombinația s-a produs în regiunea *(C-ter)Nib*, la nivelul nucleotidei 8450. Secvențele PPV-Rec de la prunul transgenic au fost similare cu secvențele PPV-Rec de la prunul convențional. Blocul *DAG* (*asp-ala-gly*), considerat esențial pentru transmiterea prin afide a potivirusurilor, a fost prezent în izolatele recombinante fiind plasat în regiunea *(N-ter)CP*. Secvențele izolatelor noastre au avut o similaritate ridicată (98-99%) cu diferite secvențe de PPV-Rec raportate anterior și disponibile în banca de gene (GenBank). Foarte important este faptul că toate recombinantele au același punct de recombinare. Această similaritate genetică sugerează că recombinantele în cauză aparțin unui grup ancestral cu o origine evoluționistă comună, care a fost descris la prunul convențional (Glasa și colab., 2002, 2004 ; Zagrai și colab., 2006, 2010b).

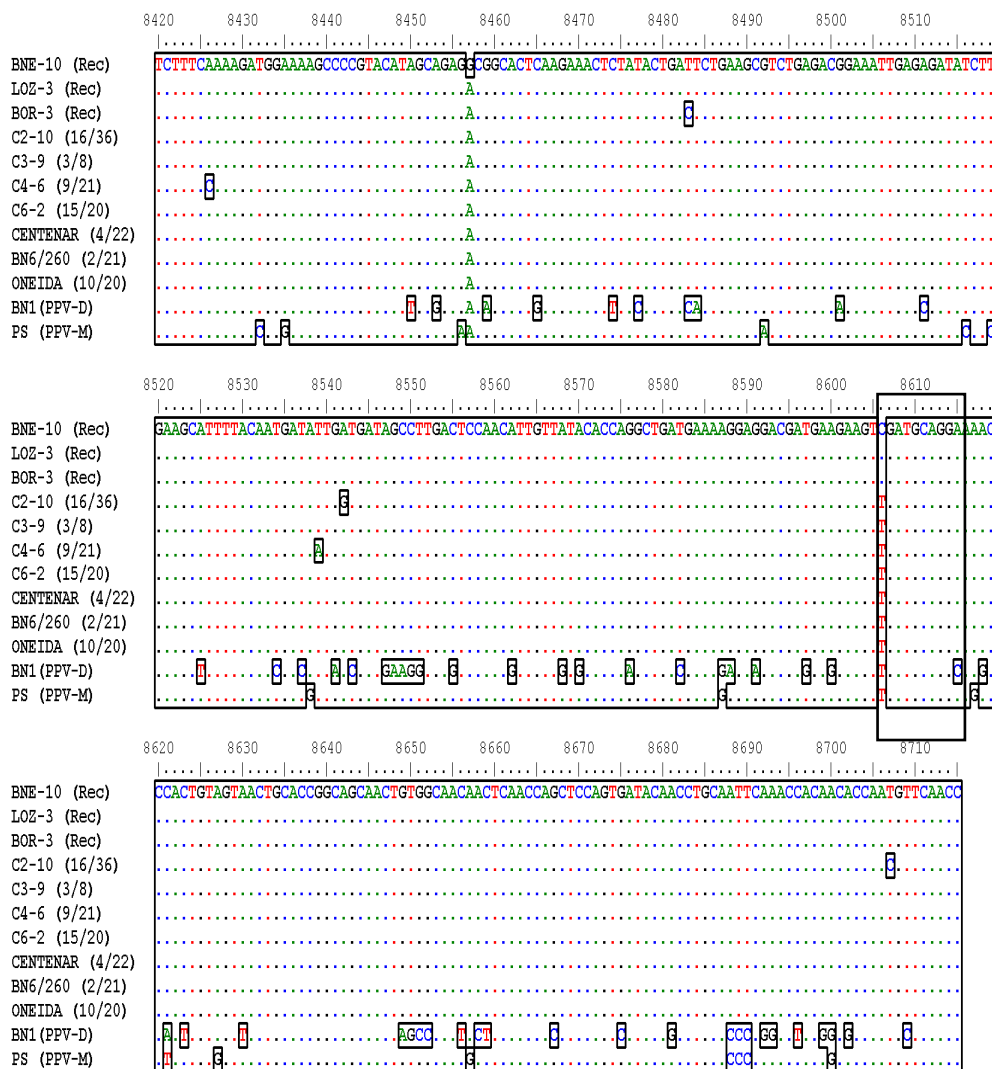


Figura 9. Multiple aliniamente aparținând secvențelor regiunii genomice *Nib/CP* la șapte izolate de PPV-Rec din România [C2-10 (16/36), C3-9 (1/8), C4-6 (9/21), C6-2 (15/20) – prun transgenic; Centenar (4/22), BN 6/260 (2/21), Oneida (10/20) – prun convențional] și trei izolate (BNE-10, LOZ-3, BOR – 3) raportate anterior.

Rezultatele diferențierii și caracterizării serologice și moleculare arată că ratele tulpinilor D și Rec din prunii transgenici au fost asemănătoare cu cele din prunii convenționali (pruni martor, situați în jurul prunilor transgenici). Mai precis, la prunii transgenici s-a înregistrat o rată a PPV-D de 53,3 % și o rată a PPV-Rec de 46,7 %. La prunii convenționali, rata infecțiilor cu PPV-D a fost de 51,9 %, iar rata infecțiilor cu PPV-Rec a fost de 42,6 %. Tot la prunii convenționali s-a înregistrat o rată redusă (5,5 %) a infecțiilor mixte (PPV-D + PPV-Rec) (Figura 10).

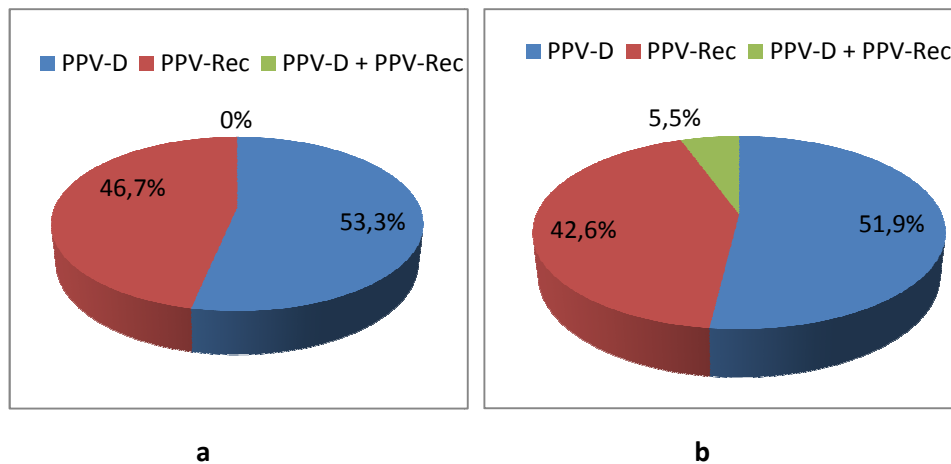


Figura 10. Rata infecției cu PPV-D și PPV-Rec la prunii transgenici (a) cât și la prunii convenționali (b) din jurul prunilor transgenici.

Dacă se ia în considerare însă faptul că prezența celor trei infecții mixte generează câte trei infecții singulare cu PPV-D și PPV-Rec, în cazul prunilor convenționali rezultă rate ale infecțiilor cu PPV-D de 54,4 % și cu PPV-Rec de 45,6 %. Aceasta sporește, desigur, gradul de asemănare al ratei sușelor PPV din prunii transgenici cu rata sușelor din prunii convenționali și sugerează faptul că afidele vectori nu fac diferența între

clonele de prun din câmpul de testare. Diferența dintre acestea a constat în faptul că infecțiile mixte au fost detectate doar la prunii convenționali.

Se poate considera deci, că prunii modificați cu gena de interes *PPV-CP* nu constituie un risc adițional de sporire a diversității populațiilor indigene de PPV. Mai mult, trebuie precizat că în cazul clonei transgenice *C₅*, care nu a suferit o infecție naturală cu PPV, probabilitatea apariției unor tulpini recombinante ale acestui patogen este mult mai mică decât în cazul prunului convențional.

Rezultatele cercetărilor care au urmărit impactul introducerii în mediu asupra biosecurității, efectuate în condiții de câmp, au demonstrat că clona transgenică *C₅* nu afectează diversitatea genetică a populațiilor virale, nu facilitează apariția unor virusuri recombinante și nu afectează populațiile de afide prezente în livezi (Capote și colab., 2008; Zagrai și colab., 2007, 2011, 2018). Concomitent, s-a constatat că rezistența clonei transgenice *C₅* la PPV este stabilă chiar și în prezența altor virusuri (Hily și colab., 2004; Ravelonandro și colab., 20017; Zagrai și colab., 2008b).

3.2. Studiul potențialului impact al transgenelor inserate în prunul transgenic asupra populațiilor indigene de afide

Evaluarea potențialului impact al transgenelor inserate în prunul transgenic HoneySweet asupra organismelor nevizate, în speță populațiile indigene de afide vectoare, s-a concretizat prin studii realizate în două experiențe, în condiții diferite de climă, respectiv în Spania (climă mediteraneeană) (Capote și colab., 2008) și România (climă temperat continentală). Experința din România s-a efectuat în perioada 2016-2018, în cadrul proiectului ADER 4.1.3. /2015, finanțat de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale. Afidele vectori au fost monitorizate în interiorul unui lot experimental cu pruni transgenici și convenționali. Metoda de monitorizare utilizată a fost una recunoscută la nivel internațional, denumită “sticky shoot” (Avinet și colab., 1993; Marroquin și colab., 2004) .

Populațiile indigene de afide vectoare au fost evaluate și monitorizate începând cu decada I a lunii mai și până în decada I a lunii octombrie al fiecărui an, acoperind astfel întreaga perioadă de vegetație. Monitorizarea a vizat atât prunii transgenici, soiul HoneySweet, cât și pe cei convenționali, respectiv soiurile Renclod Althan și Stanley, fiind supuși acestei tehnici pomii din toate blocurile experimentale, prin rotație.

Aplicarea metodei a presupus mai multe etape de lucru (Foto 4). Mai întâi, s-a efectuat pulverizarea a câte trei lăstari de lungime 15-25 cm/variante (soi) cu o substanță adezivă denumită Souverode. Lăstarii au rămas pe pomi cca. 10 zile, după care a urmat prelevarea lor. Alți lăstari au fost imediat tratați și marcați în același mod pentru noi capturi de afide. Lăstarii prelevați au fost transferați în laborator, tăiați în 2-3 bucăți, apoi introduși în borcane peste care s-a adăugat solvent, astfel încât să fie complet acoperiți de acesta. După extragerea lăstarilor din borcane, conținutul s-a strecurat printr-o sită de plastic, verificând prezența insectelor atât pe sită, cât și eventualele rămășițe pe frunze.



Foto 4. Metoda “sticky shoot” pentru monitorizarea afidelor vectoare.

Fiecare probă de insecte colectată în sita de plastic a fost supusă la 2-3 spălări cu apă și detergent de vase, folosind o pensulă moale. Insectele astfel spălate pe sita de plastic au fost introduse cu grijă, cu ajutorul unei pensule, în tuburi de plastic cu conținut de alcool etilic 70%. A urmat separarea afidelor de restul insectelor și transferarea lor în tuburi Eppendorf, în alcool etilic 70%, fiecare tub având toate datele de

identificare necesare. Ulterior, s-au efectuat determinările numerice (număr afide vectori) și identificarea speciilor care au populat prunii transgenic și convențional.

Prelucrarea datelor a permis totodată și stabilirea momentului de zbor maxim al afidelor, ceea ce constituie un indicator important pentru stabilirea momentelor optime pentru efectuarea tratamentelor fitosanitare. În baza datelor cumulative pe cei trei ani de studiu s-a evaluat potențialul impact sau efectul neutral al transgenelor asupra afidelor virulifere.

Rezultatele prezentate în tabelul 8 arată prezența anuală a afidelor în lotul experimental începând cu prima decadă a lunii mai și până la sfârșitul lunii iulie, apoi o întrerupere totală a zborului pe parcursul lunii august, urmată de un al doilea val de zbor, mult mai mic însă, pe parcursul lunii septembrie. Numărul de afide colectate în cei trei ani de studiu relevă o similaritate în anii 2016 și 2017, în timp ce în 2018 s-a înregistrat o ușoară creștere față de anii precedenți.

În anul **2016** s-a putut constata o diversitate a situațiilor privind prezența afidelor aripate la cele trei soiuri de prun. Mai precis, nu a existat o regulă în care numărul afidelor colectate să fie în favoarea sau defavoarea unuia sau altuia dintre cele trei soiuri. Dacă ne referim la numărul total de afide colectate pe întreaga perioadă de vegetație a anului 2016, se constată o similaritate a acestora la soiurile HoneySweet și Stanley, și un număr ușor mai mare de capturi la soiul Renclod Althan.

Din analiza afidelor colectate pe parcursul perioadei de vegetație a anului **2017**, se constată că, nici în acest an, nu a existat o regulă în care numărul afidelor colectate să fie în favoarea sau defavoarea unuia sau altuia dintre cele trei soiuri. Asemănător anului 2016, curba de zbor a atins un maxim la mijlocul lunii iunie, la toate cele trei soiuri luate în studiu. Dacă analizăm numărul total de afide colectate pe întreaga perioadă de vegetație, se constată o similaritate a acestora la toate cele trei soiuri luate în studiu.

În anul **2018**, puțin diferită față de anii trecuți, curba de zbor a afidelor a înregistrat o creștere accentuată spre sfârșitul lunii mai - începutul lunii iunie, după care s-a înregistrat o ușoară descreștere la mijlocul lunii iunie, urmată de un maxim de zbor la începutul lunii iulie. Ulterior, curba de zbor a avut o evoluție descrescătoare până la începutul lunii august când, practic, zborul afidelor a încetat. Populațiile de afide au înregistrat un al doilea zbor în toamnă, însă mult mai redus decât cel din iunie.

Analizând numărul total de afide colectate pe întreaga perioadă de studiu, pe soiuri, se constată o similaritate la soiurile HoneySweet și Renclod Althan, și un număr ușor mai mare de capturi la soiul Stanley. În ceea ce privește numărul de afide colectate pe parcursul lunii iunie, din perioada de studiu (2016-2018), când s-au înregistrat majoritatea capturilor, se constată o similaritate la toate cele trei soiuri studiate: HoneySweet, Renclod Althan și Stanley.

Tabelul 8. Numărul total de afide colectate de pe ramurile de control la cele trei soiuri din lotul experimental, în perioada 2016-2018

Decada / luna prelevare lăstari marcați	Honey Sweet			Total	Renclod Althan			Total	Stanley			Total
	2016	2017	2018		2016	2017	2018		2016	2017	2018	
I Mai	3	3	0	6	0	6	1	7	0	0	0	0
II Mai	9	3	9	21	12	6	6	24	3	9	9	21
III Mai	15	10	33	58	9	9	15	33	15	6	39	60
I Iun	18	22	33	73	27	17	30	74	24	27	36	87
II Iun	48	44	24	116	48	39	18	105	39	42	28	109
III Iun	33	24	18	75	45	26	30	101	33	27	36	96
I Iul	3	14	39	56	6	10	33	49	9	15	33	57

II Iul	6	13	6	25	3	13	21	37	9	10	9	28
III Iul	0	3	6	9	0	3	3	6	0	3	9	12
I Aug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II Aug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III Aug	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I Sep	2	1	2	5	1	1	2	4	3	1	1	5
II Sep	5	4	5	14	7	3	8	18	4	5	6	15
III Sep	4	2	1	7	4	3	3	10	4	3	2	9
I Oct	1	1	0	2	0	2	1	3	2	1	0	3
Total	147	144	176	467	162	138	171	471	145	149	208	502

Din analiza simultană a curbelor de zbor rezultate prin transpunerea grafică a datelor privind numărul de afide capturate pe parcursul celor trei perioade de studiu (Figura 11), se poate constata că, în anii 2016 și 2017, curba de zbor a atins un maxim la mijlocul lunii iunie, la toate cele trei soiuri luate în studiu. Ulterior, curba de zbor a avut o evoluție descrescătoare până la începutul lunii august când, practic, zborul afidelor a încetat. În schimb, în anul 2018, curba de zbor a afidelor a înregistrat o creștere accentuată spre sfârșitul lunii mai - începutul lunii iunie, după care s-a înregistrat o ușoară descreștere la mijlocul luni iunie, urmată de un maxim de zbor la începutul lunii iulie. Ulterior, curba de zbor a avut o evoluție descrescătoare până la începutul lunii august când, practic, zborul afidelor a încetat. Pe parcursul întregii perioade de studiu (2016-2018), populațiile de afide au înregistrat un al doilea zbor în toamnă, însă mult mai redus decât cel din iunie.

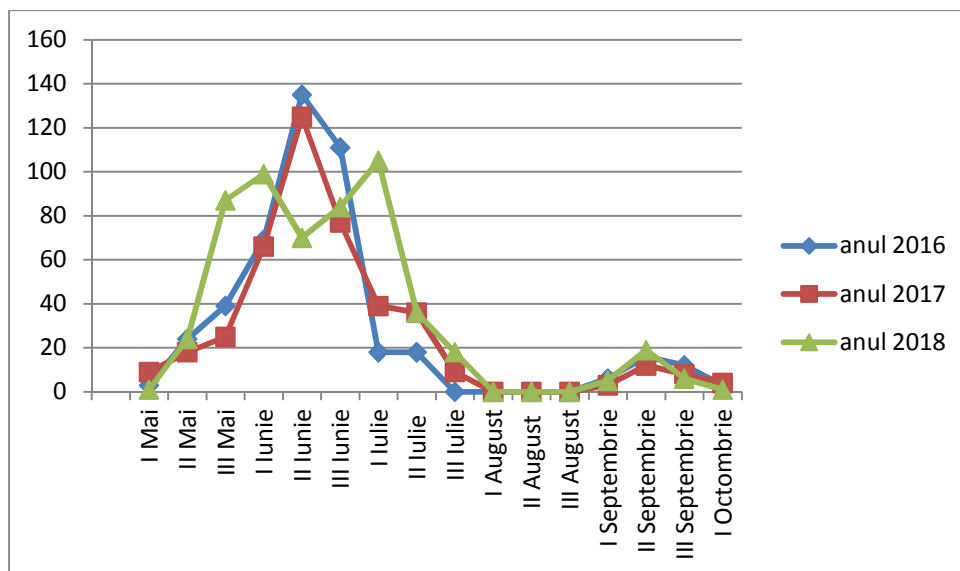


Figura 11. Curbele de zbor ale afidelor vectoare capturate în perioada 2016-2018 în lotul experimental cu prun transgenic și conventional de la SCDP Bistrița

Evidențierea grafică a numărului de afide vectoare capturate, în perioada 2016-2018, relevă o variabilitate redusă a prezenței acestora la prunii transgenici și cei convenționali. Astfel, pentru fiecare dintre cele trei soiuri există atât situații în care numărul de afide colectate este sensibil mai mare decât la celelalte două soiuri, cât și situații în care numărul de afide este sensibil mai mic sau intermediar. În ansamblu, nu există diferențe semnificative între curbele de zbor ale afidelor (Figura 12) în funcție de soi ci, dimpotivă, acestea aproape că se suprapun.

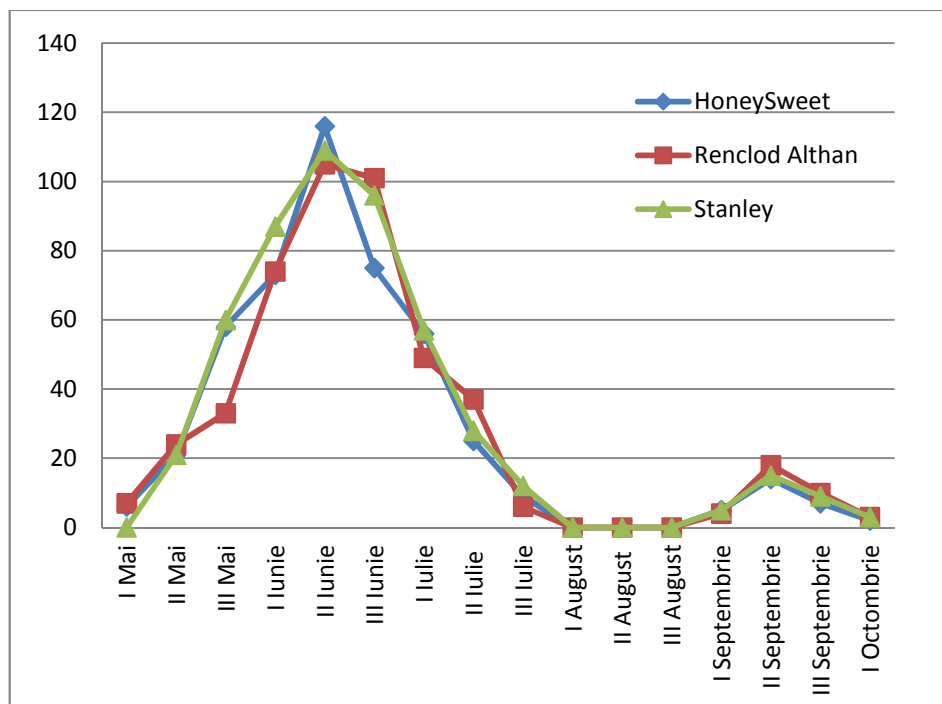


Figura 12. Numărul total de afide colectate de pe ramurile de control, în perioada 2016-2018, din lotul experimental cu prun transgenic și conventional de la SCDP Bistrița

Rezultatele prezentate grafic în figura 13 relevă o prevalență a afidelor în lotul de pruni convenționali și transgenici, aparținând genului *Aphis*, urmate de specia *Hyalopterus pruni*. Alte specii de afide întâlnite aparțin genurilor *Anoecia*, *Rhopalosiphum*, *Brachycaudus*, *Myzus*, precum și specia *Phorodon humuli*.

Similaritatea numărului de afide capturate la prunul transgenic HoneySweet și la cele două soiuri de prun convențional, în special la soiul Renclod Althan, asociată cu suprapunerea curbelor de zbor relevă faptul că nu există o preferință a afidelor pentru un anumit soi de prun, indiferent dacă este transgenic sau convențional. Mai mult, se constată că, în general,

se menține chiar și raportul între specii, afidele neavând preferințe speciale pentru unul sau altul dintre soiuri.

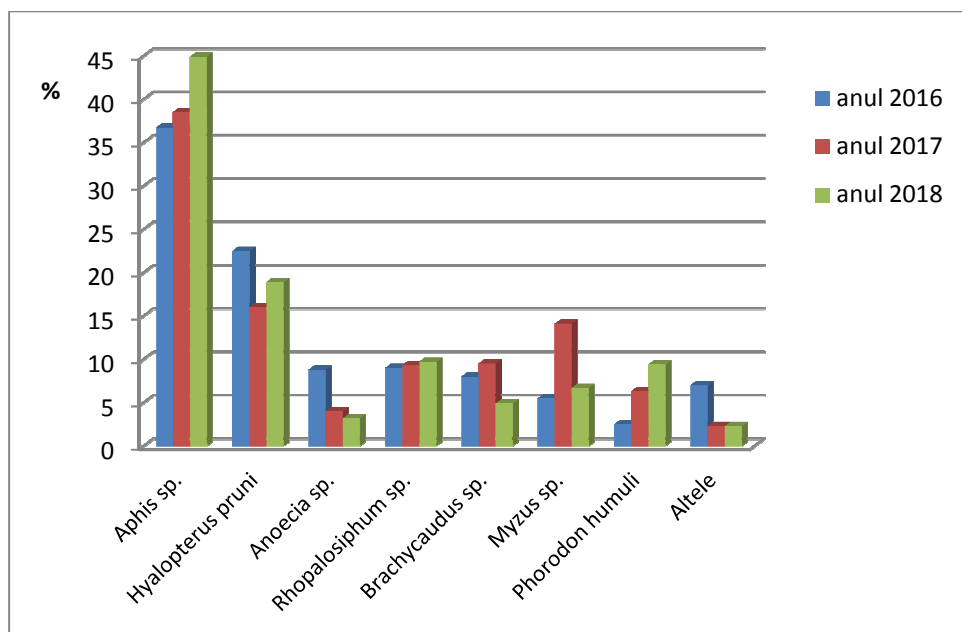


Figura 13. Speciile de afide prezente în lotul experimental de pruni transgenic și convenționali, în perioada 2016-2018

Rezultate științifice similare au fost obținute în Spania. Acestea evidențiază efectul neutral al prunului transgenic asupra organismelor non-țintă. Nu a fost înregistrată nicio diferență asigurată statistic referitoare la speciile de afide, numărul acestora (incluzând vectori viruliferi individuali), precum și alte artropode care au populat prunii transgenici și convenționali în lotul experimental din Spania (Capote și colab., 2008).

3.3. Evaluarea preferinței albinelor pentru prunii transgenici și convenționali

Unele plante modificate genetic conțin gene responsabile de sinteza unor proteine care conferă rezistență la unii dăunători. Prezența acestor gene a provocat numeroase controverse referitoare la specificitatea lor și potențialul impact negativ asupra organismelor nevizate. Dintre acestea, un loc aparte îl reprezintă potențialul impact asupra albinelor, cele mai importante insecte polenizatoare care trăiesc în interdependență cu plantele, cu implicații benefice pentru ambele părți.

La speciile pomice, albinele au un rol esențial în procesul polenizării. Deși insertul prunului transgenic HoneySweet nu conține gene cu efect insecticid, se pune totuși întrebarea dacă există diferențe de preferință ale albinelor între acesta și prunii convenționali. De aceea, evaluarea potențialului impact al transgenelor inserate în prunul HoneySweet asupra organismelor nevizate a fost extinsă și la obținerea de date referitoare la eventuala preferință a albinelor între prunii convenționali și cei transgenici pe durata înfloritului. Monitorizarea albinelor s-a efectuat în trei ani consecutivi (2016, 2017 și 2018), pe durata a trei zile/an, în anumite intervale orare, într-un lot experimental cu pruni transgenici (soiul HoneySweet) și pruni convenționali (soiurile Renclod Althan și Stanley), amplasat în perimetrul Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița. Pentru determinări s-a folosit o metodologie care presupune vizualizarea pe ramuri de control, la anumite momente din timpul înfloritului, a prezenței albinelor, atât la prunii convenționali, cât și la cei transgenici aflați în același lot experimental.

Întrucât datele de debut și sfârșit de înflorit, respectiv durata înfloritului nu au coincis la cele trei soiuri (transgenic - HoneySweet, conventional - Stanley, Renclod Althan), observațiile s-au efectuat doar pe perioada când a existat o suprapunere totală a înfloritului la cele trei genotipuri. Aceasta deoarece observațiile din afara perioadei de suprapunere

a înfloriturii ar fi însemnat înregistrarea unor date eronate, întrucât factorii climatici care influențează decisiv zborul albinelor sunt diferiți de la o zi la alta și chiar pe durata aceleiași zile.

Prezența albinelor a fost notată pe ramuri de control, aproximativ de aceeași mărime, la câte un singur pom din cele trei soiuri. În fiecare dintre cele trei zile, monitorizarea s-a efectuat pe pomi din blocuri diferite ale lotului experimental. Au fost alese pentru monitorizare două intervale orare, un prim interval între orele 10.00 – 11.00, iar un al doilea interval între orele 13.00 – 14.00. Procedura a constat în poziționarea a trei persoane în proximitatea pomilor și notarea prezenței albinelor pe ramurile de control la fiecare 5 minute. Astfel, pe durata unui interval de o oră, s-au efectuat 13 notări la fiecare soi, respectiv 26 de notări pe cele două intervale orare / soi, în fiecare zi de monitorizare.

Observațiile fenologice efectuate în lotul experimental, referitoare la începutul și sfârșitul înfloriturii, în perioada 2016-2018, sunt prezentate în tabelul 9.

Tabelul 9. Observații fenologice privind perioada înfloriturii la prunul transgenic și convențional din lotul experimental de la SCDP Bistrița 2016-2018

Soiul	Începutul înfloriturii			Sfârșitul înfloriturii			Durata înfloriturii		
	2016	2017	2018	2016	2017	2018	2016	2017	2018
HoneySweet	5 aprilie	4 aprilie	12 aprilie	16 aprilie	25 aprilie	23 aprilie	12 zile	21 zile	11 zile
Renclod Althan	7 aprilie	5 aprilie	13 aprilie	14 aprilie	15 aprilie	20 aprilie	8 zile	10 zile	7 zile
Stanley	7 aprilie	8 aprilie	14 aprilie	15 aprilie	26 aprilie	23 aprilie	9 zile	18 zile	9 zile

Se observă că, **în anul 2016**, soiul HoneySweet a înflorit cel mai devreme, fenofaza de început a înfloriturii fiind notată în data de 5 aprilie. La soiurile Renclo Althan și Stanley înfloriturii a debutat în data de 7 aprilie, la două zile după soiul HoneySweet. Tot la această dată a avut loc și debutul înfloririi deplină la soiul HoneySweet, iar la o zi diferență, înflorirea deplină s-a înregistrat și la soiurile Renclo Althan și Stanley. În condițiile climatice ale anului 2016 a existat, deci, un ușor decalaj al fenofazei de început al înfloririi între prunul transgenic și cel convențional. Se poate observa că și sfârșitul înfloriturii aproape a coincis la soiurile Renclo Althan și Stanley, diferența fiind de doar o zi.

Deși s-a înregistrat un decalaj de început al înfloriturii între prunul transgenic HoneySweet și soiurile de prun convențional Renclo Althan și Stanley, a existat o perioadă de suprapunere a înfloriturii care a permis colectarea de date referitoare la prezența albinelor la cele trei soiuri. Interesant este faptul că, deși începutul înfloriturii a fost înregistrat cel mai devreme la soiul HoneySweet, sfârșitul înfloriturii a fost notat cel mai târziu tot la prunul transgenic. Durata înfloriturii în anul 2016 a fost mai lungă la prunul transgenic, respectiv de 12 zile, în timp ce, la soiurile Renclo Althan și Stanley a fost de doar 7, respectiv 8 zile.

În anul 2017 a existat, de asemenea, un decalaj al începutului și sfârșitului înfloriturii între cele trei soiuri. Se observă că soiul HoneySweet a înflorit cel mai devreme, fenofaza de început a înfloriturii fiind notată în data de 4 aprilie. La soiul Renclo Althan înfloriturii a debutat în data de 5 aprilie, la doar o zi după soiul HoneySweet, iar la soiul Stanley în 8 aprilie, la 4 zile după HoneySweet și trei zile după Renclo Althan. Sfârșitul înfloriturii s-a instalat cel mai devreme la soiul Renclo Althan, la data de 15 aprilie, apoi la soiul HoneySweet, la 25 aprilie, iar la Stanley, la 26 aprilie. Deși durata fenofazei înfloriturii a fost cuprinsă între 10 zile (Renclo Althan) și 21 zile (HoneySweet), condițiile climatice extrem de nefavorabile au limitat foarte mult perioada de zbor a albinelor. Durata suprapunerii înfloririi la cele trei soiuri a fost de o săptămână, iar timp de

trei zile, cât s-a suprapus înflorirea deplină (Foto 5) și a existat zbor al albinelor, au fost efectuate observații privind zborul acestora.



Foto 5. Momentul de suprapunere a înfloriturii la toate cele trei soiuri de prun (2017)

În **anul 2018** a existat, de asemenea, un decalaj al începutului și sfârșitului înfloriturii între cele trei soiuri. Se observă că soiul HoneySweet a înflorit primul, fenofaza de început a înfloriturii fiind notată la data de 12 aprilie. La soiul Renclo Althan, înfloritura a debutat în data de 13 aprilie, la doar o zi după soiul HoneySweet, iar la soiul Stanley în 14 aprilie, la două zile după HoneySweet și o zi după Renclo Althan. Sfârșitul înfloriturii s-a instalat cel mai devreme la soiul Renclo Althan, la data de 20 aprilie și a coincis la soiurile HoneySweet și Stanley, această fenofază fiind notată la 23 aprilie 2018. Durata fenofazei înfloriturii a fost cuprinsă între 7 zile (Renclo Althan) și 11 zile (HoneySweet).

Sinteza privind prezența albinelor la prunii convenționali și transgenici pe ramurile de control, în perioada 2016-2018, pe durata înfloririi depline, este prezentată în tabelul 10.

Rezultatele anului 2016 arată că în zilele de 8, 9 și 10 aprilie, indiferent de ziua și intervalul orar în care au fost efectuate observațiile, nu există situații în care prezența albinelor să nu fi fost semnalată. Referitor la cele trei zile de monitorizare ale albinelor, se observă că numărul acestora a fost, în toate situațiile, mai ridicat în intervalul orar 13.00 -14.00. Astfel, la soiul HoneySweet, în intervalul orar 13.00-14.00 s-a înregistrat prezența unui număr de 51 de albine, în timp ce în intervalul orar 10.00-11.00 numărul acestora a fost mult mai redus, respectiv 29 de albine. De asemenea, o situație similară s-a înregistrat la soiul Stanley, la care au fost notate 53 de albine pe ramurile de control în intervalul orar 13.00-14.00 și doar 31 de albine în intervalul orar 10.00 -11.00. La soiul Renclod Althan, diferența a fost mult mai redusă, numărul albinelor fiind de 28 în intervalul orar 10.00 -11.00, față de 36 în intervalul orar 13.00 -14.00.

În anul 2017, monitorizarea zborului albinelor pe ramurile de control s-a efectuat în perioada 10-12 aprilie. Se observă că numărul albinelor a fost mai ridicat în intervalul orar 10.00 – 11.00 la soiurile HoneySweet și Renclod Althan, însă nu și la soiul Stanley. Astfel, la soiul HoneySweet, în intervalul orar 10.00-11.00 s-a înregistrat prezența unui număr de 174 de albine, în timp ce, în intervalul orar 13.00 -14.00 numărul acestora a fost mult mai redus, respectiv 133 de albine. De asemenea, o situație similară s-a înregistrat la soiul Renclod Althan, la care au fost notate 175 de albine pe ramurile de control în intervalul orar 10.00-11.00 și doar 147 de albine în intervalul orar 13.00 -14.00. Situația se inversează la soiul Stanley, numărul albinelor fiind mai mare în intervalul orar 13.00 - 14.00 (163 albine) decât în intervalul orar 10.00-11.00 (134 albine).

În anul 2018, durata suprapunerii înfloririi la cele trei soiuri a fost de șase zile, iar timp de trei zile (16, 17 și 19 aprilie), au fost efectuate observații privind zborul albinelor pe intervale orare menționate.

Rezultatele arată că numărul albinelor a fost sensibil mai ridicat în intervalul orar 13.00 – 14.00 la toate cele trei soiuri. Astfel, la soiul HoneySweet, în intervalul orar 13.00 -14.00 s-a înregistrat prezența unui număr de 60 de albine, în timp ce, în intervalul orar 10.00-11.00 numărul acestora a fost de 57 de albine. De asemenea, o situație similară s-a înregistrat la soiul Renclod Althan, la care au fost notate 53 de albine pe ramurile de control în intervalul orar 13.00 -14.00 și 50 de albine în intervalul orar 10.00-11.00. La soiul Stanley, numărul albinelor în intervalul orar 13.00 -14.00 a fost de 100, aproape identic cu cel înregistrat în intervalul orar 10.00 -11.00 (99 albine).

Tabelul 10. Sintează privind prezența albinelor la prunii convenționali și transgenici (2016-2018)

Soiul	Data	Interval orar	Nr albine / ramura de control	Interval orar	Nr albine /ramura de control	Total
2016						
HoneySweet	8 aprilie	10.00-11.00	6	13.00-14.00	9	15
	9 aprilie		12		25	37
	10 aprilie		11		17	28
	Total HoneySweet		29		51	80
Renclod Althan	8 aprilie	10.00-11.00	3	13.00-14.00	3	6
	9 aprilie		8		23	31
	10 aprilie		17		10	27
	Total Renclod Althan		28		36	64
Stanley	8 aprilie	10.00-11.00	7	13.00-14.00	9	16
	9 aprilie		12		27	39
	10 aprilie		12		17	29
	Total Stanley		31		53	84
TOTAL 2016			88		140	228
2017						
HoneySweet	10 aprilie	10.00-11.00	28	13.00-14.00	36	64
	11 aprilie		106		53	159
	12 aprilie		40		44	84
	Total HoneySweet		174		133	307
Renclod Althan	10 aprilie	10.00-11.00	32	13.00-14.00	40	72
	11 aprilie		115		56	171

	12 aprilie		28		51	79
Total Renclod Althan			175		147	322
Stanley	10 aprilie	10.00-	25	13.00-	37	62
	11 aprilie	11.00	72	14.00	45	117
	12 aprilie		37		81	118
Total Stanley			134		163	297
TOTAL 2017			483		443	926
2018						
HoneySweet	16 aprilie	10.00-	20	13.00-	22	42
	17 aprilie	11.00	21	14.00	20	41
	19 aprilie		16		18	34
Total HoneySweet			57		60	117
Renclod Althan	16 aprilie	10.00-	17	13.00-	22	39
	17 aprilie	11.00	18	14.00	16	34
	19 aprilie		15		15	30
Total Renclod Althan			50		53	103
Stanley	16 aprilie	10.00-	29	13.00-	33	62
	17 aprilie	11.00	39	14.00	31	70
	19 aprilie		31		36	67
Total Stanley			99		100	199
TOTAL 2018			206		213	419

Rezultatele cumulative ale celor trei ani sunt prezentate grafic în figura 14. Se observă că în anul 2016 a existat 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. Astfel, în anul 2016 a existat o situație interesantă privind prezența albinelor la cele trei soiuri de prun, în sensul diferenței înregistrate între cele două soiuri convenționale (Renclod Althan și Stanley), pe de o parte și între un soi convențional și unul transgenic, pe de alta parte.

Rezultatele anului 2017 au arătat o mare similaritate a numărului total de albine prezente la prunul transgenic HoneySweet (307 albine) și la cele două soiuri de prun convențional (Renclod Althan - 322 albine, Stanley – 297 albine).

Rezultatele din anul 2018 au relevat o mare similaritate a numărului total de albine prezente la prunul transgenic HoneySweet (117 albine) și la soiul de prun convențional Renclod Althan (103 albine). La soiul Stanley, prezența albinelor a fost mult mai numeroasă, numărul acestora pe ramurile de control fiind aproape dublu comparativ cu celelalte două soiuri.

Rezultatele privite în ansamblu relevă, pe de o parte, că nu există vreun indiciu care să susțină ipoteza unei preferințe a albinelor pentru unul dintre cele două categorii de prun, respectiv convențional sau transgenic. Pe de altă parte, numărul total al albinelor de pe ramurile de control în perioada 2016-2018, relevă o mare similaritate a prezenței acestora la prunul transgenic HoneySweet și la soiul de prun convențional Renclod Althan, și o diferență apreciabilă între acestea și soiul Stanley. Această diferență poate fi însă explicată prin înflorirea abundentă și numărul de flori mai mare la soiul Stanley în anul 2018, care au atras mai multe albine. Această înflorire a fost determinată de numărul mai mare de muguri floriferi diferențiați la soiul Stanley pe fondul producției extrem de redusă din anul 2017.

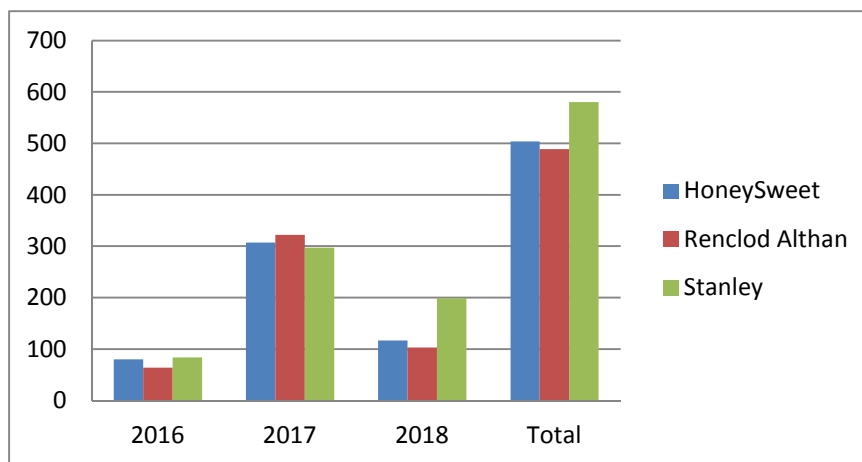


Figura 14. Numărul de albine/ramura de control în perioada de înflorire (2016-2018) la prunul transgenic HoneySweet și la două soiuri de prun convențional (Stanley și Renclod Althan)

CAP. IV. POTENȚIALUL PRODUCTIV ȘI CALITATIV AL PRUNULUI TRANSGENIC ȘI POSIBILITĂȚILE DE REDUCERE A TRATAMENTELOR PENTRU COMBATEREA AFIDELOR

În vederea stabilirii potențialului productiv și calitativ al prunului transgenic HoneySweet, în condițiile asigurării unor surse de infecții naturale cu PPV și aplicării unui număr redus de tratamente cu insecticide, au fost efectuate determinări în perioada 2016-2018, într-un lot experimental din perimetrul SCDP Bistrița, utilizându-se ca variante de referință două soiuri convenționale (Renclod Althan și Stanley) răspândite în cultura prunului din țara noastră. 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* (Figura 15). Lotul experimental 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).

Lucrările de întreținere ale parcelei experimentale au fost, în general, similare celor practicate în livezile de prun convențional. Singura deosebire a constat în aplicarea unui număr redus de tratamente fitosanitare pentru combateră afidelor. Mai precis, doar trei (2016), respectiv patru (2017, 2018) tratamente cu insecticide au fost aplicate în perioadele de vegetație, față de 7-8 tratamente efectuate în culturile de prun convențional. În acest context, cercetările au fost extinse și la evaluarea posibilității de reducere a numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii afidelor vectori în livezile de prun transgenic.

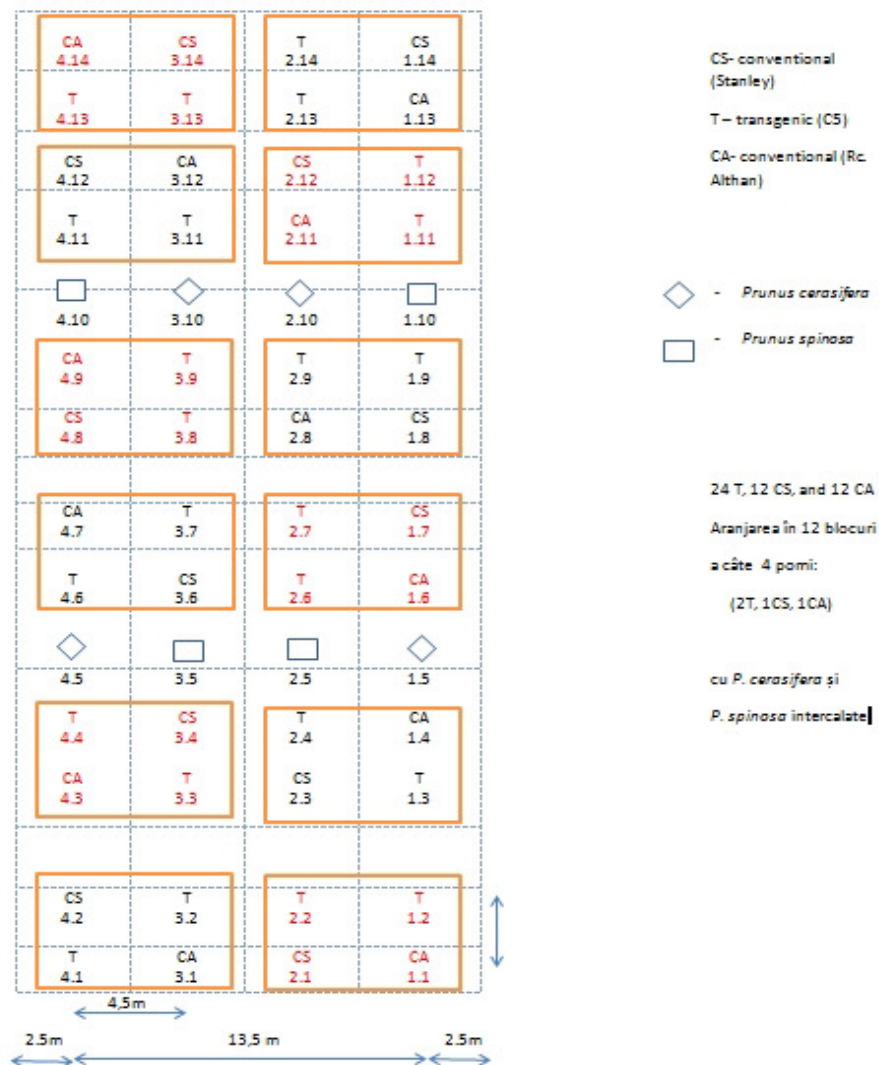


Figura 15. Schița lotului experimental înființat în primăvara anului 2013 la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița

4.1. Evaluarea potențialului productiv al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor

Determinarea producției s-a realizat conform metotologiei pentru studiul soiurilor în culturi comparative. Astfel, producția s-a determinat prin cântărire, pe pomi și repetiții, apoi s-a raportat la unitatea de suprafață.

Maturitatea de recoltare a fructelor la cele trei soiuri din lotul experimental a fost diferită. Astfel, în condițiile anului 2016, maturitatea de recoltare la soiul Renclod Althan a fost înregistrată în data de 11 august. A urmat prunul transgenic HoneySweet, la care maturitatea de recoltare a fost notată la 5 zile după soiul Renclod Althan, respectiv în data de 16 august. La soiul Stanley, maturitatea de recoltare a fost înregistrată în data de 29 august.

În condițiile anului 2017, maturitatea de recoltare la soiul Renclod Althan a fost înregistrată în data de 14 august. Ca și în anul precedent, a urmat prunul transgenic HoneySweet, la care maturitatea de recoltare a fost notată la 3 zile după soiul Renclod Althan, respectiv în data de 17 august. La soiul Stanley, maturitatea de recoltare a fost înregistrată în data de 1 septembrie.

În condițiile anului 2018, maturitatea de recoltare la soiul Renclod Althan a fost înregistrată în data de 6 august, iar la diferență de o zi a urmat prunul transgenic HoneySweet. La soiul Stanley maturitatea de recoltare a fost înregistrată în data de 27 septembrie.

Datele din tabelul 11 arată că, producțiile cumulate, înregistrate în perioada 2016-2018 au prezentat oscilații mai mari sau mai mici între cele trei soiuri de prun. Astfel, la soiul HoneySweet producția de fructe înregistrată (raportată la hectar) în cele 12 blocuri a fost cuprinsă între 37,6 și 52,2 t/ha, la soiul Stanley între 37,4 și 51,1 t/ha, în timp ce soiul Renclod Althan a înregistrat producții cuprinse între 19,3 și 47,4 t/ha. Valorile minime și maxime s-au înregistrat în blocul 4, respectiv în blocul 11 la

prunul transgenic HoneySweet, în blocul 12, respectiv în blocul 4 la soiul Stanley, iar la soiul Renclod Althan în blocul 10, respectiv în blocul 2.

Se constată că soiul de prun transgenic HoneySweet a înregistrat, în general, producții superioare soiului Renclod Althan. Astfel, soiul HoneySweet a înregistrat producții superioare în 10 din cele 12 blocuri, respectiv în blocurile 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 și 12, unde diferențele de producție au oscilat între 2,5 – 30,1 t/ha, respectiv între 6,4 – 57,7 %, în favoarea prunului transgenic. Comparativ cu soiul Stanley, situația este diferită. Astfel, în șapte din blocuri (blocurile 2, 3, 7, 8, 10, 11 și 12) soiul de prun transgenic a înregistrat producții mai mari decât soiul Stanley, diferențele fiind cuprinse între 1,8 – 7,9 t/ha, respectiv între 4,6 – 15,1 %, în favoarea prunului transgenic. Situația se inversează în blocurile 1, 4, 5, 6 și 9, unde producția prunului transgenic HoneySweet a fost inferioară soiului Stanley, diferențele fiind cuprinse între 0,8 – 13,5 t/ha, respectiv între 1,8 – 35,9 %.

Tabelul 11. Producția înregistrată la prunul transgenic HoneySweet și soiurile Renclod Althan și Stanley din lotul experimental de la SCDP Bistrița

-2016-2018-

Nr. bloc	Soi / cod lot	Producția medie (t / ha)			Producția totală (t / ha)	Diferența față de HoneySweet	
		2016	2017	2018		(t/ha)	%
1	Renclod Althan / (CA1.1.)	4,1	4,6	30,0	38,7	-7,5	-16,2
	Stanley / (CS 2.1)	8,5	1,7	37,0	47,2	+1,0	+2,2
	HoneySweet / (T 1.2)						
	Honey Sweet / (T 2.2.)	8,1	6,5	31,6	46,2	-	-
2	Renclod Althan / (CA 1.4)	8,9	3,8	34,7	47,4	+2,4	+5,3
	Stanley / (CS 2.3.)	11,1	1,1	30,6	42,8	-2,2	-4,9
	HoneySweet / (T1.3.)						
	Honey Sweet / T 2.4)	11,1	6,2	27,7	45,0	-	-

3	Renclod Althan / (CA 1.6)	7,0	4,6	24,4	36,0	-11,9	-14,8
	Stanley / (CS 1.7)	9,2	4,6	28,3	42,1	-5,8	-12,1
	Honey Sweet / (T 2.7)						
	Honey Sweet / (T 2.6)	8,7	7,2	32,0	47,9	-	-
4	Renclod Althan / (CA 2.8)	4,4	4,6	31,9	40,9	+3,3	+8,8
	Stanley / (CS1.8)	7,9	4,3	38,9	51,1	+13,5	+35,9
	Honey Sweet / (T 1,9)						
	Honey Sweet / (T2.9)	8,1	4,7	24,8	37,6	-	-
5	Renclod Althan / (CA 2.11)	6,0	3,7	16,4	26,1	-18,9	-42,0
	Stanley / (CS 2.12)	12,0	1,6	33,8	47,4	+2,4	+5,3
	Honey Sweet / (T1.11)						
	Honey Sweet / (T 1.12)	11,7	5,6	27,7	45,0	-	-
6	Renclod Althan / (CA 1.13)	7,9	4,2	27,4	39,5	-5,4	-12,0
	Stanley / (CS 1.14)	11,1	0,6	34,0	45,7	+0,8	+1,8
	Honey Sweet / (T 2.14)						
	Honey Sweet / (T 2.13)	10,3	5,1	29,5	44,9	-	-
7	Renclod Althan / (CA 3.1)	4,4	1,9	22,5	28,8	-13,9	-32,6
	Stanley / (CS 4.2.)	7,9	1,1	31,1	40,1	-2,6	-6,1
	Honey Sweet / (T 3.2)						
	Honey Sweet / (T 4.1)	7,5	5,7	29,5	42,7	-	-
8	Renclod Althan / (CA 4.3)	5,7	4,3	31,3	41,3	-5,7	-12,1
	Stanley / (CS 3.4)	8,9	0,6	35,2	44,7	-2,3	-4,9
	Honey Sweet / (T 3.3)						
	Honey Sweet / (T 4.4)	8,1	7,5	31,4	47,0	-	-
9	Renclod Althan / (CA 4.7)	3,2	2,2	19,2	24,6	-13,7	-35,8
	Stanley / (CS 3.6)	7,6	2,5	34,0	44,1	+5,8	+15,1
	Honey Sweet / (T 3.7)						
	Honey Sweet / (T 4.6)	7,1	5,7	25,5	38,3	-	-
10	Renclod Althan / (CA 4.9)	2,5	1,3	14,5	19,3	-23,5	-54,9
	Stanley / (CS4.8)	6,4	1,1	31,8	39,3	-3,5	-8,2
	Honey Sweet / (T 3.8)						
	Honey Sweet / (T 3. 9)	7,3	5,5	30,0	42,8	-	-
11	Renclod Althan / (CA 3.12)	5,7	2,0	14,4	22,1	-30,1	-57,7
	Stanley / (CS 4.12)	11,1	0,6	32,6	44,3	-7,9	-15,1
	Honey Sweet / (T 3. 11)						
	Honey Sweet / (T 4. 11)	10,6	7,0	34,6	52,2	-	-
12	Renclod Althan / (CA 4.14)	5,4	2,1	29,2	36,7	-2,5	-6,4
	Stanley / (CS 3. 14)	7,3	0,3	29,8	37,4	-1,8	-4,6

	Honey Sweet / (T 3.13)	7,9	5,3	26,0	39,2	-	-
	Honey Sweet / (T 4. 13)						

Densitate 635 pomi / hectar (4.5 x 3.5 m)

Producțiile medii de fructe la cele trei soiuri, realizate în condițiile climatice ale anilor 2016, 2017 și 2018 pe întreg lotul experimental, sunt redate grafic în figura 16. Se constată mai întâi că, în anul 2016, respectiv la trei ani de la înființarea plantației cu pomi CIII, toate cele trei soiuri au realizat producții apreciable. Întrucât livada era foarte tânără, se aștepta ca producțiile celor trei soiuri să crească în anul 2017. Acest lucru nu s-a întâmplat din cauza unui accident climatic, respectiv îngheț, care a survenit în perioada înfloritului și care a afectat producția, însă în mod diferit la cele trei soiuri de prun. În anul 2018 se constată o creștere spectaculoasă a producției la toate cele trei soiuri, în condițiile unui an climatic favorabil culturii prunului.

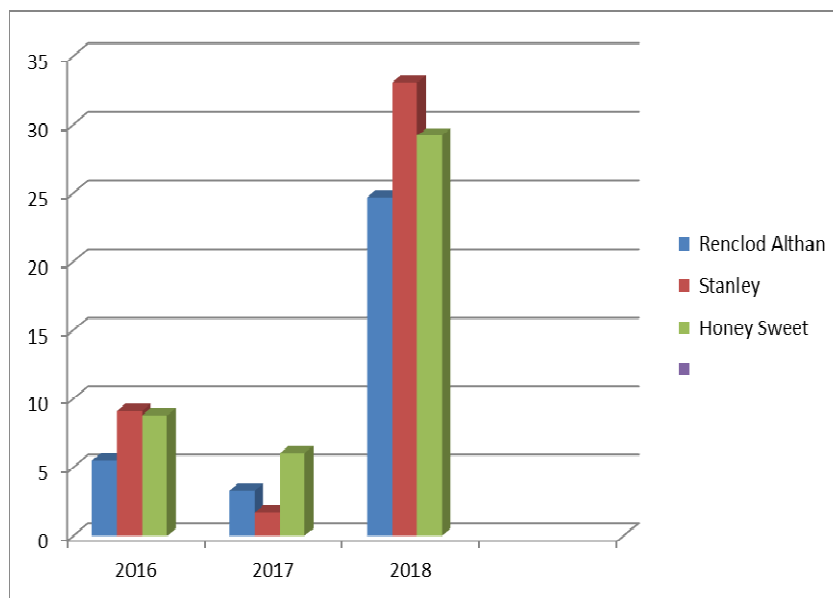


Figura 16. Productia medie de fructe (t/ha) la cele trei soiuri de prun din lotul experimental în perioada 2016-2018

În condițiile climatice ale anului 2016 a existat 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 a soiurilor HoneySweet și la Stanley.

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

Rezultatele de producție obținute în condițiile climatice ale anului 2017 relevă o situație foarte interesantă. Temperaturile negative din timpul înfloritului, care au coborât până la -4 °C, au afectat grav producția la soiul Stanley. Deși soiul Stanley este cunoscut ca fiind foarte productiv și cu producții relativ constante, rezultatele anului 2017 arată că înghețul din perioada de înflorit a afectat grav producția acestui soi. Observațiile efectuate au arătat o brunificare a pistilului (Foto 6) cauzată de îngheț la 23 % din florile soiului Stanley, de 2% la soiul Renclod Althan și doar afecțiuni sporadice la prunul transgenic HoneySweet. De asemenea, timpul rece și înnorat din perioada de înflorit a afectat procesul de polenizare și legare al fructelor la toate cele trei soiuri, cu repercusiuni negative asupra producției anului 2017, aceasta fiind mai redusă decât cea înregistrată în anul precedent.



Foto 6. Aspect cu pistil brunificat la soiul Stanley (2017)

Analiza de ansamblu a afecțiunilor florale, corelată cu producția înregistrată în condițiile climatice ale anului 2017, ne permite să constatăm o sensibilitate mare la îngheț în perioada înfloritului la soiul Stanley și o rezistență ridicată a prunului transgenic HoneySweet. Astfel, soiul HoneySweet se remarcă nu doar prin rezistență la virusul *Plum pox*, ci și prin rezistență la îngheț în timpul înfloritului.

Producțiile medii de fructe la cele trei soiuri, realizate în condițiile climatice ale anului 2018 arată, pe de o parte, o diferență de producție între prunul transgenic HoneySweet și soiul de prun convențional Renclod Althan, în favoarea soiului HoneySweet. Mai precis, producția medie înregistrată la prunul transgenic HoneySweet (29,2 t/ha) a fost cu 4,5 t/ha mai mare față de cea a soiului Renclod Althan (24,7 t/ha). Pe de altă parte, se constată o diferență de producție între prunul transgenic HoneySweet și soiul de prun Stanley, însă de această dată în favoarea celui din urmă. Producția foarte ridicată înregistrată la soiul Stanley în anul 2018 se explică atât prin potențialul mare de producție al acestui soi corelat cu o diferențiere a mugurilor de rod foarte bună în anul precedent, pe fondul unei producții extrem de reduse cauzată de înghețul din primavara anului 2017.

Producția totală cumulată pe perioada de studiu (2016 – 2018), raportată la unitatea de suprafață (t/ha), este reprezentată grafic în figura 17, iar producția medie în figura 18. Se constată că soiul de prun transgenic HoneySweet a realizat o producție similară soiului Stanley, în timp ce soiul Renclod Althan a avut o producție mult inferioară. Prin urmare, soiul de prun transgenic HoneySweet poate fi considerat un soi care se încadrează în grupa soiurilor cu productivitate ridicată. Totuși, trebuie menționat faptul că soiul de prun transgenic HoneySweet a realizat o producție similară soiului Stanley pe durata celor trei ani de studiu, în condițiile în care acesta din urmă a fost puternic afectat de înghețul survenit în perioada înfloritului din anul 2017. De aceea, există probabilitatea ca, în absența afecțiunilor provocate de îngheț, soiul Stanley să fi realizat o producție ușor superioară soiului de prun transgenic HoneySweet. De asemenea, întrucât datele de producție au fost colectate în perioada de tinerețe a pomilor, pot exista modificări ulterioare de poziționare a soiurilor din punct de vedere al productivității. De exemplu, la soiul HoneySweet a fost observată o ușoară degarnisire a pomilor care ar putea afecta producția în anii următori în cazul în care nu se intervine cu măsuri ameliorative (de exemplu tăieri specifice).

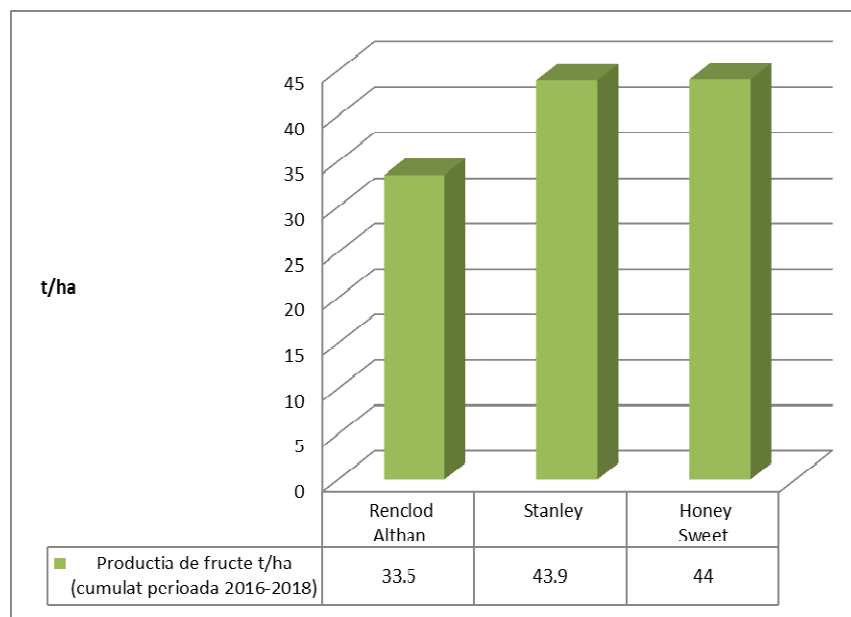


Figura 17. Producția de fructe cumulată (2016-2018) înregistrată la cele trei soiuri din lotul experimental (pomi anul IV-VI de la plantare)

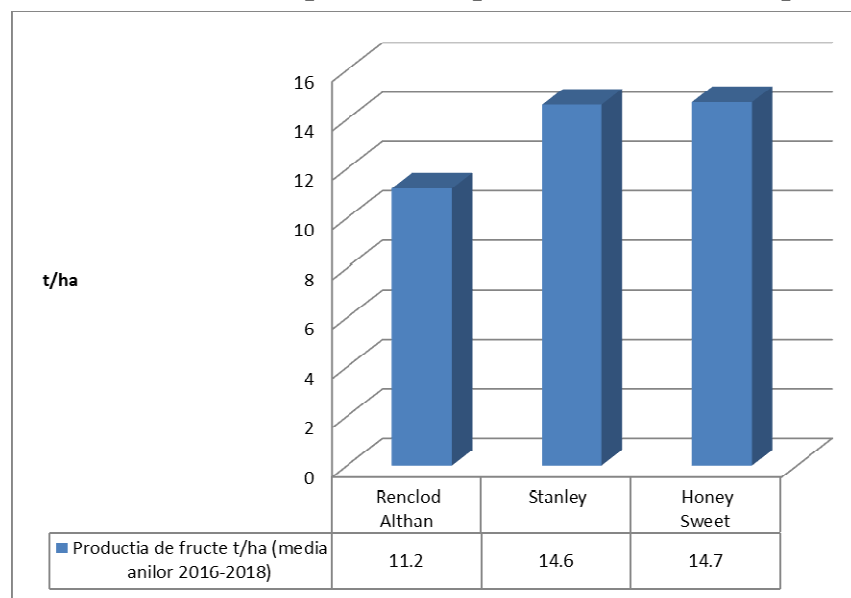


Figura 18. Producția medie de fructe (2016-2018) înregistrată la cele trei soiuri din lotul experimental (pomi anul IV-VI de la plantare)

4.2. Evaluarea potențialului calitativ al prunului transgenic HoneySweet în condițiile reducerii numărului de tratamente fitosanitare necesare combaterii vectorilor

Pentru evaluarea calității fructelor s-au efectuat, mai întâi, determinări privind greutatea fructelor la maturitatea de recoltare și procentul de sâmburi din greutatea fructelor folosind cântarul electronic. Pentru fiecare variantă s-a prelevat câte o probă medie a câte 20 fructe fiecare, provenite din diferite părți ale coronei pomilor. Pentru aprecierea formei și simetriei fructelor s-au efectuat determinări biometrice cu ajutorul sublerului electronic prin măsurarea înălțimii (H), diametrului mare (D) și diametrului mic (d) la câte 20 de fructe din fiecare variantă. De asemenea, uniformitatea, atractivitatea, culoarea fructelor, fermitatea, și culoarea pulpei au fost evaluate comparativ la prunii convenționali și transgenici din lotul experimental.

Aprecierea calității fructelor a fost evaluată și prin analizele biochimice, la maturitatea de consum. Analizele biochimice au fost efectuate la Laboratorul de Controlul Produselor Apicole și Diagnoză Apicolă din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca (Mărghițaș și colab., 2017. Raport de cercetare proiect ADER 413/2015).

Astfel, conținutul de **cenusă** s-a determinat gravimetric, după calcinarea probelor la 550°C; **lipidele** s-au determinat prin extracție cu solvent organic potrivit și cântărirea rezidului după uscare la greutate constantă; **umiditatea** s-a determinat gravimetric prin uscare la etuvă până la greutate constantă a probei de analizat; **aciditatea** s-a determinat prin titrare cu titratorul automat; **glucidele totale și individuale** (glucoza, fructoza, zaharoza, lactoza, maltoza) s-au determinat prin analiză cromatografică; **vitamina C** s-a determinat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță; **mineralele** (calciu, magneziu, sodiu, potasiu, fier) s-au determinat prin spectrometrie de absorbție atomică; **proteinele** totale s-au determinat prin extracție, digestie și titrare Kjeldahl; complexul de **vitamine B** (B1, B2, B3) s-a determinat prin cromatografie de lichide de

înalță performanță cu detecție de masă (LC-MS); **activitatea antioxidantă** și conținutul de **polifenoli** s-au determinat spectrophotometric.

Greutatea medie a fructelor prezentată în tabelul 12 reliefează superioritatea soiului HoneySweet față de soiurile Renclod Althan și Stanley pentru aceasta caracteristică. Astfel, în cei trei ani de experimentare (2016-2018), greutatea medie a fructelor la prunul transgenic HoneySweet, în cele 12 blocuri ale lotului experimental, s-a situat între 62,3g și 68,3g, în timp ce soiurile Renclod Althan și Stanley au realizat fructe cu o greutate medie cuprinsă între 42,4 - 46,9g, respectiv între 37,4 - 40,1g.

Greutatea medie a sâmburilor la soiul Renclod Althan în cele 12 blocuri ale lotului experimental s-a situat între 1,5–1,7g, la soiul Stanley între 2,0–2,3g, iar la soiul de prun transgenic HoneySweet a avut valori cuprinse între 2,3-2,5g. Ponderea sâmburilor în greutatea fructelor a înregistrat valori cuprinse între 5,0-5,7% la soiul Stanley și între 3,5-3,8% la soiul Renclod Althan și la soiul de prun transgenic HoneySweet.

Tabelul 12. Greutatea medie a fructelor și ponderea sâmburilor în greutatea fructelor la prunul transgenic HoneySweet și la soiurile Renclod Althan și Stanley din lotul experimental de la SCDP Bistrița

-2016-2018-

Nr. bloc	Soiul / cod lot	Greutatea medie a fructelor (g)	Greutatea medie a sâmburilor (g)	% sâmburi din greutatea fructului
1	Renclod Althan / (CA1.1.)	44,7	1,7	3,8
	Stanley / (CS 2.1)	39,0	2,0	5,1
	HoneySweet / (T 1.2)	63,2	2,3	3,6
	Honey Sweet / (T 2.2.)			
2	Renclod Althan / (CA 1.4)	44,8	1,6	3,6

	Stanley / (CS 2.3.)	39,1	2,1	5,4
	HoneySweet / (T1.3.)	68,3	2,5	3,7
	Honey Sweet / T 2.4)			
3	Renclod Althan / (CA 1.6)	46,3	1,7	3,7
	Stanley / (CS 1.7)	39,1	2,0	5,1
	Honey Sweet / (T 2.7)	63,6	2,3	3,6
	Honey Sweet / (T 2.6)			
4	Renclod Althan / (CA 2.8)	43,9	1,6	3,6
	Stanley / (CS1.8)	37,6	2,1	5,6
	Honey Sweet / (T 1,9)	68,1	2,5	3,7
	Honey Sweet / (T2.9)			
5	Renclod Althan / (CA 2.11)	42,4	1,5	3,5
	Stanley / (CS 2.12)	37,4	2,1	5,6
	Honey Sweet / (T1.11)	66,2	2,4	3,6
	Honey Sweet / (T 1.12)			
6	Renclod Althan / (CA 1.13)	43,8	1,6	3,7
	Stanley / (CS 1.14)	38,9	2,1	5,4
	Honey Sweet / (T 2.14)	66,5	2,4	3,6
	Honey Sweet / (T 2.13)			
7	Renclod Althan / (CA 3.1)	45,1	1,7	3,8
	Stanley / (CS 4.2.)	40,1	2,1	5,2
	Honey Sweet / (T 3.2)	65,5	2,4	3,7
	Honey Sweet / (T 4.1)			
8	Renclod Althan / (CA 4.3)	45,4	1,7	3,7
	Stanley / (CS 3.4)	38,7	2,1	5,4
	Honey Sweet / (T 3.3)	62,8	2,3	3,7
	Honey Sweet / (T 4.4)			
9	Renclod Althan / (CA 4.7)	46,9	1,7	3,6
	Stanley / (CS 3.6)	39,3	2,1	5,3
	Honey Sweet / (T 3.7)			

	Honey Sweet / (T 4.6)	62,3	2,3	3,7
10	Renclod Althan / (CA 4.9)	42,5	1,7	4,0
	Stanley / (CS4.8)	40,1	2,3	5,7
	Honey Sweet / (T 3.8)	62,9	2,4	3,8
	Honey Sweet / (T 3. 9)			
11	Renclod Althan / (CA 3.12)	44,1	1,6	3,6
	Stanley / (CS 4.12)	40,1	2,2	5,5
	Honey Sweet / (T 3. 11)	64,2	2,4	3,7
	Honey Sweet / (T 4. 11)			
12	Renclod Althan / (CA 4.14)	44,2	1,7	3,8
	Stanley / (CS 3. 14)	37,4	2,1	5,6
	Honey Sweet / (T 3.13)	65,6	2,3	3,5
	Honey Sweet / (T 4. 13)			

Rezultatele de ansamblu referitoare la greutatea medie a fructelor, greutatea medie a sâmburilor și ponderea sâmburilor în greutatea fructelor, înregistrate în perioada 2016-2018, la nivelul întregului lot experimental, sunt reprezentate grafic în figurile 19, 20 și 21.

Greutatea medie a fructelor relevă superioritatea netă a soiului de prun transgenic HoneySweet comparativ cu cele două soiuri convenționale utilizate ca martor. Mai precis, greutatea medie a fructelor la soiul HoneySweet a fost de 64,9g, în timp ce la soiurile Renclod Althan și Stanley s-a înregistrat o greutate medie de 44,5g, respectiv 38,9g (Figura 19). Au existat și situații în care unele fructe ale soiului de prun transgenic HoneySweet au depășit greutatea de 80g (Foto 7a), iar izolat chiar 90g (Foto 7b), ceea ce evidențiază potențialul acestui soi în lucrările de ameliorare genetică pentru obținerea de soiuri cu fructe mari.



Foto 7. Fructe aparținând soiului de prun transgenic HoneySweet

Rezultatele privind greutatea medie a sâmburilor arată că la soiul de prun transgenic HoneySweet aceasta este mai mare decât cea a soiurilor Renclod Althan (2,4 g față de 1,7g) și Stanley (2,4 g față de 2,1 g), ceea ce era de așteptat având în vedere mărimea fructului la prunul transgenic (Figura 20). Greutatea sâmburilor analizată singular nu este însă un indicator pentru aprecierea corectă a calității fructelor pentru aceasta însușire. De aceea, greutatea sâmburelui trebuie analizată în raport cu greutatea și mărimea fructului. Astfel, rezultatele de ansamblu prezentate grafic în figura 21 arată că soiul transgenic HoneySweet a avut o pondere a sâmburilor în greutatea fructelor similară soiului Renclod Althan, și mult mai redusă decât la soiul Stanley (3,7% față de 5,4%). Se constată astfel, o superioritate a soiului de prun transgenic HoneySweet față de soiul Stanley în ceea ce privește ponderea sâmburilor în greutatea fructelor.

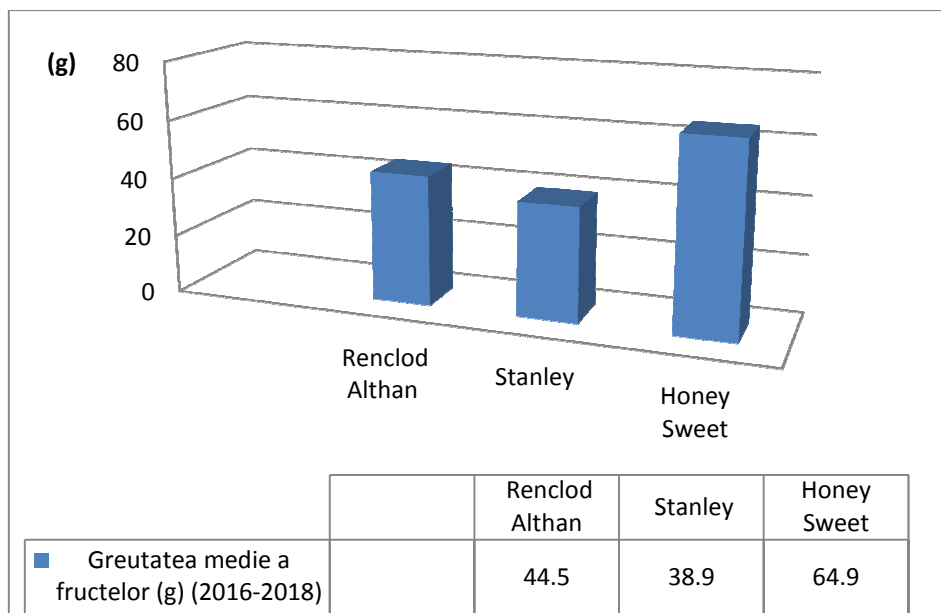


Figura 19. Greutatea medie a fructelor înregistrată la cele trei soiuri din lotul experimental (2016-2018)

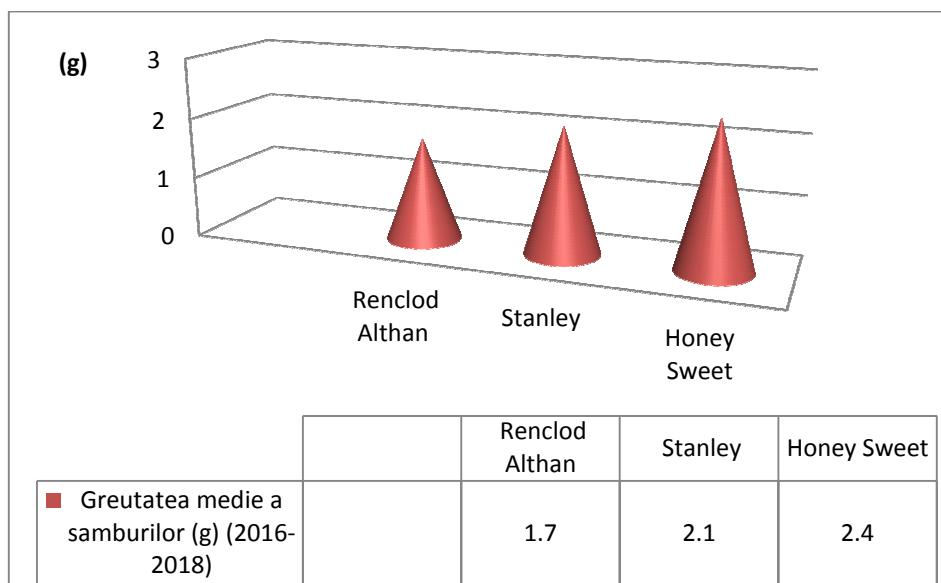


Figura 20. Greutatea medie a sâmburilor înregistrată la cele trei soiuri din lotul experimental (2016-2018)

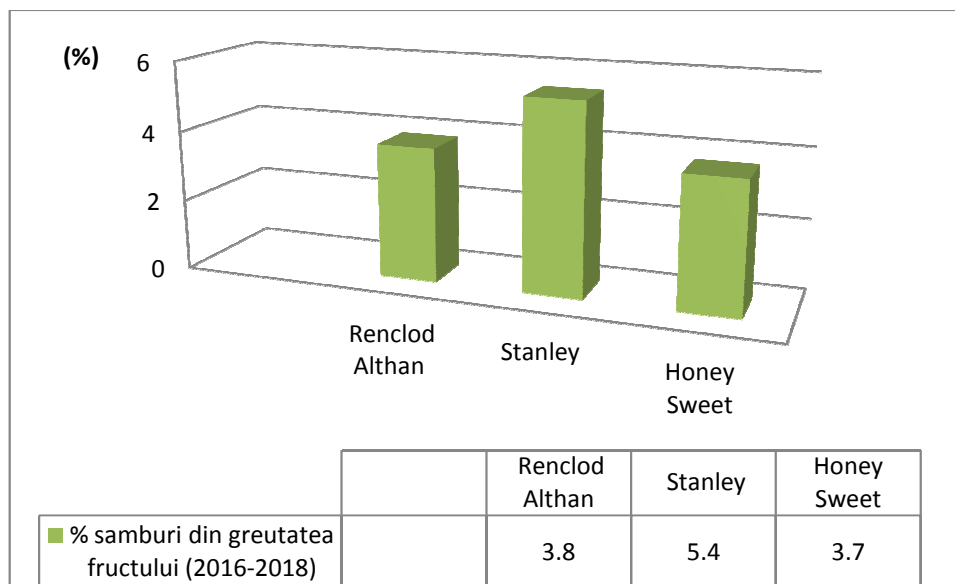


Figura 21. Ponderea sâmburelui în greutatea fructului înregistrată la cele trei soiuri din lotul experimental (2016-2018)

Măsurătorile biometrice (media a 20 de fructe/soi/bloc), efectuate cu ajutorul şublerului electronic (Foto 8), redate în tabelul 13, confirmă că niciunul dintre cele trei soiuri nu prezintă o simetrie perfectă. La soiul Renclod Althan valorile înălţimii fructului s-au situat între 38,2 mm şi 40,5 mm, diametrul mare între 42,6 si 45,2 mm, iar diametrul mic între 40,5 si 43,3 mm. La soiul Stanley valorile înălţimii fructului s-au situat între 47,1 şi 50,5 mm, diametrul mare între 36,5 şi 37,6 mm, iar diametrul mic între 35,0 şi 36,7 mm. La soiul de prun transgenic HoneySweet înaltimea fructului a avut valori între 51,5 şi 54,8 mm, diametrul mare între 44,3 si 47,4 mm, iar diametrul mic între 44,0 si 45,9 mm.



a



b



c

Foto 8. Determinari biometrice cu ajutorul sublerului electronic la soiurile din lotul experimental.

(a - Renclod Althan, b - Stanley, c – HoneySweet)

Tabelul 13. Biometria fructelor (media la 20 fructe) la prunul transgenic (HoneySweet) și convențional (Renclod Althan și Stanley) din lotul experimental de la SCDP Bistrița

-media 2016-2018-

Nr. bloc	Soiul / cod lot	<i>H (mm)</i>	<i>D(mm)</i>	<i>d (mm)</i>
1	Renclod Althan / (CA1.1.)	38,7	44,1	41,7
	Stanley / (CS 2.1)	50,3	37,3	35,7
	HoneySweet / (T 1.2)	52,5	46,7	45,0
	Honey Sweet / (T 2.2.)	52,0	44,9	44,3
2	Renclod Althan / (CA 1.4)	40,5	44,2	41,6
	Stanley / (CS 2.3.)	49,9	37,1	35,8
	HoneySweet / (T1.3.)	54,0	47,4	45,9
	Honey Sweet /T 2.4)	53,3	46,8	45,5
3	Renclod Althan / (CA 1.6)	40,2	44,0	41,6
	Stanley / (CS 1.7)	50,5	37,0	35,6
	Honey Sweet / (T 2.7)	51,7	45,5	44,6
	Honey Sweet / (T 2.6)	53,0	46,3	45,1
4	Renclod Althan / (CA 2.8)	40,0	43,5	41,1
	Stanley / (CS1.8)	49,6	36,5	35,3
	Honey Sweet / (T 1,9)	54,0	47,0	45,9
	Honey Sweet / (T2.9)	53,8	46,7	45,2
5	Renclod Althan / (CA 2.11)	38,2	42,6	40,5
	Stanley / (CS 2.12)	49,1	36,5	35,0
	Honey Sweet / (T1.11)	54,8	47,1	45,7
	Honey Sweet / (T 1.12)	52,6	46,3	44,7
6	Renclod Althan / (CA 1.13)	39,9	43,3	41,6
	Stanley / (CS 1.14)	49,5	36,8	35,6

	Honey Sweet / (T 2.14)	53,1	46,2	44,9
	Honey Sweet / (T 2.13)	53,3	46,5	44,9
7	Renclod Althan / (CA 3.1)	40,1	43,8	41,6
	Stanley / (CS 4.2.)	50,0	37,2	35,8
	Honey Sweet / (T 3.2)	52,6	46,2	44,9
	Honey Sweet / (T 4.1)	52,9	46,5	45,0
8	Renclod Althan / (CA 4.3)	40,0	43,9	41,3
	Stanley / (CS 3.4)	48,8	37,1	35,8
	Honey Sweet / (T 3.3)	52,6	45,8	44,6
	Honey Sweet / (T 4.4)	51,5	44,3	42,9
9	Renclod Althan / (CA 4.7)	40,3	45,2	42,1
	Stanley / (CS 3.6)	49,0	36,9	35,6
	Honey Sweet / (T 3.7)	51,6	45,8	44,8
	Honey Sweet / (T 4.6)	52,0	46,5	44,1
10	Renclod Althan / (CA 4.9)	40,2	44,2	42,3
	Stanley / (CS4.8)	47,1	37,6	36,7
	Honey Sweet / (T 3.8)	53,9	46,6	44,6
	Honey Sweet / (T 3. 9)	51,8	45,0	43,9
11	Renclod Althan / (CA 3.12)	40,0	44,3	41,7
	Stanley / (CS 4.12)	49,4	37,0	35,8
	Honey Sweet / (T 3. 11)	53,2	45,7	44,2
	Honey Sweet / (T 4. 11)	52,2	45,8	44,2
12	Renclod Althan / (CA 4.14)	39,7	43,8	41,1
	Stanley / (CS 3. 14)	49,5	36,7	35,6
	Honey Sweet / (T 3.13)	52,9	46,4	45,1
	Honey Sweet / (T 4. 13)	52,8	45,7	44,8

Reprezentarea grafică (Figura 22) a măsurătorilor biometrice la fructe ca medie pe cele 12 blocuri/soi relevă mărimea net superioară a fructelor la soiul transgenic HoneySweet comparativ cu cele două soiuri convenționale. Valorile medii ale măsurătorilor biometrice la soiul HoneySweet indică o înălțime a fructelor de 52,8 mm, un diametru mare de 46,2 mm și un diametru mic de 44,8 mm. Aceste valori medii, dar și cele individuale confirmă forma destul de regulată, mai precis ovală a fructelor la soiul HoneySweet. Valorile medii ale măsurătorilor biometrice la soiul Renclod Althan arată o înălțime a fructelor de 39,8 mm, un diametru mare de 43,9 mm și un diametru mic de 41,5 mm, ceea ce confirmă forma relativ sferică, ușor turtită a fructelor la acest soi. Valorile medii ale măsurătorilor biometrice la soiul Stanley arată o înălțime a fructelor de 49,4 mm, un diametru mare de 37,0 mm și un diametru mic de 35,7 mm, ceea ce confirmă forma ovală a fructelor la acest soi.

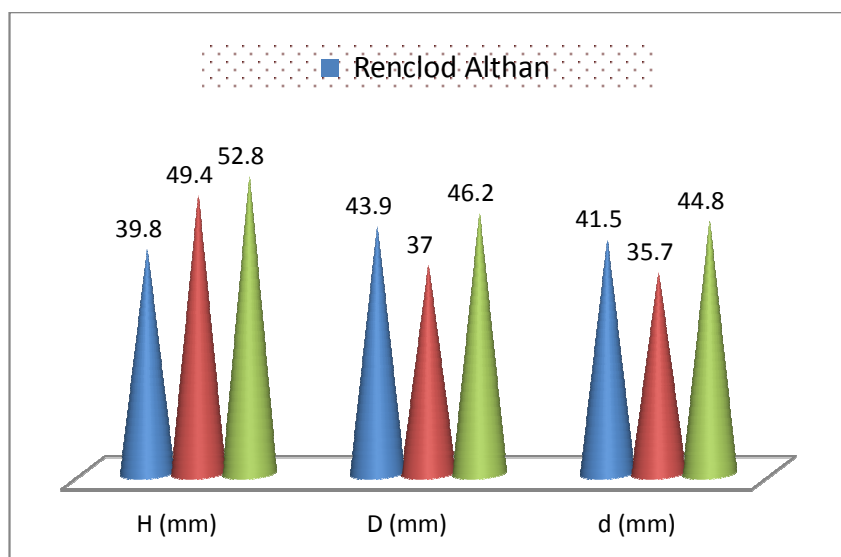


Figura 22. Biometria fructelor (2016-2018): înălțime (H), diametrul mare (D), diametrul mic (d) la la cele trei soiuri din lotul experimental

În ceea ce privește mărimea și colorația fructelor, soiurile HoneySweet (Foto 9a) și Stanley au prezentat un grad de uniformitate mai ridicat comparativ cu soiul Renclod Althan (Foto 9b).



a



b

Foto 9. Mărime uniformă a fructelor la soiul transgenic HoneySweet (a) și neuniformă la soiul Renclod Althan (b)

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 (Foto 10). Forma fructului la soiul HoneySweet este una destul de regulată, ovală. Totuși, brazda ventrală împarte fructul în două părți ușor inegale, acest caracter fiind însă mult mai puțin vizibil decât la soiurile Stanley și Renclod Althan. Soiul Stanley prezintă și dezavantajul unei forme ușor gătuită a fructului. De asemenea, apariția fructelor gemelare (Foto 11a) este un fenomen frecvent întâlnit la acest soi. Există numeroase situații în care, din fructele gemelare unul se dezvoltă foarte slab și cade, rezultând un aspect general deformat (Foto 11b), neatractiv.



Foto 10. Mărimea fructelor la prunul transgenic HoneySweet comparativ cu soiurile convenționale Renclod Althan și Stanley



a



b

Foto 11. Fructe gemelare (a) și efectul desprinderii unei părți (b) la soiul Stanley

Colorația uniformă, preferată de majoritatea consumatorilor, precum și lipsa supraîncărcării cu pruină contribuie la aspectul atrăgător al fructului de prun transgenic HoneySweet. Fructul nu prezintă reticulații pe epidermă, fapt care poate influența pozitiv alegerea cumpărătorilor. Culoarea de fond a epidermei (cu pruină) este albastră violacee, plăcută. Pulpa, de culoare galben-verzui, este fermă și succulentă. Sâmburele este mic raportat la greutatea fructului, ceea ce conferă un plus la aprecierea soiului.

Aspectul global al fructelor (Foto 12) la soiul HoneySweet este foarte plăcut, impactul vizual asupra consumatorului fiind unul pozitiv, privind atât fructele luate individual, cât și pe pom.



Foto 12. Aspectul fructelor aparținând soiului de prun transgenic HoneySweet

Analiza comparativă a calității fructelor la cele trei soiuri (HoneySweet - prun transgenic), Renclod Althan, Stanley – prun conventional), apreciată prin analizele biochimice efectuate la maturitatea de consum în anul 2017, a arătat că, toate cele trei soiuri dețin caracteristici valoroase din punct de vedere nutrițional (Marghitaș și colab., 2017). Comparând cele trei soiuri analizate prin prisma celor mai importanți factori nutriționali fizico chimici (glucide, proteine, lipide, minerale, polifenoli) putem concluziona următoarele:

- Soiul Stanley a avut cea mai mică concentrație de apă în fruct (78,13%), iar soiul HoneySweet și Renclod Althan cantități mai ridicate (81,95 – 82,65%). Cea mai ridicată cantitate de cenușă a fost înregistrată la soiul Stanley, urmat de HoneySweet și Renclod Althan, invers proporțional cu cantitatea de apă din probe.
- Aciditatea titrabilă a prezentat cea mai mică valoare la soiul Renclod Althan (0,33%), o valoare mai mult decât dublă la soiul Stanley (0,71%) și una mult mai mare la soiul Honey Sweet (1,25%).
- Conținutul de glucide simple a fost mai ridicat la soiul Stanley (13,5%) față de soiurile HoneySweet (10,73%) și Renclod Althan (10,71%), care au avut valori similare.
- Materiile solubile solide au avut valori similare la soiurile HoneySweet și Renclod Althan (16,52 – 16,05%), și mai ridicate la soiul Stanley (20,20%).
- Conținutul de lipide totale a fost mai ridicat la soiul HoneySweet (1,83%), urmat de Stanley (1,23%) și Renclod Althan (1,08%). Conținutul de proteine totale a fost echilibrat în cele trei soiuri, fiind cuprins între 0,67 -0,81%.
- Conținutul de vitamine. Soiul Honey Sweet a înregistrat cel mai mare conținut în vitamina C (9,36 mg/100g), urmat îndeaproape de soiul Stanley (8,61 mg/100g) și la mare distanță de soiul Renclod Althan (2,90 mg/100g). Situația a fost similară și în cazul conținutului în vitamina B1. Soiul HoneySweet a înregistrat și cel mai ridicat conținut și în vitamina B2, cele două

soiuri convenționale având valori foarte apropiate. În schimb, soiul HoneySweet a înregistrat un conținut în vitamina B3 mai redus decât ambele soiuri convenționale.

- Conținutul în minerale. Cel mai mare conținut de Ca s-a înregistrat la soiul HoneySweet, urmat de soiul Renclod Althan, care a avut un conținut de Ca sensibil mai mare decât soiul Stanley. Conținutul de Fe a fost asemănător la soiurile Renclod Althan și HoneySweet și mai ridicat la soiul Stanley. Conținutul de Na a înregistrat cea mai mare valoare la soiul HoneySweet, urmat de soiul Stanley. Conținutul de K a fost similar la soiurile Renclod Althan și HoneySweet și mai ridicat la soiul Stanley. Soiul HoneySweet a avut cel mai ridicat conținut în Mg, urmat de soiul Stanley. În condițiile anului 2017, soiul HoneySweet se remarcă prin cel mai ridicat conținut în Ca, Na și Mg, iar soiul Stanley prin cel mai ridicat conținut în Fe și K.â
- Conținutul de polifenoli totali în fructele de prune analizate a fost apropiat la soiurile Honey Sweet (179,29 mgGAE/100 g) și Renclod Althan (186,06 mgGAE/100 g) și mai ridicat la soiul Stanley (253.34 mgGAE/100 g). Cea mai ridicată cantitate de flavone a fost determinată la soiul Honey Sweet (53,42 mg/100g), urmat de Stanley (49,95 mg/100g) și Renclod Althan (38,51 mg/100g).

Aceste rezultate sunt în mare parte comparabile cu cele obținute de Ravelonandro și colab. (2013) și arată că soiul de prun transgenic HoneySweet oferă, pe lângă rezistența la virusul *Plum pox*, fructe de calitate foarte bună.

4.3. Evaluarea posibilității de aplicare a unor practici de management prietenoase mediului pentru prevenirea răspândirii virusului *Plum pox*

În Uniunea Europeană și nu numai, există o cerință accentuată de reducere a utilizării pesticidelor pentru protecția culturilor, astfel încât să existe posibilitatea aplicării unor practici de management cât mai prietenoase mediului, iar fermierii trebuie să se alinieze acestor cerințe. Totuși, pentru combaterea eficientă a bolilor și dăunătorilor din livezi este necesar un număr mare de tratamente fitosanitare și, astfel, fermierii se confruntă cu probleme de siguranță alimentară.

Prunul transgenic a fost creat ca o necesitate stringentă de găsire a unei soluții de combatere eficientă a virusului *Plum pox* (PPV), a cărui transmitere de la un pom la altul se realizează extrem de facil prin intermediul afidelor virulifere. În acest context, se pune întrebarea dacă unele tratamente împotriva afidelor ar putea fi evitate în livezile cu prun transgenic în condițiile în care acesta nu se infectează cu PPV în mod natural prin intermediul afidelor vectori și, prin urmare, prezența lor în livadă nu favorizează răspândirea virusului.

Se cunoaște faptul că tratamentele cu insecticide pentru combaterea afidelor au un dublu scop. Mai întâi, acestea se efectuează cu scopul de a micșora potențialul de răspândire al virusului *Plum pox* prin reducerea populațiilor de afide vectoare. În al doilea rând, reducerea populațiilor de afide înseamnă și reducerea pagubelor cauzate prin hrănirea acestora cu frunzele și lăstarii tineri. Totuși, în contextul cerințelor Uniunii Europene referitoare la necesitatea reducerii utilizării pesticidelor în agricultură, se pune întrebarea dacă utilizarea soiurilor rezistente la PPV, în speță prunul transgenic, ar putea ajuta și la evitarea unor tratamente cu insecticide pentru combaterea vectorilor viruliferi cu consecințe favorabile asupra mediului și consumatorilor. Mai precis, evitarea unor tratamente cu insecticide ar însemna, pe de o parte, mai puține insecticide dispersate în

mediu, iar pe de altă parte, obținerea unor fructe cu mai puține reziduuri de pesticide, în beneficiul consumatorilor. Teoretic, evitarea unor tratamente cu insecticide în plantații cu soiuri de prun rezistente la PPV, precum prunul transgenic, este posibilă fără a stimula răspândirea virusului. Situația este însă mult mai complexă deoarece în plantațiile de prun există și alți dăunători problemă care pot provoca pagube economice însemnate și care, parțial, se combat în același timp cu afidele vectori. În acest sens au fost efectuate cercetări la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița, cu scopul de a evalua posibilitatea de reducere a numărului de tratamente pentru combaterea afidelor într-un lot experimental cu prunul transgenic HoneySweet, care, ulterior să constituie parte a unor practici de management prietenoase mediului pentru prevenirea răspândirii și limitării impactului virusului *Plum pox*. Avându-se în vedere că cel mai important dăunător este viermele prunelor (*Laspeyresia funebrana* Tr.), acesta a fost inclus în studiul efectuat. Prin urmare, pentru evaluarea potentialului de reducere a numărului de tratamente cu insecticide, dinamica zborului afidelor virulifere a fost urmărită în paralel cu cea a viermelui prunelor (Zagrai și colab., 2018).

Lucrările de întreținere ale parcelei experimentale au fost, în general, similare celor practicate în livezile de prun convențional. Singura deosebire a constat în aplicarea unui număr redus de tratamente fitosanitare pentru combaterea afidelor. Concret, doar trei, respectiv patru tratamente cu insecticide au fost aplicate în perioadele de vegetație din anii 2016, respectiv 2017, față de 7-8 tratamente efectuate în culturile de prun convențional.

Monitorizarea afidelor vectoare în interiorul lotului experimental s-a realizat prin metoda “sticky shoot” (Avinet și colab., 1993; Marroquin și colab., 2004). Această metodă presupune dispersarea unei substanțe adezive pe lăstari marcați în prealabil și capturarea afidelor care populează acești lăstari. Ulterior, afidele sunt desprinse de pe lăstari prin spălare cu ajutorul unui solvent, numărate și identificate la microscop. Dinamica

zborului afidelor virulifere a fost urmarită în paralel cu cea a viermelui prunelor. Capturarea adulților de *Laspeyresia funebrana* Tr. s-a efectuat cu ajutorul capcanelor feromonale ATRAFUN. Datele obținute au fost utilizate pentru întocmirea curbelor de zbor și la stabilirea dinamicii zborului la cei doi dăunători. Apoi, curbele de zbor au fost analizate simultan pentru a identifica, pe de o parte, perioadele de suprapunere a activității celor doi dăunători, respectiv perioadele când tratamentele cu insecticid sunt necesare, iar pe de altă parte perioadele când activitatea acestora nu se suprapune, respectiv identificarea unor intervale de timp când anumite tratamente cu insecticid ar putea fi evitate.

Rezultatele reprezentate grafic în figura 22 arată că zborul afidelor în anul 2016 a început în prima decadă a lunii mai cu o evoluție crescătoare continuă până la mijlocul lunii iunie când s-a înregistrat un maxim de zbor. Ulterior, curba de zbor a avut o evoluție descrescătoare până la sfârșitul lunii iulie când, practic, zborul afidelor a încetat. Populațiile de afide au înregistrat un al doilea zbor în toamnă, însă mult mai redus decât cel din iunie.

Laspeyresia funebrana Tr. a avut un zbor redus în luna mai și s-a intensificat rapid în luna iunie, înregistrându-se un vârf maxim de zbor la sfârșitul lunii (Figura 22). Apoi, numărul de adulți capturați s-a redus puternic de-a lungul perioadei iulie-august. Zborul adulților de *Laspeyresia funebrana* Tr. a încetat practic în luna septembrie.

Analiza simultană a curbelor de zbor arată că vârful maxim de zbor al adulților celor doi dăunători este foarte apropiat ca perioadă, iar curba de zbor a adulților de *Laspeyresia funebrana* Tr. se suprapune în cea mai mare parte peste cea a afidelor. Totuși, se poate observa că zborul adulților de *Laspeyresia funebrana* Tr. s-a încheiat în septembrie, în timp ce cel al afidelor s-a reluat în această perioadă, facilitând astfel răspândirea PPV la soiurile sensibile și tolerante.

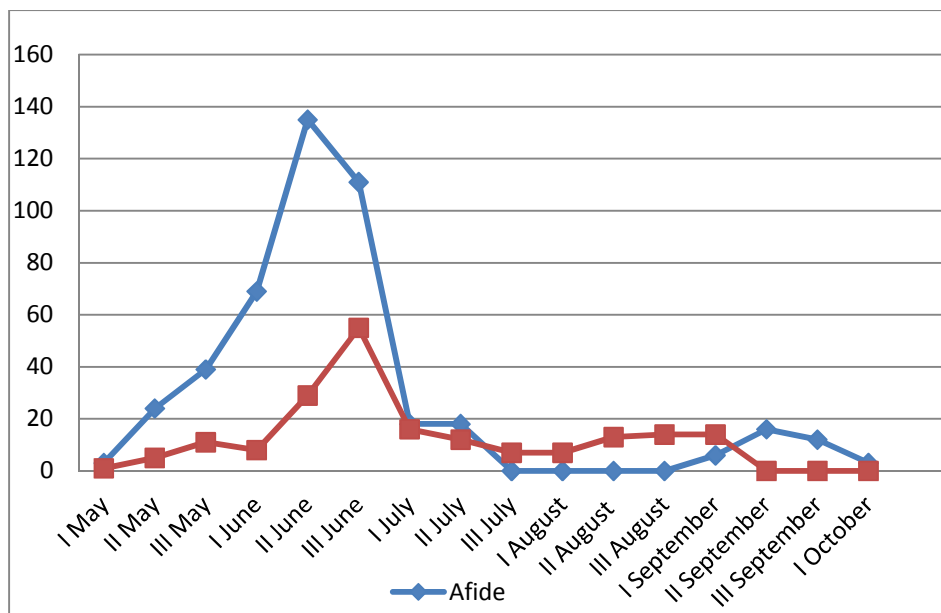


Figura 22. Dinamica zborului afidelor și adulților de *Laspeyresia funebrana* Tr. în lotul experimental de la SCDP Bistrița - 2016

Dinamica zborului afidelor în anul 2017 (Figura 23), evidențiază similaritatea acesteia cu cea înregistrată în anul precedent. Astfel, zborul a început în prima decadă a lunii mai cu o evoluție crescătoare continuă până la mijlocul lunii iunie când s-a înregistrat un maxim de zbor. Ulterior, curba de zbor a avut o evoluție descrescătoare până la începutul lunii august când, practic, zborul afidelor a încetat. Populațiile de afide au înregistrat un al doilea zbor în toamnă, însă mult mai redus decât cel din iunie.

Dinamica zborului la *Laspeyresia funebrana* Tr. în anul 2017 (Figura 23) a arătat că acesta a început concomitent cu cel al afidelor și s-a încheiat la începutul lunii septembrie. Spre deosebire de anul precedent, numărul de adulți capturați indică două vârfuri, unul la sfârșitul lunii mai și un altul la

sfârșitul lunii iulie, ambele însă semnificativ mai scăzute decât cele înregistrate în luna iunie 2016.

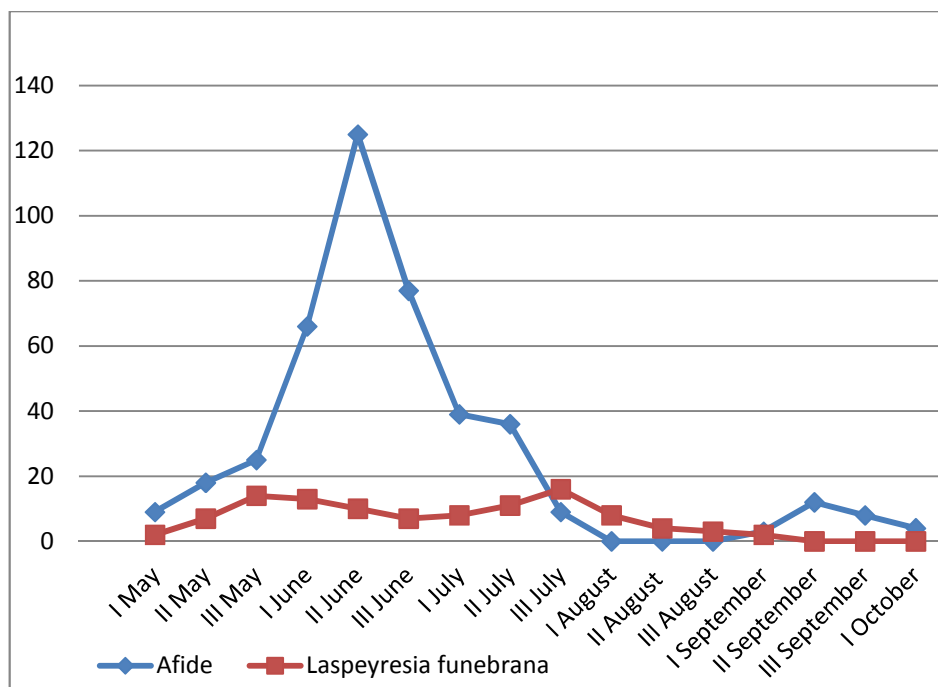


Figura 23. Dinamica zborului afidelor și adulților de *Laspeyresia funebrana* Tr. în lotul experimental de la SCDP Bistrița 2017

Prin analiza simultană a curbelor de zbor (anii 2016 și 2017) ale celor doi dăunători (afide aripate și *Laspeyresia funebrana* Tr.) se poate observa că, deși există fluctuații ale activității acestora, perioadele de zbor coincid în cea mai mare parte. Prin urmare, tratamentele cu insecticide sunt necesare pentru combaterea viermelui prunelor, indiferent dacă este sau nu necesară combaterea afidelor. Totuși, identificarea unor perioade scurte când curbele de zbor nu se suprapun ar permite evitarea unor tratamente cu insecticide, fără a stimula răspândirea virusului *Plum pox* în cazul prunului transgenic HoneySweet. Curbele de zbor ale celor doi dăunători din anii

2016 și 2017 identifică o astfel de perioadă în luna septembrie, când afidele își reiau zborul pentru o perioadă scurtă, iar prezența zborului la *Laspeyresia funebrana* Tr. este practic inexistent.

O altă situație în care unele tratamente cu insecticide ar putea fi evitate în plantațiile cu prun transgenic rezistent la PPV este atunci când rezerva biologică a viermelui prunelor este sub pragul economic de dăunare sau atunci când situația permite controlul acestui dăunător prin utilizarea capcanelor feromonale (de exemplu, livezi pe suprafață restrânsă).

Reducerea cantităților de pesticide utilizate pentru protecția culturilor se numără printre obiectivele Uniunii Europene de a conserva mediul înconjurător și de a proteja sănătatea oamenilor. Rezultatele cercetărilor efectuate la SCDP Bistrița relevă potențialul prunului transgenic de a contribui la o reducere a numărului de tratamente cu insecticide. Astfel, datorită rezistenței sale la virusul *Plum pox*, tratamentele împotriva afidelor nu sunt necesare în livezile cu prunul transgenic HoneySweet în luna septembrie, când afidele își reiau zborul și transmit virusul în livezile cu soiuri sensibile sau tolerante la acest virus. Evitarea aplicării unor tratamente cu insecticide în livezile cu prun transgenic rezistent la PPV ar putea fi posibilă și în situația în care populațiile altor dăunători (cu excepția afidelor), combătute în același timp, se află sub pragul economic de dăunare sau dacă alte metode ecologice (de ex. capcanele feromonale) pentru combaterea acestor dăunători sunt disponibile și aplicabile. Acest studiu demonstrează potențialul utilizării prunului transgenic rezistent la virusul *Plum pox* ca parte integrantă a unor practici de management prietenoase mediului, în contextul necesității prevenirii răspândirii și limitării impactului virusului *Plum pox*.

CAP. V. RECOMANDĂRI PRIVIND POLITICA NAȚIONALĂ REFERITOARE LA EVENTUALA CULTIVARE A PRUNULUI TRANSGENIC ÎN ROMÂNIA

Domeniul biotehnologiei, în speță cel al plantelor transgenice, deschide un nou drum agriculturii mondiale, progresele înregistrate putând aduce beneficii importante atât producătorilor cât și consumatorilor. Totuși, având în vedere principiul precauției, este necesar ca introducerea în cultură a plantelor modificate genetic să fie precedată de cercetări laborioase destinate evaluării potențialelor riscuri asupra mediului. Astfel de cercetări au fost efectuate în cazul prunului transgenic HoneySweet în decursul a peste 20 de ani fiind implicate instituții de cercetare prestigioase din Statele Unite ale Americii, Franța, Cehia, Polonia, România și Spania, țara noastră fiind reprezentată de Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultură Bistrița.

Deși avantajele prunului transgenic HoneySweet sunt incontestabile, datorită prezenței unor gene străine în genom au fost exprimate potențiale riscuri de siguranță a mediului, derivate din prezența insertului. Unul dintre acestea s-a referit la potențialul hazard conform căruia prezența constitutivă a secvențelor genei capsidale a PPV ar putea favoriza apariția unor tulpini recombinante cu patogeneză necunoscută. Potențialul impact al prunului transgenic conținând gena proteinei capsidale a PPV asupra diversității populațiilor PPV a fost evaluat în cadrul unui proiect de cercetare finanțat de către Comisia Europeană (proiect TRANSVIR). Acest studiu de risc, bazat pe experiențe de lungă durată efectuate în condiții de câmp, a relevat **efectul neutral** al prunului transgenic asupra populațiilor virale indigene. Mai mult, probabilitatea apariției unor tulpini recombinante ale PPV la prunul transgenic HoneySweet este chiar mai mică decât în cazul prunului convențional întrucât acesta nu s-a infectat în mod natural. De asemenea, co-infecția PPV + *Apple chlorotic leaf spot virus* sau *Prune dwarf virus* sau *Prunus necrotic ringspot virus* nu a influențat stabilitatea mecanismului PTGS.

Un alt potențial risc invocat s-a referit la gena marker *npt II*, prezentă în genomul prunului transgenic HoneySweet, care conferă

rezistența la kanamicină. Acest potențial risc a fost evaluat de către Panelul Științific pe probleme de organisme modificate genetic a European Food Safety Authority (EFSA), iar concluziile au relevat **siguranța** utilizării acestei gene în culturile destinate consumului. Pe seama genelor care determină rezistența la antibiotice s-au făcut numeroase speculații conform cărora ar putea fi pusă în pericol sănătatea oamenilor prin ineficiența tratamentului cu antibioticul respectiv. Articolul 4 din Directiva Europeană 18/2001 stipulează că toate OMG-urile care conțin gene de rezistență la antibiotice să fie analizate **individual**, iar cele cu efecte **adverse** să fie eliminate. În acest sens, Comisia Europeană a mandatat EFSA să evalueze potențialele riscuri privind genele de rezistență la antibiotice, utilizate ca markeri în transgeneza vegetală. Opinia EFSA reprezintă un element cheie în procedura privind aprobarea cultivării plantelor modificate genetic în țările membre UE. De aceea, România, membru al Uniunii Europene, trebuie să țină seama de concluziile acestei instituții, iar deciziile referitoare la cultivarea plantelor transgenice ce conțin gene care conferă rezistență la antibiotice să fie în concordanță cu recomandările EFSA.

În opinia adoptată la 2 aprilie 2004, EFSA consideră că frecvența transferului pe orizontală este foarte redus pentru toate genele de rezistență la antibiotice. Totuși, din respect pentru importanța clinică, EFSA grupează aceste gene în trei categorii cu potențial de risc diferit pentru sănătatea umană și mediu. Prima categorie include genele care conferă rezistența la kanamicină (*nptII* - frecvent utilizată în transgeneza vegetală) și higromicină. Concluzia EFSA referitoare la gena *nptII* este că "gena *nptII*, care conferă rezistență la kanamicină, are o istorie de 13 ani care relevă **siguranța** utilizării în culturile destinate consumului, gena respectivă fiind larg răspândită în natură atât printre microbii umani cât și în mediul înconjurător". De asemenea, EFSA menționează că, "nu există motive raționale care să restricționeze folosirea acestui tip de genă atât **în experiențele de câmp, cât și pentru producția destinată consumului**" (The EFSA Journal, 2004, nr.48, 1-18). În anul 2007, EFSA reanalizează potențialul risc al genei *nptII* și reconfirmă absența efectelor adverse ale acestei gene asupra sănătății umane și a mediului.

A doua categorie include genele marker care conferă rezistența la cloramfenicol, ampicilină, streptomycină și spectinomycină. Opinia EFSA este că genele respective "**ar trebui să fie restricționate** pentru testele de câmp și nu ar trebui să fie prezente în plantele modificate genetic destinate consumului". Referitor la cea de-a treia categorie, care include gene de rezistență la amikacină și tetraciclină, EFSA este de părere că acestea "**nu trebuie să fie prezente** în plantele modificate genetic destinate consumului sau testării în câmp".

Prin urmare, deciziile țării noastre privind testarea în câmp și introducerea pe piață a produselor transgenice care conțin gene de rezistență la antibiotice ar trebui să se refere doar la OMG-urile din prima categorie (care include gena *npt II*).

Problemele de coexistență, ca rezultat al fluxului genic sunt subiectul unor numeroase dezbateri la nivelul Uniunii Europene. Deși fluxul genic este un fenomen frecvent întâlnit între populațiile conspecifice, cazul prunului prezintă anumite particularități referitoare atât la potențiala impurificare a culturilor convenționale, cât și la introgresia cu potențial propagativ. Dacă ne referim la potențialul risc al impurificării fructelor prunului convențional, urmare a polenizării cu polen provenit de la prunul transgenic, acesta practic este inexistent. Eventuala polenizare între prunul transgenic și cel convențional, nu ar face ca prunele în sine să fie impurificate deoarece transgenele se vor regăsi doar la nivelul embrionului. Or, prunele, fie folosite pentru consum în stare proaspătă, fie procesate ca gem, se consumă fără sâmbure. Partea edibilă (pulpa fructului) nu va conține transgene deoarece ea derivă exclusiv din forma maternă care este netransgenică.

Dacă ne referim la posibilitățile realizării unei variabilități potențial propagative urmare a introgresiei genetice, prunul are iarăși anumite particularități. Dacă în cazul unor plante care se înmulțesc prin semințe fluxul genic poate crea un plus de variabilitate cu mare potențial de propagare, acest lucru nu este valabil în cazul prunului. Aceasta deoarece, tranferul materialului genetic prin intermediul polenului poate fi realizată cel mult la nivelul embrionului și nicidecum la nivelul materialului săditor destinat plantării. Aceasta deoarece, în practica producerii materialului

săditor, soiurile cu potențial de încrucișare naturală cu prunul transgenic, se înmulțesc exclusiv pe cale vegetativă. În acest context nu există posibilitatea propagării prunului transgenic decât în mod controlat. Totuși, dacă cineva utilizează sămburii pentru producerea de portaltoi, aceștia nu vor produce flori și nici fructe. Prin urmare, prunul convențional poate coexista fără probleme cu prunul transgenic.

Prunul, atât cel convențional cât și cel transgenic, nu are capacitatea de a invada alte habitate naturale întrucât, în practică, se folosește exclusiv tipul de înmulțire vegetativă. Prin urmare, extinderea fără intervenția omului a arealului de cultură este puțin probabilă, iar probabilitatea ca transgenele să fie răspândite în mod necontrolat este cel mult neglijabilă. Nu se pune problema persistenței nedorite care să conducă la apariția unei specii invazive. Studiul prunului transgenic cu rezistență derivată din patogen a început în anul 1996 în Spania, Polonia, România și SUA și nu a fost semnalat un astfel de efect negativ. Totuși, în eventualitatea, foarte improbabilă, a răspândirii neintenționate în mediu, în afara livezilor, a prunului transgenic cu rezistență derivată din patogen, acest caracter nu i-ar conferi un avantaj selectiv decât în măsura în care rezistența la virusul *Plum pox* poate fi considerat un astfel de avantaj. Această însușire însă, extrem de dorită la specia prun, ar putea fi obținută și prin tehnicile de ameliorare convențională, fiind principalul obiectiv al amelioratorilor europeni de peste 70 de ani. Condiția este ca donori ai rezistenței să fie identificați, iar ereditatea caracterului respectiv să permită transferul nealterat al acesteia. Prin urmare, riscul ca rezistența la virusul *Plum pox* a prunului transgenic să aibă vreun avantaj selectiv în mediile naturale și un efect negativ asupra biodiversității este cel mult neglijabil.

Numeroasele rezultate științifice referitoare la prunul transgenic HoneySweet, care prezintă rezistență derivată din patogen demonstrează că, exceptând caracterul de rezistență la virusul *Plum pox*, acesta este substanțial echivalent cu prunul convențional (Capote și colab., 2008; EFSA, 2004; Hily și colab., 2004, 2005; Malinovski și colab., 2006; Polak și colab., 2017; Ravelonandro și colab., 1997, 1998, 2001, 2013; Scorza și colab., 1998, 2001, 2007, 2013, 2017; USA/APHIS, 2007; Zagrai și colab., 2007, 2008b, 2008c, 2011, 2018). În aceeași notă, rezultatele evaluării

efectuate în Statele Unite ale Americii de APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service) - USDA demonstrează că prunul transgenic C₅ nu prezintă riscuri pentru mediu din următoarele motive:

1. potențialurile de flux genic și de introgresie genetică sunt nesemnificative;
2. răspândirea sa în ecosistemele neamenajate (în sălbăcie) este improbabilă;
3. nu produce vreo proteină toxică pentru organismele non-țintă, inclusiv pentru organismele utile și speciile amenințate sau pe cale de dispariție;
4. nu există vreun potențial aparent de producere a unui impact semnificativ asupra biodiversității;
5. probabilitatea de a determina apariția unor virusuri cu proprietăți noi sau alterate este foarte mică.

Potențialul impact asupra mediului al prunului transgenic C₅, ca și al oricărui descendent al încrucișării acestuia cu prunul convențional, nu este diferit de impactul pe care îl au asupra mediului prunul obținut prin ameliorare convențională sau populațiile locale, conchide APHIS (USDA/APHIS, 2007).

Rezultatele cercetărilor exhaustive, întreprinse în decursul a peste 20 ani, al căror obiect a fost prunul transgenic HoneySweet au demonstrat că: a) strategia RDP (rezistența derivată din patogen) asigură succesul în încercările de a conferi rezistența la viroze și poate fi utilizată ca metodă eficientă de combatere a virusului *Plum pox*; b) formele transformate (transgenice) nu au efecte adverse asupra mediului; c) RDP este o strategie deosebit de utilă și pentru protejarea mediului de urmările abuzului de pesticide folosite pentru combaterea vectorilor viruliferi în livezile de pruni convenționali.

În sfârșit, istoria îndelungată a cultivării în scop comercial a unui organism modificat genetic cu insert similar – papaia transgenică posesoare a unei însușiri de rezistență derivată din patogen – este încă o dovadă incontestabilă a siguranței pentru mediu și sănătatea oamenilor a plantelor transgenice de acest tip.

Toate aceste considerente au stat la baza evaluării pozitive a prunului transgenic HoneySweet de către cele trei agenții guvernamentale ale SUA – (APHIS, FDA - Food and Drugs Administration - și EPA- Environmental Protection Agency-) implicate în procesul de autorizare pentru cultivare în SUA. Rezultatele acestor evaluări au demonstrat că prunul transgenic HoneySweet este substanțial echivalent cu prunul convențional, de care diferă prin rezistența la PPV, o caracteristică extrem de dorită de peste 70 de ani și, de asemenea, prezintă siguranță pentru mediu și sănătatea oamenilor. Urmare a acestor evaluări, prunul transgenic HoneySweet este autorizat începând cu anul 2010 pentru cultivare în SUA.

Această reușită ar fi fost imposibilă fără colaborarea dintre cercetătorii americani și cei europeni întrucât foarte multe rezultate au fost obținute în țări din Uniunea Europeană, care au și finanțat în mare parte cercetările. Astfel, apare o întrebare legitimă: nu ar trebui ca de aceste rezultate să beneficieze și pomicultorii și consumatorii europeni? În acest sens există o inițiativă a Cehiei care, cu sprijinul cercetătorilor implicați în studiul prunului transgenic, lucrează pentru întocmirea unui dosar de notificare care se preconizează a fi înaintat la EFSA pentru evaluare până la sfârșitul anului 2019. Având în vedere importanța culturii prunului în România și impactul virusului *Plum pox* asupra acesteia, considerăm oportună și susținerea din partea țării noastre a acestui demers.

O posibilă acceptare pentru cultivare în Uniunea Europeană a prunului transgenic Honey Sweet poate avea consecințe benefice, întrucât creează atât premisele producerii de prune libere de *Plum pox* și cu mai puține reziduuri de insecticide (prin excluderea unor tratamente necesare combaterii vectorilor viruliferi) și indirect reducerea poluării mediului, cât și premisele limitării răspândirii PPV și reducerii pierderilor de producție cauzate de acest virus. Pentru aceasta este însă nevoie ca obstacolele actuale, existente la nivelul majorității statelor membre ale Uniunii Europene, să fie eliminate. Mai întâi, deciziile autorităților Uniunii Europene și ale celor naționale ar trebui să țină seama de argumentele științifice. În paralel, este obligatorie furnizarea de informații la un nivel accesibil publicului larg, astfel încât percepția creată să fie construită pe un

fundament științific și nicidecum pe unul improvizat, așa cum din nefericire se întâmplă adesea.

Aprobarea pentru cultivare a prunului transgenic HoneySweet în Uniunea Europeană ar însemna doar un prim pas spre elaborarea unei strategii viabile pentru combaterea eficientă a virusului *Plum pox* în țările endemice. Aceasta deoarece utilizarea unui singur soi cu un nivel de rezistență la PPV foarte ridicat va avea un impact pozitiv destul de limitat. De aceea, considerăm absolut necesară implementarea unui program de ameliorare pentru obținerea unei palete largi de noi soiuri rezistente la PPV, folosind ca donor al rezistenței prunul transgenic. Este important de menționat că prunul transgenic HoneySweet deschide noi posibilități de ameliorare a rezistenței prin metode convenționale, întrucât cercetările referitoare la ereditatea rezistenței la PPV a acestei clone transgenice au relevat o transmitere la descendenți după modelul caracterelor alternative (aproximativ jumătate din descendenți moștenesc caracterul de rezistență).

În concluzie, prunul transgenic rezistent la virusul *Plum pox* nu prezintă riscuri asupra mediului, oferind posibilitatea reabilitării culturii prunului, uneori devastată de acest periculos patogen viral. România are șanse de a participa la viitoare proiecte naționale și internaționale alături de SUA și alte țări din Uniunea Europeană pentru rezolvarea celei mai stringente probleme a culturii prunului: virusul *Plum pox*. Pentru aceasta este nevoie însă de sprijinul autorităților românești, iar deciziile la nivel național și la nivelul Uniunii Europene să țină seama de argumentele științifice.

BIBLIOGRAFIE

- Abel P, Nelson RS, De B Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN. 1986. **Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene.** Science, 232, 738-743.
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance V. 1998. **A viral suppressor of gene silencing in plants.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 13079-13084.
- Atanassov D. 1932. **Plum pox. A new virus disease.** Ann Univ. Sofia Faculty Ag. Silv. 11: 49-69.
- Avinent L., Hermoso de Mendoza A., Ll  cer G. 1993. **Comparison of traps for capture of alate aphids (*Homoptera, Aphidinea*) in apricot tree orchards.** Agronomie, 11, 613-618.
- Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE. 1990. Coat protein mediated resistance against virus infection. Ann Rev Phytopathol., 28, 451-474.
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO J, 17(22), 6739–6746.
- M  rghita  , L., Dezmirean, D., Bobi  , O., Bonta, V., Pasca, C., Urcan, A. 2017. Raport de cercetare proiect ADER 413/2015.
- Boscia D, Zeramardini H, Cambra M, Potere O, Grris MT, Myrta A. 1997. **Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus.** European Journal of Plant Pathology, 103, 447-480.
- Cambra M, Olmos A, Gorris MT. 2004. **European protocol for detection and characterization of Plum pox virus.** European Meeting '04 on Plum Pox, September 1-4, Rogow-Skierniewice, Poland. Book of Abstracts, 11.

- Cambra, M., Capote, N., Mzrta, A., Llacer, G. 2006. **Plum pox virus and estimated costs associated with sharka disease.** Bulletin OEPP vol.36, nr.2, pag. 202-204.
- Capote N, Cambra M, Ll cer G, Petter F, Platts Lg, Roy As, Smith Im. 2006a. **A review of Plum pox virus/Une revue du Plum pox virus.** In: Bull. OEPP/EPPO Bull. 36 N  2, Ao t : 201-349.
- Capote N, Perez-Panades J, Monzo C, Carbonell E, Urbaneja A, Scorza R, Ravelonandro M, Cambra M. 2008. **Assessment of the diversity and dynamics of Plum pox virus and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions.** Transgenic Research, 17, 367-377.
- Clark M, Adams AN. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of plant viruses. J. Gen. Virology, 34, 475-483.
- EFSA, 2004. **Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants.** (Question N EFSA-Q-2003-109). The EFSA Journal 48, 1-18.
- Garc a JA, Cambra M. 2007. **Plum pox virus and sharka disease.** Plant Viruses, 1, 69-79.
- Glasa, M., Veronique, M.J., Labone, G., Subr, Z., Kudela, O., Quiot, J.B. 2002. **A natural population of recombinant Plum pox virus is viable and competitive under field conditions.** European Journal of Plant Pathology, 108/9: 843-853.
- Glasa, M., Palkovics, L., Kominek, P., Labone, G., Pittnerova, S., Kudela, O., Candresse, T., Subr, Z. 2004. **Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup.** Journal of Gen. Virol., 85: 2671-2681.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. 1999. **A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.** Science, 286, 950-952.

- Hartmann W, Petruschke M. 2002. **Sharka resistant plums and prunes by utilization of hypersensitivity.** Acta Hort., 538, 391-399.
- Hily JM, Scorza R, Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M. 2004. **Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions.** Transgenic Res., 13, 427-436.
- Hily JM, Scorza R, Webb K, Ravelonandro M. 2005. **Accumulation of the long class of siRNA is associated with resistance to Plum pox virus in a transgenic woody perennial plum tree.** Mol Plant Microbe Interact, 18, 794-799.
- Kasschau KD, Carrington JC. 1998. **A counter defensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing.** Cell, 95(4), 461-470.
- Kegler, H., Fuchs, E., Gruntzig, M. , Schwarz, S., 1998. **Some results 50 years of research on the resistance to plum pox virus.** Acta Virologica 42: 200-215.
- Kerlan C, Dunez J. 1979. **Diferenciation biologique et serologique des souches du virus de la Sharka.** Annales de Phytopat., 11, 241-250.
- Kummert J, Vendrame M, Lepoivre P, Steyer S. 2001. **Development of routine RT-PCR ELISA tests for fruit tree certification.** Acta Hort., 550, 45-52.
- Malinowski T, Cambra M, Capote N, Zawadzka B, Gorris T, Scorza R, Ravelonandro M. 2006. **Field trials of plum clones transformed with plum pox virus coat protein (PPV-CP) gene.** Plant Disease. 90, 1012-1018.
- Marbot S, Salmon M, Vendrame M, Huwaert A, Kummert J, Dutrecq O, Lepoivre P. 2003. **Development of Real-Time RT-PCR Assay for Detection of Prunus necrotic ringspot virus in Fruit Trees.** Plant Disease, 87 (11), 1344-1348.
- Marroquín C., Olmos A., Gorris M.T., Bertolini E., Martinez C., Carbonell E.A., Hermoso de Mendoza A., Cambra M. 2004.

Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. Virus Research, 100, 101-108.

- Minoiu N. 1997. **Bolile și dăunătorii prunului.** În Prunul, Editura Conphys, pag. 343-419.
- Olmos A, Cambra M, Dasi MA, Candresse T, Esteban O, Gorris MT, Asenio M. 1997. **Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA.** Journal Virol. Methods, 68, 127-137.
- Polak J, Pivalova J, Svoboda J, 2005. **Prune Cv. Jojo Resistance to Different Strains of Plum Pox Virus.** Plant Prot. Sci., 41(2), 47-51.
- Polak J si Jarošová J. 2011. **Hypersensitivity of *Prunus domestica* L. 'Jojo' Was Changed by PPV-D Strain into Very High Sensitivity.** Acta Horticulturae 899: 87-94.
- Polák J., Kundu J.K., Krška B., Beoni E., Komínek P., Pívalová J., Jarošová J. 2017. **Transgenic plum *Prunus domestica* L., clone C5 (cv. HoneySweet) for protection against sharka disease.** Journal of Integrative Agriculture, 16(3): 516–522.
- Powell A.P., Nelson R.S., De B., Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N., 1986. **Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene.** Science, nr. 232, 738-743.
- Ravelonandro M, Scorza R, Bachelier JC, Labonne G, Levy L, Damsteegt V, Callahan AM, Dunez J. 1997. **Resistance of transgenic *Prunus domestica* to plum pox virus infection.** Plant Disease, 81,1231-1235.
- Ravelonandro M, Scorza R, Dunez J. 1998. **Characterization of phenotype resistance to plum pox of transgenic plums expressing plum pox virus capsid gene.** Acta Virologica, 42, 270-272.
- Ravelonandro M, Briard P, Renaud R, Scorza R. 2001. **Transgene-based resistance to plum pox virus (Sharka disease) is**

- transferred through interspecific hybridization in *Prunus*.** Acta Horticulturae, 546, 569-574.
- Ravelonandro M, Kundu J., Briard P, Monsion M. 2007. **The effect of Co-Existing *Prunus* Viruses on Transgenic Plum Pox Virus Resistant Plums.** Acta Horticulturae, 738, 653-656.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Polak, J., Callahan, A., Krska, B., Kundu, J., Briard, P. 2013. **„Honey Sweet” Plum – a valuable genetically engineered fruit-tree cultivar,** Food Nutr Sci., 4, 45-49.
- Sanford JC, Johnston SA. 1985. **The concept of pathogen-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome.** Journal of Theoretical Biology, 113, 395-405.
- Scorza R, Ravelonandro M, Callahan AM, Cordts JM, Fuchs M, Dunez J. 1994. **Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene.** Plant Cell. Rep., 14, 18-22.
- Scorza R, Callahan AM, Levy L, Damsteegt V, Ravelonandro M. 1998. **Transferring potyvirus coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce plum pox virus resistant plums (*Prunus domestica*).** Acta Hort., 472, 421-427.
- Scorza R, Callahan A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Ravelonandro M. 2001. **Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic european plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene.** Transgenic Research, 10, 201-209.
- Scorza R, Hily JM, Callahan A, Malinowski T, Cambra M, Capote N, Zagrai I, Damsteegt V, Briard P, Ravelonandro M. 2007. **Deregulation of Plum pox resistant transgenic plum „HoneySweet”.** Acta Horticulturae, 738, 669-674.
- Scorza R., Callahan A., Dardick C., Ravelonandro M., Polak J., Malinowski T., Zagrai I., Cambra M., Kamenova V. 2013. **Genetic engineering of *Plum pox virus* resistance – ‘HoneySweet’ plum - from concept to product.** Plant Cell,

- Tissue and Organ Culture. Journal of Plant Biotechnology. Vol. 115 (1): 1-12.
- Scorza R., Ravelonandro M., Callahan A., Zagrai I., Polak J., Malinowski T., Cambra M., Levy L., Damsteeght Y., Krska B., Cordts J., Gonsalves D., Dardick C. 2016. **HoneeSweet (C5), the First Genetically Engineered Plum pox virus – resistant Plum (*Prunus domestica* L.) Cultivar**. HortScience 51 (5): 601- 603.
- Subr Z, Pittnerova S, Glasa M, 2004. **A simplified RT-PCR - based detection of recombinant plum pox virus isolates**. Acta Virologica, 48, 173-176.
- USDA/APHIS, 2007. Determination of Nonregulated Status for Plum Genetically Engineered for Resistance to Plum Pox Virus. U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Federal Register Doc. E7-13649.
- Vita S., Benes K., Philip, J.P., Gartland K.M.A. 1997. **Histochemical GUS Analysis**. Methods in Molecular Biology, 44, 185-193.
- Voinnet O. 2001. **RNA silencing as a plant immune system against viruses**. Trends Genet., 17, 449-459.
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Dunez J, 1991. **A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection**. Journal of Virological Methods, 33, 355-365.
- Wintermantel WM, Schoelz JE. 1996. **Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in a transgenic plants under conditions of moderate selection pressure**. Virology, 223, 154-164.
- Zagrai I., Gaboreanu I., Ferencz B., Zagrai L., Pamfil D., Popescu, O., Ravelonandro M., Nieves C., Kovacs K. 2006. **First detection and molecular characterization of Plum pox virus recombinant strain in Romania**. Bulletin UASMV Cluj-Napoca, Animal Husbandry and Biotechnologies. Vol. 62/2006, pag. 291-298.

- Zagrai I, Ravelonandro M, Scorza R, Gaboreanu I, Ferencz B, Popescu, O., Pamfil, D., Zagrai, L., Maxim, A. 2007. **Serological and Molecular Variability of *Plum Pox Virus* In Transgenic and Conventional Plums**. Acta Horticultuarum, 738, 703-710.
- Zagrai L, Zagrai I, Beatrix F, Gaboreanu I, Kovacs K, Petricele I, Popescu O, Pamfil D, Capote N., 2008a. **Serological and molecular typing of *Plum pox virus* isolates in the North of Romania**. Journal of Plant Pathology, 90(1), 41-4.
- Zagrai I., Ravelonandro M., Scorza R., Mnoiu N., Zagrai L., 2008b. **Field release of transgenic plums in Romania**. Bulletin UASMV Cluj-Napoca, Animal Science and Biotechnologies. 65 (1-2), 358-365.
- Zagrai, I., Zagrai I, Capote N, Ravelonandro M, Cambra M, Zagrai L, Scorza R., 2008c. ***Plum pox virus* silencing of C5 transgenic plums is stable under challenge inoculation with heterologous viruses**. Journal of Plant Pathology, 90(1), 63-71.
- Zagrai I., Zagrai L., Ferencz B., Petricele I., Pamfil D., Popescu O., Briciu A, Festila A., 2009a. **Serological and molecular typing of *Plum pox virus* isolates in the Transylvania, Romania**. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj, 37 (1): 265-272.
- Zagrai L., Zagrai I., Petricele I., Kelemen B., Pamfil D., Popescu O., Briciu A., Festila A. 2009b. **Serological and Molecular Typing of *Plum pox Virus* Isolates in the Moldavia, Romania**. Bulletin UASVM, Horticulture 66(1-2)/2009: 241-248.
- Zagrai I., Zagrai, L., Preda, S., Isac, M., Cardei, E. 2010a. **Incidence of *Plum Pox Virus* in Romanian Plum Orchards**. Bulletin UASVM, Horticulture 67(1-2), 488,1843-5254.
- Zagrai I., Zagrai L., Kelemen B., Petricele I., Pamfil D., Popescu O., Preda S., Briciu A., 2010b. **Typing and distribution of *Plum pox virus* isolates in Romania**. Julius-Kuhn-Archiv, 427: 342-346.

- Zagrai I., Zagrai L., Preda S., Ferencz B., Petricele I., Pamfil D., Popescu O., Isac M., 2010 - **Genetic diversity of *Plum pox virus* Isolates in Muntenia, Romania.** Romanian Biotechnology Letters, vol. 15 (3): 5303-5309.
- Zagrai I, Ravelonandro M, Gaboreanu I, Ferencz B, Scorza R, Zagrai L, Kelemen B, Pamfil D, Popescu O. 2011. **Transgenic Plums Expressing the Plum Pox Virus (PPV) Coat Protein Gene Do Not Assist the Development of PPV Recombinants Under Field Conditions.** Journal of Plant Pathology 93 (1), 159-165.
- Zagrai I., Zagrai L., Ravelonandro M., Ralph S., Jakab Z., Guzu G., 2018. **Assessment on the Potential Decrease of Insecticide Treatments Against Aphids in ‘HoneySweet’ Plum [*Prunus domestica* (L.)] Plantings.** XXX International Horticultural Congress, Istanbul, Turcia, 12-16 august 2018. Book of abstracts. Acta Horticulturae-în curs de publicare.

