

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA  
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE ALE NATURII

**Consortiu:** Universitatea Stat din Moldova, Institutul de Dezvoltare a Societății  
Informaționale, Universitatea de Stat „Bogdan Petriceicu Hașdeu” din Cahul

Cu titlu de manuscris

CZU: 631.528:[632.4:633.15](043)

**GRĂJDIERU CRISTINA**

**IDENTIFICAREA GENETICO-MOLECULARĂ A  
GENOTIPURILOR DE PORUMB (*ZEA MAYS L.*) REZISTENTE  
LA UNII PATOGENI FUNGICI**

**162. 01. GENETICA VEGETALĂ**

**Teză de doctor în științe biologice**

**Conducător științific:**



**TUMANOVA Lidia**, doctor în științe  
chimice, conferențiar cercetător

**Autor:**



**GRĂJDIERU Cristina**

**CHIȘINĂU, 2024**

**© Grājdieru Cristina, 2024**

## CUPRINS

<b>ADNOTARE</b> .....	5
<b>LISTA ABREVIERILOR</b> .....	8
<b>INTRODUCERE</b> .....	10
<b>1. PRINCIPALELE BOLI FUNGICE LA PORUMB: AGENȚI CAUZALI, PATOGENEZA ȘI BAZELE MOLECULARE ALE REZISTENȚEI PLANTELOR. METODE DE EVALUARE ALE REZISTENȚEI PORUMBULUI LA FUZARIOZE, ASPERGILOZE ȘI PENICILOZE</b> .....	17
1.1. Impactul economic al fungilor din genurile <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> și <i>Penicillium</i> asupra culturii de porumb .....	17
1.2. Bazele moleculare ale rezistenței porumbului la bolile provocate de patogenii din genurile <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> și <i>Penicillium</i> și acumularea micotoxinelor .....	27
1.3. Aplicarea metodelor moleculare pentru diagnosticarea fungilor patogeni și toxigenici: perspective, avantaje și limitări .....	36
1.4. Generalizări .....	42
<b>2. MATERIALE ȘI METODE</b> .....	45
<b>3. TESTAREA PRIMERILOR ȘI OPTIMIZAREA PROTOCOALELOR PCR PENTRU ANALIZA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A FUNGILOR PATOGENICI ÎN MOSTRE DE MATERIAL VEGETAL ȘI SOL</b> .....	55
3.1. Testarea primerilor <i>de novo</i> pentru identificarea unor fungi toxigenici și potențial toxigenici prin nested-PCR .....	55
3.2. Testarea primerilor <i>de novo</i> pentru cuantificarea unor fungi toxigenici și potențial toxigenici prin qPCR .....	62
3.3. Utilizarea reacției PCR pentru analiza cantitativă și semicantitativă a patogenilor fungici .....	75
<b>4. IMPACTUL FACTORILOR DE MEDIU ȘI A GENOTIPULUI ASUPRA RATEI DE ACUMULARE A PATOGENILOR FUNGICI ÎN PLANTE DE PORUMB</b> .....	88
4.1. Starea fitosanitară a câmpurilor experimentale de porumb și materialului semincer depozitat în Banca de gene IGFP .....	88
4.1.1. Dinamica fungilor din genurile <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> și <i>Penicillium</i> în sol și plante de porumb crescute pe câmpurile experimentale sub acțiunea factorilor climatici .....	88
4.1.2. Identificarea fungilor toxigenici în materialului semincer depozitat în Banca de gene a IGFP .....	99
4.2. Impactul genotipului de porumb asupra rata infectării plantei cu patogeni fungici ...	104

4.3. Evaluarea impactului caracterelor morfologice și moleculare asupra rata infectării a genotipurilor de porumb cu patogeni fungici .....	114
<b>CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI .....</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXE .....</b>	<b>144</b>
<b>DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII .....</b>	<b>148</b>
<b>CV-UL CANDIDATULUI.....</b>	<b>149</b>

## Adnotare

**Grăjdieru Cristina, ” Identificarea genético-moleculară a genotipurilor de porumb (*Zea mays* L.) Rezistenți la unii patogeni fungici”, teză de doctorat în științe biologice, Chișinău, 2024**

**Structura tezei:** introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 236 de titluri, 116 de pagini de text de bază, 48 de figuri, 14 tabele, 2 anexe, declarație de peoprie răspundere, CV. Rezultatele obținute sunt publicate în 21 lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** PCR, porumb, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, micotoxine.

**Scopul:** elaborarea de metode rapide și precise pentru evaluarea susceptibilității porumbului la agenții patogeni fungici în scopul selectării germoplasmei valoroase ca material de bază pentru programele de ameliorare a porumbului bazate pe rezistența la ciuperci din genurile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

**Obiective:** testarea unui set de primeri proiectați *de novo* pentru identificarea ciupercilor patogene și toxigenice asociate bolilor porumbului, evaluarea stării fitosanitare a câmpurilor experimentale de porumb și a germoplasmei de porumb stocate în Banca de gene al IGFPP, evaluarea eficacității markerilor în baza elementelor mobile pentru genotipizarea porumbului.

**Noutatea științifică:** au fost evaluate soiuri și linii de porumb din Banca de gene a IGFPP și identificate genotipuri cu rezistență sporită la patogeni fungici.

**Rezultatul** obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în identificarea donatorilor de germoplasmă valoroasă pentru programele de ameliorare a rezistenței porumbului la ciuperci în baza metodei PCR.

**Semnificația teoretică:** a fost studiat impactul factorilor abiotici și al genotipului de porumb asupra dinamicii fungice în câmpurile experimentale de porumb și germoplasma stocată, analiza calitativă și cantitativă a principalelor ciuperci producătoare de micotoxine din boabele de porumb, corelația dintre acumularea de micotoxine și numărul de grupuri de gene asociate producției de micotoxine, polimorfismul ADN-ului de porumb.

**Valoarea aplicativă:** aplicarea markerilor moleculari și protocoalelor PCR pentru monitorizarea fungilor patogenici și toxigenici în culturi agricole și produse alimentare.

**Implementarea rezultatelor:** A fost testată germoplasma de porumb din Banca de gene a IGFPP și au fost selectate genotipuri de perspectivă pentru programele de ameliorare , rezultatele au fost prezentate la conferințe științifice naționale și internaționale, publicate în reviste științifice.

## Аннотация

**Грэждиеру Кристина, «Молекулярно-генетическая идентификация генотипов кукурузы (*Zea mays* L.) устойчивых к грибковым патогенам», диссертация на соискание степени доктора биологических наук, Кишинэу, 2024.**

**Структура:** введение, 4 главы, выводы и рекомендации, список литературы из 236 ссылок, 116 страниц основного текста, 48 рисунков, 14 таблиц, 2 приложения, заявление о личной ответственности, CV. Результаты опубликованы в 21 научных работах.

**Ключевые слова:** ПЦР, кукуруза, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, микотоксины

**Цель:** разработка метода ПЦР для оценки восприимчивости кукурузы к грибковым патогенам родов *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium* для выявления ценной зародышевой плазмы с целью селекции по признакам устойчивости к грибковым болезням.

**Задачи:** тестирование набора праймеров, разработанных *de novo* для идентификации патогенных и токсигенных грибов, оценка фитосанитарного статуса экспериментальных полей кукурузы и зародышевой плазмы кукурузы, хранящейся в банке генов ИГФЗР, оценка эффективности маркеров на основе мобильных элементов для генотипирования кукурузы.

**Научная новизна:** были проанализированы образцы кукурузы из коллекции ИГФЗР и выявлены генотипы с повышенной устойчивостью к грибковым патогенам.

**Вклад работы в решение научных задач** состоит в выявление ценной зародышевой плазмы для программ селекции кукурузы на устойчивость к грибам на основе метода ПЦР.

**Теоретическое значение:** были изучены влияние абиотических факторов и генотипа кукурузы на динамику грибов на кукурузных полях и в хранимой зародышевой плазме, качественный и количественный анализ основных грибов-продуцентов микотоксинов в зерне кукурузы, корреляция между накоплением микотоксинов и количеством кластеров генов, связанных с продукцией микотоксинов, ДНК-полиморфизм кукурузы.

**Практическое применение:** использование молекулярных маркеров и протокола ПЦР для мониторинга патогенных и токсигенных грибов в сельскохозяйственных и пищевых продуктах.

**Внедрение результатов:** Проведена апробация гермаплазмы кукурузы из банка генов ИГФЗР и отобраны перспективные генотипы для селекционных программ устойчивости, результаты представлены на республиканских и международных научных конференциях, опубликованы в научных журналах.

## Annotation

**Grajdieru Cristina, “Molecular identification of maize (*Zea mays* L.) genotypes resistant to fungal pathogens”, PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2024.**

**Structure:** introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, bibliography of 236 entries, 116 pages of body text, 48 figures, 14 tables, 2 appendices, personal responsibility declaration, CV. The results are published in 20 scientific papers.

**Keywords:** PCR, maize, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, mycotoxins.

**Scope:** developing a PCR-based approach for assessing maize susceptibility to fungal pathogens of *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera and selecting germplasm of interest for ameliorating maize resistance to fungal diseases.

**Objectives:** testing a set of primers designed *de novo* for identifying pathogenic and toxigenic fungi associated with maize diseases, assessing the phytosanitary status of experimental cornfields and maize germplasm stocked in Gene bank of, assessing the efficacy of markers based on mobile genetic elements for maize genotyping.

**Scientific novelty:** maize samples from the active collection of IGPPP were analyzed and genotypes with increased resistance to fungal pathogens were identified.

**The contribution** of the work to the solution of scientific problem is the identifying donors of valuable germplasm for maize breeding programs of resistance to fungi using PCR assays.

**Theoretical significance:** the impact of abiotic factors and maize genotype on fungal dynamics in cornfields and stored germplasm, qualitative and quantitative analysis of the main mycotoxin-producing fungi in maize grain, correlation between mycotoxin accumulation and number of gene clusters associated with mycotoxin production, maize DNA-polymorphism was studied.

**Practical application:** application of specific primers and PCR protocol for monitoring pathogenic and toxigenic fungi in agricultural and food products.

**Implementation of the results:** maize germplasm from Gene bank of IGPPP was tested and perspective genotypes were selected for breeding programs of resistance, results were presented on national and international scientific conferences, published in scientific journals.

### **Lista abrevierilor**

**PCR** – polymerase chain reaction

**qPCR** – quantitative polymerase chain reaction

**CIMMYT** - Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

**IITA** - International Institute of Tropical Agriculture

**FER** – Fusarium ear rot

**GER** – Gibberella ear rot

**MAS** – marker assisted selection

**GWAS** - Genome-wide association studies

**MIP** - Maize Improvement Program

**NGS** - Next-Generation Sequencing

**NIL** – near-isogenic lines

**SNP** – single nucleotide polymorphism

**DArT** – diversity arrays technology

**SFEC** - spectrofotometru

**QTL** – quantitative trait loci

**WGCNA** - Weighted correlation network analysis

**LC-MS-MS** - Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry

**RIL** - Recombinant Inbred Line

**AMP** - Adenosine monophosphate

**MAGIC** - multiparent advanced-generation intercross population

**WGCNA** - weighted gene co-expression network analysis

**HIGS** - Host-Induced Gene Silencing

**GO** - Gene ontology

**KEGG** - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**HPLC** - High Performance Liquid Chromatography

**NIV** - nivalenolă

**DON** - deoxinivalenolă

**ZEN** - zearalenonă

**AFLA** - aflatoxină

**GSR** – Gibberella stalk rot

**RTE** – Retrotransposable elements

**SLB** - Southern leaf blight



**NLB** - Northern leaf blight

**TMT** – tandem mass tag

**CAP** – Cluster Amplification Patterns

## Introducere

**Actualitatea și importanța temei.** Porumbul este una dintre cele trei culturi de cerealiere care satisfac nevoile alimentare ale omului. În unele regiuni din Asia și Africa, această cultură reprezintă principalul aliment de bază, iar pierderile semnificative ale producției de porumb pot provoca foamete. Ținând cont de proprietățile sale nutritive valoroase și domeniul versatil în cazul utilizării ca hrană, furaj, sursă de ulei și biocombustibil, medicamente este important să se satisfacă nevoile economice ale populației prin dotarea pieței cu genotipuri de porumb care posedă trăsături de interes agricol. Prin urmare, cultura în sine rămâne subiectul multor programe de ameliorare care se concentrează în principal pe obținerea de soiuri care cuprind productivitate ridicată și rezistență la stresul biotic și abiotic. În contextul importanței ameliorării porumbului pentru asigurarea necesităților alimentare a populației umane au fost organizate centre specializate în obținerea genotipurilor productive și rezistente la anumiți factori de mediu. În scopul ameliorării caracterelor valoroase un rol important joacă formele locale de porumb. Centrul Internațional de Ameliorare a Grâului și Porumbului (CIMMYT) a stabilit ca obiectiv principal obținerea genotipurilor de porumb rezistenți la secetă și stres termic [1]. Programul de ameliorare a companiei Stine Seed (SUA) pune la baza cercetărilor perfectarea productivității porumbului prin obținerea genotipurilor cu perioada de vegetație scurtă [2]. Institutul Internațional de Agricultură Tropicală (IITA) a lansat programul de ameliorare a porumbului MIP cu scopul furnizării populației din Africa Centrală și Africa de Vest cu germoplasmă obținută prin metode convenționale de ameliorare, productivă și rezistentă la factorii biotici și abiotic, cum sunt: boli, dăunători, secetă, fertilitatea solului [3]. În Republica Moldova, Institutul de Fitotehnie „Porumbeni” este specializat în îmbunătățirea calităților și productivității porumbului, care la moment dispune de mii de genotipuri de porumb valorase [4]. În cadrul Laboratorului Resurse genetice vegetale (IGFPP) fost înființat Banca de gene, care își pune în calitate de una din problemele de bază conservarea in situ a agrodiversității vegetale din Republica Moldova [5]. Actual, colecția de lucru al laboratorului cuprinde diferite specii de plante care prezintă interes economic sporit pentru agricultură, inclusiv porumbul. Prin evaluarea caracterelor cantitativi și calitativi s-au evidențiat genotipuri de perspectivă cu productivitate sporită și grad diferit de susceptibilitate la principalii patogeni fungici, iar colecția de genotipuri locale de porumb prezintă interes special ca sursă de germoplasmă valoroasă pentru utilizarea în programele naționale de ameliorare și necesită studiere aprofundată cu utilizarea metodelor moderne. Deoarece porumbul este atacat de o gamă largă de agenți patogeni, printre care ciupercile prezintă un interes deosebit ca agenți cauzali ai bolilor porumbului în timpul vegetației și al deteriorării boabele în facilități de

depozitare, elucidarea trăsăturilor porumbului asociate cu rezistența la aceste microorganisme este de mare importanță practică și una dintre principalele direcții de cercetare.

**Realizări actuale în domeniul cercetării.** Numeroase specii de ciuperci infectează porumbul, unele dintre ele induc boli devastatoare în timpul vegetației plantelor, în timp ce altele sunt asociate cu alterarea boabelor aflate în depozitare. O parte semnificativă din aceste pierderi sunt asociate cu ciuperci filamentoase din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*. Ciupercile din genul *Fusarium* sunt cele mai frecvente cauze ale bolilor de putrezire a știuleților și a boabelor de porumb. Fuzarioza este cunoscută de mult timp, impactul său economic negativ este sporit de lipsa de cunoștințe despre rezistența genetică specifică porumbului la ciupercile *Fusarium*, ceea ce împiedică obținerea de soiuri de porumb rezistent pentru acești agenți patogeni. Speciile *Aspergillus* sunt agenți patogeni oportuniști fără specializare de gazdă și frecvent izolate ca contaminanți alimentari. Doar un număr limitat de specii de *Aspergillus* sunt capabile să invadeze țesuturile vii ale plantelor, în timp ce majoritatea speciilor sunt mușegai de depozitare pe produse vegetale. Sub anumite condiții speciile de *Aspergillus* pot provoca putrezirea știuleților și deteriorarea boabelor pe parcursul depozitării. Putregaiul știuleților de asemenea poate fi cauzat de multiple specii din genul *Penicillium*. Fungii dați prezintă un pericol deosebit pentru boabele de porumb aflate în depozitare. Aceste trei genuri cuprind majoritatea speciilor-producători de micotoxine – metaboliți secundari cu proprietăți toxice pentru animale și oameni. Printre efectele fiziologice adverse ai acestor compuși sunt numiți toxicitate acută, efect imunosupresant, nefrotoxicitate, inducerea formării tumorilor maligne, neutoxicitate. Micotoxinele reprezintă o problemă economică serioasă, iar porumbul este una dintre cele trei culturi cel mai frecvent afectate de micotoxine. Agricultură modernă oferă diverse tehnologii de cultivare a porumbului care diminuează impactul negativ al ciupercilor patogene asupra acestei culturi, inclusiv rotația culturilor, pesticide eficiente, compoziții active fiziologic, agenți de control biologic și multe altele. Cu toate acestea, nu se observă semne că zona de invazie cu *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* scade, în timp ce micotoxinele rămân un pericol emergent la nivel mondial.

Obținerea de genotipuri rezistente de plante de cultură este cea mai promițătoare strategie de gestionare a bolilor în lanurile de porumb, deoarece oferă posibilitatea de a obține o productivitate semnificativă economic fără a provoca daune grave ecosistemului. Acesta din urmă rezultă din utilizarea minimă a fungicidelor și îngrășămintelor, ceea ce permite conservarea biodiversității naturale, reducerea poluării apei și a solului. Pe termen lung, are un impact benefic în special asupra sănătății umane. Cu toate acestea, această abordare este împiedicată de lipsa cunoștințelor aprofundate asupra bazei genetice a rezistenței porumbului la speciile de ciuperci din

genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* care provoacă micoze și alterarea boabelor. Deocamdată, doar două gene R din porumb sunt identificate și clonate. Studii recente oferă date despre un număr de loci QTL asociate cu rezistența porumbului la ciupercile *Fusarium* și *Aspergillus* și acumularea de micotoxine. Rolul lor în formarea rezistenței cantitative la ciupercile respective în porumb este diferit – unul dintre ele are un efect major, în timp ce alții au o semnificație mai mică. De asemenea, interacțiunea și contribuția lor reciprocă în asigurarea rezistenței la ciupercile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*, precum și acumularea de micotoxine, este în mare parte puțin cunoscută, iar performanța lor este afectată semnificativ de factorii de mediu, care activează asupra plantei-gazdă. În consecință, este imposibil să se efectueze screening-ul preliminar al germoplasmei de porumb pentru a selecta genotipuri rezistente, deoarece nu există date despre genele R asociate cu rezistența calitativă la aceste ciuperci. Prin urmare, încorporarea mai multor QTL cu semnificații diferite pentru formarea rezistenței se dovedește a fi o sarcină dificilă, mai ales atunci când ameliorarea vizează mai multe trăsături calitative de interes. În acest sens, o modalitate eficientă de identificare a genotipurilor de porumb de interes pentru ameliorarea rezistenței la ciuperci rămân testările în câmp și testele de laborator.

Cuantificarea rezistenței porumbului se bazează, de obicei, pe evaluarea propagării ciupercilor în planta gazdă la momente diferite în funcție de diferiți factori externi. Această abordare presupune o identificare robustă și precisă a agenților patogeni din probele de plante. Obiectivul este îndeplinit prin metode convenționale, care includ evaluarea simptomelor bolii la plante și identificarea agenților patogeni fungici pe baza criteriilor morfologice și biochimice. Dar aplicarea lor este stânjenită de unele dificultăți: mulți fitopatogeni provoacă simptome similare, iar manifestarea acestora poate să difere în dependență de factori de mediu, faza de vegetație și starea fiziologică a plantei; la etapele inițiale a procesului infecțios deseori nu manifestă simptome distincte; metodele microbiologice și biochimice necesită încăperi speciale și aparataj pentru cultivarea patogenilor, ce presupune luarea măsurilor de siguranță adiționale pentru prevenirea contaminăției, și sunt durabile; unele specii de fitopatogeni au caractere morfologice și profiluri biochimice similare și nu sporulează pe medii nutritive. Mai mult, tulpinile de ciuperci producătoare de micotoxine nu pot fi discriminate de tulpinile netoxigenice numai după trăsăturile morfologice. Dificultățile menționate mai sus sunt depășite prin utilizarea metodelor moleculare bazate pe reacția PCR. Metoda PCR se bazează pe utilizarea secvențelor genomice ca markeri moleculari pentru identificarea ciupercilor. În prezent, baza de date GenBank oferă o cantitate semnificativă de secvențe genomice, care permit identificarea ciupercilor la diferite niveluri taxonomice. Prin urmare, testele bazate pe PCR sunt eficiente ca instrumente de diagnostic,

deoarece folosesc trăsături genomice care sunt stabile și ereditare, iar cultivarea fungilor pe medii artificiale nu este esențială.

**Scopul lucrării:** elaborarea de metode rapide și precise pentru evaluarea susceptibilității porumbului la agenții patogeni fungici în scopul selectării germoplasmei valoroase ca material de bază pentru programele de ameliorare a porumbului bazate pe rezistența la ciuperci din genurile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

**Obiectivele:**

- testarea specificității primerilor proiectați la secvențele genelor de menaj și a clusterilor de gene din genomul fungic care codifică enzime implicate în căile de biosinteză ale diferitelor clase de micotoxine;
- optimizarea protocoalelor PCR convențională și qPCR pentru identificarea eficientă a speciilor patogene și discriminarea ciupercilor producătoare de principalele clase micotoxine, cantitatea cărora este reglementată de legislația în vigoare a Republicii Moldova și UE;
- evaluarea ratei generale de infestare a câmpurilor experimentale de porumb ale IGFPP și germoplasma de porumb stocată în Banca de gene cu ciuperci patogene pentru evaluarea riscurilor fitosanitare asociate cu exploatarea materialului vegetal contaminat;
- Evaluarea impactului genotipului și factorilor de mediu asupra acumulării fungilor în plante de porumb;
- Identificarea fungilor toxigenici în baza secvențelor genomice implicate în sinteza principalelor clase de micotoxine și evaluarea riscului fitosanitar a materialului semincer;
- Analiza corelației dintre prezența secvențelor genomice asociate cu sinteza micotoxinelor și cantitatea micotoxinelor prezenți în plantă.
- Identificarea genotipurilor de interes pentru programele de ameliorare a rezistenței porumbului la fitopatogeni fungici;
- Analiza polimorfismului genotipurilor de porumb în baza markerilor derivați din secvențele elementelor mobile caracteristice genomul plantelor și identificarea secvențelor de interes cu perspectivă de elaborare a sistemului de markeri linkați de caracterele de rezistență a porumbului la boli fungice.

**Ipoteza de cercetare.** Combaterea bolilor sistemice la plante se bazează pe acțiunea componentelor de rezistență constitutivă și indusă, care împiedică pătrunderea patogenului și propagarea lui în plantă-gazdă. Astfel, analiza frecvenței și dinamicii acumulării fungilor în organele diferitor soiuri și linii de porumb sub acțiunea uniformă a factorilor mediului extern

permite de a concluziona despre gradul de rezistență și susceptibilitate a genotipurilor de porumb analizate.

**Calitatea științifică, potențialul de inovare și valoarea rezultatelor.** Conceptul de studiu actual se bazează pe date științifice relevante privind monitoringul agenților patogeni în culturi folosind metode moleculare. Potențialul de inovare cuprinde tentativa de evaluare a germoplasmei de porumb stocate în Banca de gene a IGFPP pentru identificarea donatorilor de rezistență la ciuperci din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* utilizând teste pe bază de PCR. Obiectivele atinse vor contribui la lărgirea cunoștințelor științifice și tehnologice privind diseminarea și evaluarea ciupercilor patogene în câmpurile de porumb și facilități de depozitare. Primerii și protocoalele PCR pot fi recomandate diviziunilor naționale fitosanitare și centrelor de control al siguranței alimentelor pentru evaluarea riscurilor emergente de contaminare a culturilor și a produselor derivate din cereale cu ciuperci patogene și toxigene, precum și divizii științifice specializate în domeniile de microbiologie, ecologie și fitopatologia plantelor.

**Metodologia.** Pentru realizarea sarcinilor stabilite au fost aplicate metode moleculare validate în baza reacției PCR (nested-PCR, multiplex-PCR, qPCR) cu primeri specifici pentru identificarea fitopatogenilor la nivel de gen, specie, rasă. Reacția în lanț a polimerazei (PCR) este o metodă utilizată pe scară largă în biologia moleculară pentru a genera rapid multe copii ale unei secvențe specifice de ADN, permițând identificarea ciupercilor de interes folosind primeri sintetici specifici genomului fungic. Nested-PCR are ca scop creșterea specificității amplificării prin reducerea sintezei de ampliconi nespecifici. Două seturi de primeri sunt utilizate în două reacții PCR succesive. În prima reacție, o pereche de primeri este utilizată pentru a genera produse ADN, care, pe lângă ținta dorită, pot consta în continuare din fragmente de ADN amplificate nespecific. Produsele amplificării sunt apoi utilizate într-o a doua rundă de PCR cu un set de primeri ale căror situsuri de legare sunt complet sau parțial diferite și sunt situate la capătul 3' al fiecăruia dintre primerii utilizați în prima reacție. PCR cantitativă (qPCR) este utilizată pentru a măsura cantitatea unei secvențe-țintă. PCR cantitativă are un grad foarte ridicat de precizie și presupune folosirea de coloranți fluorescenți, precum Sybr Green, EvaGreen sau sonde ADN care conțin fluorofor (TaqMan), pentru a măsura cantitatea de produs amplificat în timp real. Datele au fost procesate prin metode matematice și statistice, pe baza lor fiind efectuată concluzionarea referitor la gradul de rezistență a plantelor de porumb în dependență de factori genetici (particularitățile genotipului) și factori de mediu (componența microflorei patogene a solului, impactul factorilor climatici).

**Sumarul capitolelor.** Capitolul I descrie reperele conceptuale în studierea rezistenței porumbului la cele mai importante ciuperci *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*. Este descrisă

biologia și patogenitatea principalilor agenți cauzali ai bolilor infecțioase ale porumbului și a alterării boabelor în timpul depozitării. Sunt evidențiate principalele clase de micotoxine asociate cu porumb, rolul lor în ecologia fungică și impactul asupra sănătății umane și animale. De asemenea, sunt rezumate realizările actuale ale studiilor moleculare în rezistența specifică a porumbului la ciupercile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* și acumularea de micotoxine. Capitolul II cuprinde metodele de prelevare a probelor de plante și sol, extracția și purificarea ADN-ului, protocoale PCR într-o etapă, nested-PCR și qPCR, protocolul ELISA pentru extracția și cuantificarea micotoxinelor, analiza statistică a datelor obținute (testele ANOVA și Student, descriptorii pentru analiza markerilor moleculari, clusterizarea datelor). Capitolul III relatează despre eficacitatea setului de primeri testat și protocoalele de identificare prin PCR a ciupercilor patogene *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*. În Capitolul IV sunt reprezentate datele despre starea fitosanitară a câmpurilor experimentale de porumb și a solului, impactul genotipului abiotic și al porumbului asupra acumulării de ciuperci patogene în plante, corelația dintre cantitatea genelor asociate cu biosinteza micotoxinelor și a concentrațiilor reale ale diferitelor micotoxine din boabele de porumb. De asemenea, sunt reprezentate rezultatele genotipării moleculare și elucidate genotipurile de porumb de interes pentru utilizarea în programele de ameliorare a rezistenței la infecții fungice.

**Diseminarea rezultatelor.** Rezultatele au fost prezentate în cadrul manifestărilor științifice naționale și internaționale: Conferința științifică națională cu participare internațională „Știința În Nordul Republicii Moldova: Probleme, Realizări, Perspective”, 2020; conferința științifică a doctoranzilor ”Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni Ale Tinerilor Cercetători, Chișinău, 2020; al XI-lea Congres Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Chișinău, 2021; a III-a Conferință Științifică Internațională „Tendințe în dezvoltarea agrofizicii: de la problemele actuale ale agriculturii și producției vegetale la tehnologiile viitorului”, Sankt-Petersburg, Rusia, 2021; conferința științifică națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: Probleme, Realizări, Perspective”, ediția V, 2021; conferința științifică națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective” (ediția a șasea ), Bălți, 20-21 mai 2022; conferința științifică națională cu participare internațională „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community”, Chișinău, 29-30 septembrie 2022; simpozionul internațional ”Advanced Biotechnologies - Achievements and Prospects” (VI<sup>th</sup> Edition), Chișinău, 3-4 octombrie 2022; conferința națională cu participare internațională ”Știința în nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective” (ediția a

șaptea), Bălți, 19-20 mai, 2023. Rezultatele obținute au fost folosite pentru pregătirea studenților în cadrul cursurilor practice de genetică moleculară (2023) și publicate în reviste științifice și în culegerile conferințelor naționale și internaționale.



# 1. Principalele boli fungice la porumb: agenți cauzali, patogeniza și bazele moleculare ale rezistenței plantelor. Metode de evaluare ale rezistenței porumbului la fuzarioze, aspergiloze și peniciloze

## 1.1. Impactul economic al fungilor din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* asupra culturii de porumb

Pe lângă grâu și orez porumbul este una din principalele culturi cerealiere, care asigură alimentația umană pe plan mondial [6]. Pierderi semnificative de recoltă sunt asociate cu boli infecțioase, la care porumbul este susceptibil [7]. Cultura dată este atacată de un șir larg de fungi filamentoși, dintre care un interes deosebit se acordă genurilor *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* [8-10]. Ele cuprind atât patogeni obligați, cât și patogeni oportuniști și speciile asociate, în principal, cu deteriorarea boabelor și silozului pe parcursul depozitării. Fungii din aceste genuri atacă porumbul la nivel mondial la toate etapele de dezvoltare și provoacă pierderi semnificative de recoltă, ce duc la foamete în regiunile unde porumbul reprezintă principala sursă de alimentare și furaj [11-17]. Pentru regiunile africane acești fungi prezintă un pericol deosebit: incidența procentuală a diferitelor genuri izolate din porumb din Africa de Sud a relevat predominanța speciilor din genurile *Fusarium* (82%), *Penicillium* (63%) și *Aspergillus* (33%) comparativ cu alte genuri [18]; analiza boabelor de porumb din Tunisia a determinat, că speciile predominante au fost *Aspergillus spp.* (76%) și *Penicillium spp.* (38%), speciile din genurile *Aspergillus*, *Fusarium* și *Penicillium* au fost identificate atât în boabele colectate de pe câmp, cât și cele depozitate [19].

Genul *Fusarium* este eterogen și asociat în primul rând cu agenții cauzali ai fuzariozelor la plantele de cultură și animale [20]. Clasificarea speciilor din genul *Fusarium* este destul de complicată și până în recent se bazează pe caractere morfologice [21]. Cercetările moleculare în baza polimorfismului genei subunității ARN-polimerazei II au permis gruparea fungilor din genul dat în patru complexe de specii [22]:

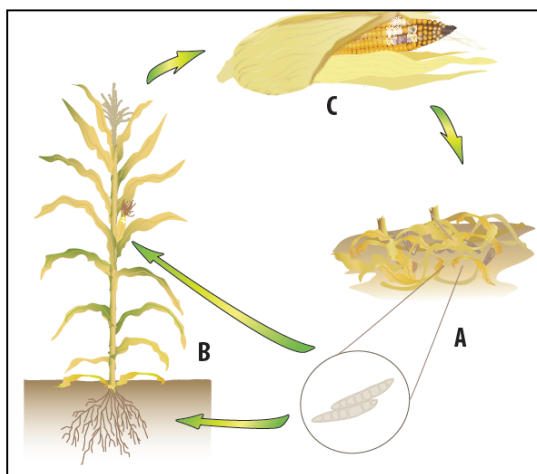
- Complexul de specii *Fusarium fujikuroi* (FFSC) – fungii din acest complex cauzează fuzariozele la diferite plante de cultură [23]. La porumb ele sunt responsabile pentru putregaiul știuleților, boabelor, răsadului, cauzate predominant de speciile tipice *F. proliferatum* și *F. verticillioides* [23];
- Complexul de specii *Fusarium graminearum* (FGSC) – cea mai semnificativă specie din acest complex este *F. graminearum*, care cauzează putregaiul roșu la porumb și fuzarioze la mai multe culturi cerealiere [24]. De asemenea, pagube

semnificative sunt cauzate și de *F. culmorum*, care tot aparține acestui complex de specii [25];

- Complexul de specii *Fusarium oxysporum* (FOOSC) – fungii din acest complex sunt considerați agenții cauzali ai ofilirii vasculare și putregaiul rădăcinilor [26]. Specia tipică este *F. oxysporum* cu un spectru larg de plante-gază, la porumb se asociază cu putregaiul rădăcinilor și răsadului [27]. Cuprinde un șir larg de saprotrofi [28]. Speciile din acest complex nu sunt considerate producători semnificativi de micotoxine [29,30];

- Complexul de specii *Fusarium solani* (FSSC) – speciile din acest complex, îndeosebi specia tipică *F. solani*, sunt asociate cu putregaiurile rădăcinilor la mai multe culturi agricole, în special cele leguminoase [31]. Fungii dați nu provoacă pierderi semnificative la porumb și contaminarea producției cu micotoxine, însă unii din ei pot fi patogeni pentru oameni și animale [32].

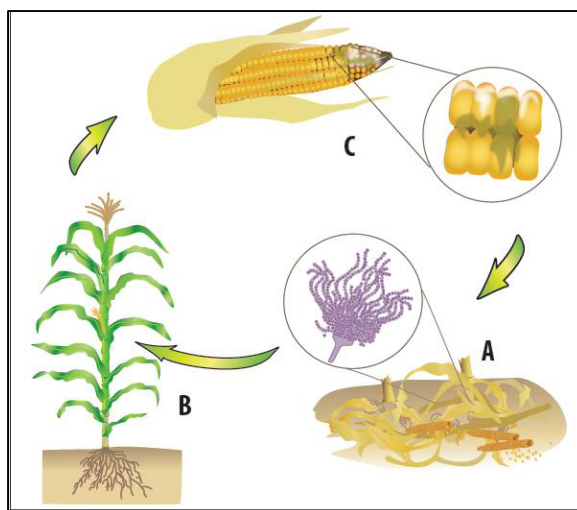
La porumb *Fusarium spp.* provoacă putregaiul organelor vegetative și generative la diverse stadii ontogenetice [33]. În general, acest gen cuprinde atât specii înalt patogene (*F. graminearum*, *F. verticillioides*), cât și patogeni oportuniști și nespecifici de plante-gază (*F. equiseti*, *F. sporotrichioides* etc) [34]. Fungii fac parte din microbiomul solului (Fig. 1.1) și pot infecta porumbul pe diferite căi [35].



**Fig. 1.1. Ciclul de viață al *Fusarium spp.* (din [36]): A – inocuul de *Fusarium* supraviețuiește în reziduu vegetal; B – conidiile infectă porumbul prin stigmat și/sau răni și rădăcini; C – pe boabe apare miceliul patogenului**

Principalele pagube sunt asociate cu fuzariozele știuleților care prezintă două boli distincte cu patogeneză specifică, provocate de diferiți agenți cauzali. Putregaiul știuleților GER (Gibberella ear rot), sau putregaiul roșu al știuleților, inițiază din vârful știuleților și formează un miceliu roșu sau roz care acoperă o mare parte din știulete; de obicei, este cauzat de *F. graminearum*, deși în Europa mai multe specii de *Fusarium* pot fi asociate cu această boală, în special, *F. culmorum* [37]. Putregaiul GER predomină în zonele mai temperate sau în cele cu precipitații mai mari în timpul sezonului de vegetație [38]. Altă boală importantă, putregaiul FER (Fusarium ear rot) predomină în regiuni mai aride comparativ cu *F. graminearum* [39], apare de obicei pe boabe aleatorii, grupuri de boabe sau pe boabe rănite fizic și se caracterizează prin apariția unui mucegai alb sau roz deschis [40]. Simptomele identice sunt cauzate de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* și *F. subglutinans*, dar ocazional alte specii de *Fusarium* din complexul de specii *Gibberella fujikuroi* sunt asociate cu aceste simptome [41]. În China printre agenții cauzali ai FER au fost raportați speciile *F. miscanthi* [42], *F. asiaticum* [43]. Toți patogenii majori ce provoacă FER și GER la porumb sunt micotoxigenice [44]. Printre agenții cauzali de fuzarioze, *F. verticillioides* este cel mai des identificat pe câmpurile de porumb [45]. Incidența *Fusarium spp.* în boabe de porumb variază semnificativ între ani și locații în multe zone geografice, iar pierderile de roadă cauzate de acești fungi pot varia între 10-50% în dependența de zona de cultivare și starea fitosanitară a câmpurilor [39].

Fungii din genul *Aspergillus* pot fi microorganisme benefice [46] sau dăunătoare, care cresc predominant pe vegetația în stadiu de descompunere. Spre diferență de speciile patogene de *Fusarium*, speciile de *Aspergillus* sunt agenți patogeni oportuniști fără specializare de plantă-gazdă și sunt adesea izolați ca contaminanți alimentari [47]. Majoritatea speciilor sunt asociate cu deteriorarea roadei în timpul depozitării [48]. Contaminarea produselor cu fungii respectivi duce la diminuarea calităților nutritive. Deși sub anumite condiții aspergiloza știuleților poate duce la pierderi semnificative de roadă, cea mai notabilă consecință a infestării plantei cu fungii *Aspergillus* este contaminarea cu micotoxine [13]. Speciile de *Aspergillus* asociate cu bolile porumbului au un ciclu similar de dezvoltare (Fig. 1.2.).



**Fig. 1.2. Ciclul de viață al *Aspergillus* spp. (din [49]): A – inocuul de *Aspergillus* supraviețuiește în reziduu vegetal și sol; B – conidiile pătrund în știuleți prin intermediul vântului și insectelor; C – pe boabe apare miceliul fungului**

Genul *Aspergillus* cuprinde unii printre cei mai abundenți și răspândiți fungi de pe pământ, cu un număr total de 339 de specii cunoscute repartizate în 4 subgenuri și 19 secțiuni, printre care cea mai importantă din punct de vedere agroecologic și economic este secțiunea *Flavi* [50]. Specia tipică este *A. flavus*, un fung cosmopolit care este deseori găsit în agroecozisteme și facilități de depozitare [51]. El contaminează mai multe plante de cultură, îndeosebi cele cu conținut ridicat de uleiuri: porumb, bumbac, arahide și altele [52]. Este comun pentru zonele tropicale și subtropicale, se dezvoltă în intervalul temperaturilor 16-35°C și astfel zona lui de răspândire cuprinde o mare parte a ariei mondiale de cultivare a porumbului, iar schimbările climatice duc la lărgirea continuă a zonei de propagare a *A. flavus* [53]. Specia *A. flavus* colonizează porumbul mai ales în condiții de stres hidric și temperaturi ridicate, această specie este caracteristică mai mult zonelor tropicale, cu toate acestea, din cauza schimbărilor climatice, ea este considerată o problemă emergentă în mai multe zone ale Europei [13,14,16,17]. Aspergiloza știuleților se manifestă prin mucegai de culoare verde-gălbui, care inițiază la vârful știuletelui și este cauzată în primul rând anume de *A. flavus* [13]. Speciile din genul *Aspergillus* asociate cu putregaiul știuleților au capacitatea de a pătrunde în boabele premature pe calea mătăsii, ocolind astfel bariera naturală a pănușilor [54]. Mătăsurile prezintă un țesut apos, moale și bogat în substanțe nutritive. Ele sunt protejate de pănuși, dar în timpul înfloririi sunt expuse mediului extern. Astfel, ele pot servi drept ca medietori

pentru fungii patogeni și uși ale infecției. Mătășurile sunt cele mai sensibile la infecțiile fungice timp de 4 până la 6 zile după polenizare; fungul *A. flavus* necesită circa 13 zile pentru a pătrunde prin stigmată către boabe [54]. Susceptibilitatea mătășii este influențată de genotipul plantei și condițiile de mediu. Culoarea mătășii (verde-galben, galben-marou și marou) a fost folosită ca criteriu morfologic pentru evaluarea rezistenței la infecțiile fungice și s-a dovedit că stigmatăle de culoarea galben-marou sunt asociate cu mai intensivă propagare a fungilor. Sporii pot supraviețui pe mătășurile tinere, dar *A. flavus* crește mai viguros după polenizare când mătășurile încep să senesceze. Susceptibilitatea ridicată a mătășurilor de culoare galben-marou se poate datora faptului că mătășurile au apărarea diminuată la senescență, dar păstrează totuși suficienți nutrimente pentru dezvoltarea fungilor [54]. Prin mătase fungul colonizează boabele. Bobul prematur (faza lapte, lapte-țeară) este cel mai susceptibil la infecția de *Aspergillus spp* [54]. Temperaturile ridicate și umiditatea redusă a aerului împreună cu rănilă cauzate de insecte și păsări favorizează colonizarea știuletelui. În sol supraviețuiește în formă de conidii sau scleroții, ultimele pot supraviețui în sol în condiții severe timp de mai mulți ani și produce conidii [55]. Specia *A. flavus* poate produce scleroții de două tipuri, și în baza acestui criteriu se deosebesc două grupe a fungului dat: rasa L, care produce scleroții mai mari de 400 mm în diametru (Grupa I) și rasa S, care produce scleroții mai mici de 400 mm în diametru (Grupa II) [55]. Ambele rase (grupe) sunt asociate cu contaminarea plantelor de cultură, dar se deosebesc prin profilul micotoxigenic: rasa S poate produce aflatoxinele G1 și G2 și este mai larg răspândită [55]. Diferența în profilurile toxigenice este asociată cu grupuri de compatibilitate vegetativă [55]. O altă specie importantă din secțiunea *Flavi* este *A. parasiticus* [56]. Ciclul de viață a fungului dat are mult în comun cu *A. flavus*, însă este mai specific rizosferei plantelor [13]. Fungul cauzează putregaiul știuleților în condiții de câmp și este asociat cu contaminarea boabelor cu aflatoxine în mai multe regiuni și produse alimentare derivate din porumb [57–59].

Genul *Penicillium* cuprinde circa 350 de specii de fungi cosmopoliți răspândiți pe larg în agrocenoze și cu posibilitatea de a propaga pe diverse medii [60]. Fungii din genul *Penicillium* sunt caracterizate prin nespecificitate față de plantă-gazdă și ciclul de viață saprotrofic, însă pot infecta porumbul în decurs de vegetație [61]. Peniciloza știuleților este provocată de mai multe specii din genul *Penicillium* și se caracterizează printr-un mușgai albastru-verzui, care inițiază la vârful știuletelui [62]. Fungii infestază organele plantei traumatizate de insecte sau alți factori de mediu și deseori apar în ansamblu cu alte specii din genurile *Fusarium* și *Aspergillus* [63]. *Penicillium spp.* poate infesta și lăstarii de porumb, ce duce la retardarea creșterii, însă este asociat în primul rând cu deteriorarea boabelor pe parcursul depozitării, când umiditatea boabelor este mai

mare de 18% [64]. Mai multe specii de *Penicillium* infestază boabele de porumb, provoacă deteriorarea ulterioară și contaminarea cu micotoxine. Printre cei mai semnificativi agenți cauzali ai penicilozelor sunt numiți *P. oxalicum*, *P. funiculosum*, *P. hordei*, *P. verrucosum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum* [61,65,66]. Speciile *P. oxalicum* și *P. funiculosum* sunt adesea identificate în boabe în condiții de câmp, iar alte specii sunt asociate cu infecțiile de depozitare. Specia *P. oxalicum* infestază suprafața bobului, însă poate coloniza pericarpul și endospermul. Fungul poate infecta și răsadul porumbului, vectorul infecției fiind boabele infestate în camere de depozitare. Specia *P. expansum* poate propaga la temperaturi scăzute, ce necesită regim special de prezervare a boabelor [60]. Fungul dat este unul dintre principalii producători de patulină [67].

Astfel, fungii din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* pot provoca atât boli sistemice la porumb, cât și așa numite boli de depozitare, care duc la pierderi semnificative de roadă. Însă principalul pericol este asociat cu faptul, că genurile date cuprind majoritatea speciilor toxigenice, care produc diferite micotoxine și contaminează producția agricolă cu metaboliți toxici.

Micotoxinele prezintă metaboliți secundari produse sub anumite condiții de fungi filamentoși, care au un efect negativ asupra organismului uman și animal [68]. Ele aparțin diferitor clase de compuși chimici, cele mai importante micotoxine fiind considerate aflatoxinele, fumonisinele, tricotecenele, patulina [69]. Consumul lor în cantități mici provoacă diverse dereglări ale metabolismului de la toxicoze acute până la cancerogeneză și din acest motiv cantitatea acestor substanțe în produse alimentare este strict reglementată în mai multe țări (Tab. 1. 1).

**Tabelul 1.1. Principalele clase de micotoxine produse de *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* și valorile CMA ale acestora în produse alimentare**

Micotoxine	Specii producătoare	Efectul fiziologic la oameni	CMA în produse destinate alimentației umane
Aflatoxine (AF)	<i>Aspergillus spp.</i>	Toxicoze acute, neurotoxicitate, cancer gastrointestinal, hepatocarcinomă, cancer mamar, adenocarcinome [48,70]	4 ppb, UE [71] 0,5-20 ppb, SUA [71] 0,1-15 μg/kg, RM [72]
Fumonisine (F)	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Toxicoze acute, cancer esofagian [73]	2000-4000 μg/kg, Codex Alimentarius Commission [74]. 200-4000 μg/kg, UE, FDA [75]. 200-4000 μg/kg, RM [72]
Deoxinivalenola (DON)	<i>Fusarium spp.</i>	Toxicoze acute [76]	200-1750 μg/kg, UE [77] 1000 μg/kg, SUA [77] 200-1750 μg/kg, RM [72]
Zearalenona (ZEN)	<i>Fusarium spp.</i>	Deregări reproductive, sindrom hiperestrogenic [78]	20-400 μg/kg, UE [79] 20-400 μg/kg, RM [72]
Patulina	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Toxicoze acute, potențial genotoxic [80]	10-25 μg/kg, UE [81] 10-50 μg/kg, RM [72]
Toxina T-2	<i>Fusarium spp.</i>	Toxicoze acute, hepatotoxicitate, neurotoxicitate [82]	15-200 μg/kg, UE [83]
Ocratoxina A (OTA)	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>	Nefrotoxicitate acută [84]	0,5-10 μg/kg, UE [85] 0,5-80 μg/kg, RM [72]
Citrinina	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Monascus spp.</i>	Nefrotoxicitate acută, efect genotoxic [86]	2000 ppb în orez fermentat de <i>Monascus purpureus</i> , EU [87] 2000 μg/kg în orez fermentat de <i>Monascus purpureus</i> , RM [72]

Contaminarea producției de porumb cu micotoxine este o problemă majoră mondială, severitatea căreia depinde de zona climatică, practicile de cultivare și depozitare ale porumbului

[88]. Regiunile subtropicale și tropicale unde se practică cultivarea extensivă sunt cele mai susceptibile în privința contaminării producției cu metaboliți toxici. Însă și țările dezvoltate se confruntă cu pericolele asociate cu contaminarea porumbului cu micotoxine [88].

Există trei faze cruciale în cultivarea porumbului când planta poate fi contaminată cu micotoxine: pre-recoltare, recoltare-uscare și post-recoltare [89–91]. În timpul fiecărei faze, condițiile de mediu au o influență puternică asupra amplitudinii acumulării micotoxinelor [92]. În plus, fungii toxigenici sunt adaptați la propagarea la diferite stadii de dezvoltare ale porumbului. Unele specii sunt mai agresive și pot provoca boli pe parcursul vegetației porumbului și de aceea uneori sunt numiți ”fungi de câmp” [93]. Acestea pot continua să crească și să producă micotoxine în timpul fazei de recoltare și uscare, dar dezvoltarea lor nu continuă de obicei în timpul depozitării, deoarece activitatea lor este limitată de un conținut scăzut de umiditate a boabelor. La porumb, speciile de *Fusarium* sunt cei mai frecvenți fungi toxigenici din această categorie [94]. Infecția și producerea de micotoxine de către acești fungi pot fi inițiate în timpul fazei de recoltare și uscare, când boabele sunt supuse rănirii fizice. Capacitatea de a crește la 18% de umiditate a boabelor este adesea citată ca parametru de diviziune dintre fungi de câmp și fungi de depozitare [94]. Aceste categorii nu sunt complet clare, întrucât unele specii de *Aspergillus* și *Penicillium* pot provoca putrezirea boabelor în câmp, în special *A. flavus*, care cauzează frecvent contaminarea cu aflatoxină a porumbului în câmp. În schimb, unele specii de *Fusarium* pot crește în camere de depozitare dacă conținutul de umiditate a boabelor nu este controlat corespunzător [94].

Cantitatea și dinamica acumulării micotoxinelor în porumb sunt influențate de mai mulți factori, printre care cele mai importante sunt practicile agrotehnice de cultivare, umiditatea și temperatura, mai ales în timpul depozitării. În studiul [95], germenii de porumb au fost păstrați în condiții de umiditate inițială diferită (sau la umiditate relativă diferită timp de 30 de zile). Au fost analizate nivelurile de zearalenonă și deoxinivalenolă (DON) în germeni, uleiuri și produse procesate [95]. Rezultatele au arătat că germenii de porumb cu conținut inițial ridicat de umiditate sau păstrați la umiditate ridicată (95%) au fost semnificativ contaminați de mucegaiuri la sfârșitul depozitării. Cu toate acestea, conținuturile ZEN și DON în aceste germeni de porumb au rămas la niveluri similare. Prin urmare, depozitarea a arătat un efect limitat asupra nivelurilor DON și ZEN ale germenilor și a produselor procesate [95]. De asemenea, a fost studiată influența temperaturii și biotei solului asupra acumulării DON și ZEN [96]. În timp ce scăderea concentrațiilor de zearalenonă a fost dependentă de temperatură, dar nu a fost influențată de activitățile faunistice, a fost observată o reducere a cantităților de DON din cauza impactului microbiotei. În experimentul de levigare, 67–82% din conținutul de DON din miriștile reziduale de porumb s-au îndepărtat din



materialul vegetal prin irigare și a fost detectat în sol și în percolat [96]. ZEN a fost detectată doar ocazional în sol și nu a fost găsită în percolat [96]. Temperatura a fost un factor-cheie, care afectează micotoxinele din sol, stimulând interacțiunea dintre diferiții membri ai faunei solului, precum și nivelurile funcționale și trofice din cadrul rețelelor trofice ale solului.

Spectrul micotoxinelor în porumb depinde de zona climatică și agrotehnica în zona de cultivare. Fumonisinele B1, B2, B3, B4 și A1 au fost cele mai răspândite micotoxine și au avut niveluri maxime de contaminare de 8908, 3383, 990, 1014 și, respectiv, 51,5 μg/kg în probele de porumb din Africa de Sud [97]. Autorii relatează, că deoxinivalenola a apărut în 50% din probe cu o concentrație medie de 152 μg/kg (maximum - 1380 μg/kg). Treizeci și trei la sută din probe au fost contaminate cu zearalenonă la o concentrație medie de 13,6 pg/kg (maximum - 146 pg/kg). Dintre micotoxinele mascate, derivații DON au apărut la un nivel de incidență ridicat de 53%. Dintre toxinele emergente, moniliformina, acidul fusarinolic și bovericina au avut o rată ridicată la 98%, 98% și 83% și niveluri maxime de contaminare de 1130, 3422 și, respectiv, 142 ug/kg. Conținutul de aflatoxine din porumb în Uganda a variat între 0 și 3760 ng/g [15]. Aproximativ 16% din probe au conținut concentrații de aflatoxină peste pragurile de toleranță conform legislației UE. A fost obținut un total de 3105 izolate de *Aspergillus* din secțiunea *Flavi* și dintre acestea a predominat morfotipul *A. flavus* L (89,4%) [15]. În Albania, 78% din probele de porumb prelevate au fost contaminate cu micotoxine produse de *Fusarium spp.*, predominant cu B1 și B2 [98]. Concentrația a variat de la 16,9 până la 59,9 μg/kg. Cantitatea sumară a depășit CMA stabilită în UE în 31% de probe. Analizele produselor alimentare din porumb efectuate în China au evidențiat co-ocurența a 12 micotoxine în probele analizate [99]. Cele mai frecvente au fost micotoxinele DON (63%), fumonisina B1 (57%) și zearalenona (46%). Din mostrele testate, 78% au fost contaminate minim cu o micotoxină. De asemenea, cele mai prevalente micotoxine în siloz chinez au fost DON (99,5%) și ZEN (79,%), cele mai înalte concentrații pentru DON au fost 3600 μg/kg, iar pentru ZEN - 830μg/kg [100].

Deoarece sinteza micotoxinelor nu este constitutivă, cantitatea metaboliților nu totdeauna corelează cu cantitatea fungilor toxigenici în mostrele analizate. În anii 2019 și 2020 nu a fost înregistrată contaminarea porumbului cu micotoxine în diferite localități din Republica Serbia prin testul ELISA și metoda cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) [17]. Analizele CAP ale tulpinilor izolate de *A. flavus* din probele de porumb din 2019 au confirmat prezența genelor-cheie de biosinteză responsabile de producția de aflatoxină[17]. Inocularea artificială și analiza HPLC ulterioară a probelor de porumb inoculate a confirmat capacitatea tulpinilor de *A. flavus* de a produce aflatoxină, indicând un risc ridicat de contaminare în condiții favorabile. A fost

efectuat un studiu de cinci ani (2012–2016) care a cuprins 46 de tulpini de *A. parasiticus* izolate din boabele de porumb din Serbia pentru a observa trăsăturile morfologice, moleculare, patogene și toxigenice ale acestui agent patogen [13]. Izolatele de *A. parasiticus* au sintetizat în principal aflatoxină B1, procentul de izolate producătoare de aflatoxina G1 a fost considerabil mai mic. Autorii menționează că concentrația de aflatoxina G1 a fost mai mare decât cea de aflatoxina B1 în opt izolate; abordarea polifazică, utilizată pentru caracterizarea izolatelor, a arătat că acestea sunt specii de *A. parasiticus* [13].

Un risc fitosanitar îl prezintă și organele vegetative ale porumbului, destinate consumului de către animale, contaminate cu fungi și micotoxine. Pe parcursul a trei ani (2016-2018) au fost prelevate 56 de silozuri de porumb din Belgia [16]. Concentrația a 22 de micotoxine diferite a fost investigată folosind LC-MS/MS și prezența de ADN a trei specii de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum* și *F. verticillioides*) a fost analizată prin qPCR. Fiecare mostră de siloz de porumb conținea cel puțin două micotoxine diferite. Nivalenola și deoxinivalenola au fost cele mai răspândite (ambele au fost detectate în 97,7% din silozurile de porumb), mai puțin frecventă a fost enitainan B, identificată în circa 88% probe. Concentrațiile DON și ZEN au depășit adesea recomandările UE în 21,3% și, respectiv, 27,7% din silozurile de porumb. Pentru a evalua contaminarea cu micotoxine în Germania de Nord [101], 120 de probe de porumb furajer de patru soiuri din mai multe locații contaminate natural au fost analizate pentru concentrațiile de DON și ZEN și formele lor modificate. În studiul respectiv s-a constatat, că deoxinivalenola și zearlenona au fost identificate cu incidențe mari (mai mult de 95%) și diapazon larg de concentrații – până la 10.972 μg/kg pentru DON și 3910 μg/kg pentru ZEN. Aproape în jumătate din probe (46%) concentrațiile de ZEN au depășit valorile CMA stabilite pentru furaje, iar în 9% de probe s-au observat concentrațiile de DON care depășeau valorile CMA respective. Derivații zearalenonei au fost identificați în concentrații mai mici și într-un număr mai mic de probe (circa 45%). În schimb, derivații DON au fost identificați în practic toate probele analizate și într-un diapazon larg de concentrații. În aceeași lucrare [101], autorii au stabilit, că probele de furaj au fost contaminate cu cel puțin 3 micotoxine concomitent; incidența a patru sau mai multe micotoxine a fost de 95%, în 93% s-a observat co-ocurența micotoxinelor DON și ZEN. Adică, consumul furajelor din porumb a fost asociat permanent cu intoxicarea cu mai multe micotoxine.

Impactul semnificativ al bolilor provocate de fungii din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* asupra volumului și calității producției de porumb necesită implementarea strategiilor adecvate pentru combaterea patogenilor și nivelarea efectului negativ al pagubelor economice,

produse de acestea. Cel mai efectiv procedeu este ameliorarea genotipurilor de porumb cu rezistență înaltă la patogenii fungici.

## **1.2. Bazele moleculare ale rezistenței porumbului la bolile provocate de patogenii din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* și acumularea micotoxinelor**

La plante rezistența specifică la agenții patogeni este conferită de genele *R* (Resistance genes), majoritatea cărora codifică receptorii membranari sau intracelulari [102]. De obicei, genele majore de rezistență sunt dominante și oferă rezistență la unul sau mai mulți patogeni [103]. Plantele pot declanșa un răspuns imunitar eficient la o mare varietate de agenți patogeni fungici, bacterieni și virali [104]. Cele mai multe gene *R* identificate sunt polimorfe în populațiile de plante, ceea ce a condus la caracterizarea lor inițială și utilizarea în programele de ameliorare a plantelor [105]. Cu toate acestea, în genomul plantelor au fost găsite pseudo-gene *R* care modulează rezistența plantelor la boli infecțioase [106].

Genele *R* conferă rezistență specifică plantelor superioare la boli infecțioase prin sinteza proteinelor *R*. Rezistența se poate realiza prin mai multe mecanisme [107]:

- Interacțiunea directă cu produsele genelor de avirulență *avr* ale patogenilor (relația genă-pentru-genă);
- Proteina *R* protejează o altă proteină care detectează degradarea de către o genă *avr* (ipoteza de gardă);
- Proteina *R* detectează PAMP/MAMP;
- Proteina *R* codifică o enzimă care degradează toxina produsă de patogen.

Majoritatea genelor *R* descoperite la plante au domenii funcționale conservate, predominant printre ele se numesc situsurile de legare a nucleotidelor (NBS) și repetițiile bogate în leucină (LRR) [107]. Informațiile de secvență ale domeniilor conservate pot fi utilizate invariabil pentru a extrage secvențe similare de la alte specii de plante, folosind primeri degenerați și specifici pentru amplificarea lor într-o reacție în lanț a polimerazei. Astfel de secvențe derivate, cunoscute sub numele de RGA, pot servi ca markeri moleculari pentru identificarea și izolarea rapidă a genelor *R* [108]. În plus, ele pot oferi indici despre mecanismul evolutiv al genelor de rezistență și interacțiunea implicată în recunoașterea patogenilor [109]. În ultimii ani, această abordare bazată pe omologie de secvență a fost utilizată pe scară largă pentru clonarea și maparea RGA-urilor în cereale, leguminoase, oleaginoase, cafea, condimente, arbori de pădure și culturi horticole folosind PCR [110]. Deoarece primerii sunt proiectați pe baza motivelor conservate ale genelor *R*, acestea pot da cu siguranță produsele dorite la amplificarea PCR în mai multe specii [111].

Deși genomul porumbului a fost secvențiat, sunt identificate, izolate și clonate puține gene asociate cu rezistența specifică la boli fungice, în unele cazuri interacțiunea lor cu genele *avr* la fel nu este destul de studiată. În prezent, sunt descrise doar două gene *R* din genomul porumbului, ce asigură rezistența calitativă la unii fungi patogeni: *Hm1* și *Rp1-D* [112]. *Hm1* se află pe cromozomul 1 și asigură rezistența la putregaiul cauzat de *Cochliobolus carbonum* rasa 1. *Rp1-D* face parte din locusul complex *rp1* ce se află pe partea distală a brațului scurt al cromozomului 10 și cuprinde cel puțin 14 gene de rezistență (*Rp-A - Rp-N*), ele asigură rezistența specifică la rasele fungului *Puccinia sorghi* [113]. Fiecare genă asigură rezistența la o rasă specifică a fungului dat.

Cercetările științifice raportează, că în combaterea bolilor fungice predomină rezistența cantitativă QDR [114]. Rezistența QDR este dirijată de mai mulți QTL, fiecare din ei aparține având un efect scăzut și activitatea cărora fiind influențată în mare parte de factori de mediu [115]. QDR nu elimină complet ci doar diminuează manifestarea bolilor fungice, efectul QTL sumar se datorează interacțiunii dintre gene [116]. Strategiile implementate de amelioratorii porumbului se bazează mai mult pe rezistența cantitativă decât cea calitativă [117]. Aceasta se datorează faptului că porumbul este atacat în principal de fungi necrotrofici, rezistența la care este de natură cantitativă [118].

Studiile genomice prin abordarea a mai multor tehnologii moleculare pe diferite populații au elucidat factorii constitutivi și induși, care mediază rezistența la fuzarioza și aspergiloza și au permis identificarea unui număr de QTL și gene-candidate implicate în rezistența la putregaiurile tulpinii și știuleților, provocate de *Fusarium spp.* și *Aspergillus spp.*, dar numai câteva gene au fost raportate ca purtători de rezistență la aceste boli și acumularea micotoxinelor la porumb. Nu sunt raportați loci asociați cu rezistența specifică la peniciloze. Un rol important în formarea rezistenței la bolile fungice joacă genele ce codifică factorii de transcripție și metaboliții secundari, implicați în căile de transducție a semnalelor.

Evaluarea factorilor moleculari de rezistență la fuzarioze arată că valoarea selecției în baza markerilor identificați pentru ameliorarea acestor caractere este limitată deoarece cea mai mare parte a variabilității genetice nu a fost surprinsă de modelele QTL din cauza naturii poligenice a rezistenței la infecțiile de *Fusarium spp.* [119]. Astfel, selecția pentru anumite alele de rezistență ar putea fi utilă atât timp cât se efectuează și selecția genomică pentru fundal poligenic, fie pentru trăsături de interes, fie pentru caractere adaptive generale. În plus, adaptarea ar trebui să fie și o problemă importantă, deoarece alelele de rezistență se găsesc mai frecvent la genotipuri de porumb tropical, care nu sunt adaptate regiunilor temperate [120–122]. Selecția bazată pe fenotip ar putea fi eficientă, dar se confruntă cu mai multe probleme. Fenotiparea porumbului pentru rezistența la

fuzarioză necesită teste de teren efectuate în mai multe medii datorită interacțiunii mari dintre genotip și mediu și gestionarea adecvată a timpului de inoculare datorită variației înfloririi între genotipurile [123]. Aceste dificultăți, pe lângă disponibilitatea în prezent a setului de markeri moleculari informativi și ieftini, au determinat trecerea de la selecția convențională la MAS și ameliorarea genomică. Studiile efectuate până acum au furnizat mulți markeri pentru a fi utilizați de amelioratori, dar este necesară validarea genelor în baza QTL cunoscuți pentru a obține mai multe informații despre mecanismele de apărare a plantelor împotriva infecțiilor fungice. Obținerea datelor bazate pe genomică deschide o cale de a accelera procesul de ameliorare a rezistenței prin cartografierea familiei sau a populației și selecția genomică. Cerințe preliminare importante sunt populațiile mari care sunt analizate genomic prin rețele de markeri de densitate medie-înaltă și fenotipări extinse ale populațiilor. Acesta din urmă este important pentru a dezvolta un model genomic care este utilizat pentru a prezice valorile genomice estimate de reproducere ale genotipurilor netestate din punct de vedere fenotipic. Deoarece toate culturile suferă de multe boli, rezistența la mai multe boli (multiple disease resistance, MDR) este un obiectiv atractiv care poate fi selectat de QTL MDR-specifice [118].

Lucrarea de pionierat a cercetătorilor Centrului Internațional de Ameliorare a Porumbului și Grâului (CIMMYT) a arătat că în două populații F2:3 derivate din încrucișări între linii consangvinizate albe adaptate la condițiile munților mexicani, QTL pentru fuzarioză pot fi găsiți pe cromozomii 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 și 10 [123]. Acești QTL ar putea explica de la 11% la 44% din varianța fenotipică pentru FER (Fusarium ear rot); treisprezece au afișat interacțiuni semnificative QTL × mediu și doar trei s-au suprapus în ambele populații. Deși majoritatea QTL pentru FER sunt QTL minori, unii QTL majori ale căror efecte asupra FER au fost validate de linii aproape izogenice ar putea fi gestionate prin ameliorare asistată de markeri.

S-a analizat implicarea genotipului și mediului în exprimarea trăsăturilor asociate cu rezistența porumbului la fuzarioza știuleților și contaminarea cu micotoxine în lucrarea [124]. În general, interacțiune genotip-mediul a explicat mai puțin de 20% din variația tuturor trăsăturilor analizate în familiile consangvinizate. Trăsăturile legate de contaminarea cu fumonisine au avut o variație genetică mai mică (1% până la 3%) și în mare parte au fost afectate de condiții de mediu (46% până la 73%) [124].

Profilurile transcriptomului derivat din RNA-seq a două linii consangvinizate de porumb au fost utilizate pentru a identifica transcriptii exprimate diferențial și pentru a propune cartografierea QTL de trăsături cantitative de rezistență la GER în boabe [125]. Un total de 1255 de transcripti au fost suprareglați semnificativ din cauza infecției fungice atât la genotipuri

susceptibile, cât și la cele rezistente. Au fost identificate 81 de gene implicate în transportul membranelor, reglarea hormonală, modificarea peretelui celular, detoxifierea celulelor și biosinteza proteinelor legate de patogenează și fitoalexinelor ca gene candidate care contribuie la rezistență [125]. Concomitent, analizele transcriptomice comparative ale mutanților knock-out *F. graminearum* cu virulență modificată au oferit noi perspective asupra proceselor legate de patogenitate [126].

În studiul [127] populația MAGIC a fost utilizată pentru a efectua cartografierea QTL de înaltă definiție pentru putregaiul răsadului provocat de *Fusarium spp.* (Fusarium seedling rot, FSR). Pentru FSR, doi QTL au fost detectați la 2,8 Mb și 241,8 Mb pe cromozomul 4 și un QTL - la 169,6 Mb pe cromozomul 5. Evaluarea unor linii dublu haploide a evidențiat 8 QTL care au explicat 34% din  $p_G$  pentru severitatea GER și doi SNP-uri cei mai importanți cu cel mai mare  $p_G$  pentru severitatea GER (*ZmSYNBREED\_24070\_673* și *ZmSYNBREED\_53695\_527*) au fost plasați în 25 de gene care codifică proteine [128].

A fost identificat un locus cantitativ de rezistență la boli, *qRfg2*, care protejează împotriva GER [129]. Proteina *ZmAuxRP1*, asociată cu acest locus, a răspuns rapid la provocarea patogenului cu o reducere rapidă, dar tranzitorie a expresiei, care a condus la oprirea creșterii rădăcinilor, dar a sporit rezistența la GSR (Gibberella stalk rot) și la FER. S-a demonstrat că *ZmAuxRP1* induce biosinteza acidului indol-3-acetic, în timp ce suprimă formarea compușilor de apărare benzoxazinoide.

Mai multe gene-hub prezumtiv asociate cu rezistența la GSR au fost identificate folosind analiza rețelei de corelație genică ponderată (WGCNA) [130]. Printre rețelele complexe de co-expresie, *ZmHIR3* a arătat o corelație puternică cu mai multe gene-cheie, iar studiile genetice și histologice au arătat că mutantul *zmhir3* este mai sensibil la GSR, însoțit de moartea celulară intensificată în tulpină ca răspuns la infecția cu *F. graminearum*. Autorii presupun, *ZmHIR3* joacă un rol prezumtiv în rezistența la GSR, probabil prin reglarea transcripțională a genelor-cheie, metabolizilor funcționali și controlul morții celulare [130].

Zece QTL localizați pe 6 cromozomi au fost identificați într-o populație recombinantă de linii consangvinizate RIL [131]. Ei au explicat 1,0–7,1% din variația fenotipică. Cartografierea epistatică a permis detectarea a patru perechi de QTL care au arătat efecte ale epistazei semnificative, explicând 2,1–3,0% din variația fenotipică. În plus, 18 SNP au fost identificați pe întregul genom prin studiul GWAS [131]. Linkajul comparativ și cartografierea de asociere au relevat cinci intervale comune localizate pe cromozomii 3, 4 și 5 asociați cu rezistența la FER, dintre care patru au fost verificate în diferite populații de linii NIL. Prin GWAS s-au identificat

trei gene-candidate în aceste intervale consistente, care aparțineau familiei de proteine de glutaredixină, factori de depolimerizare a actinei și proteine care leagă AMP.

Un alt studiu GWAS [132] al rezistenței la *Fusarium spp.* în timpul dezvoltării a răsadului a fost efectuat folosind 226.446 de markeri SNP. Dintre toți SNP 164 au fost asociați semnificativ cu trăsăturile de interes. Patru SNP au fost asociați cu scorul de severitate a bolii după inoculare, 153 au fost asociați cu severitatea bolii în boabe asimptomatice și 7 - cu diferența dintre nivelurile de severitate în boabele inoculate și neinoculate. Un set de gene care conțineau sau se aflau în apropierea fizică a SNP-urilor de interes au fost identificate ca candidați pentru rezistența la *Fusarium* în stadiul de răsad. Analiza funcțională a arătat că multe dintre aceste gene sunt direct implicate în apărarea plantelor împotriva agenților patogeni și a răspunsurilor la stres, inclusiv factorii de transcripție, chitinaza, citocromul P450 și proteinele de ubichitinare. În plus, 25 de gene au fost găsite în dezechilibru de linkaj semnificativ cu SNP-uri identificați de GWAS și patru dintre ele au fost implicate direct în rezistența la boli [132].

Ca rezultat al NGS, s-au obținut un total de 81.602 markeri moleculari, dintre care, ca urmare a cartografierii asociative, au fost selectați 2962 (321 SilicoDArT și 2641 SNP) semnificativ legați de rezistența plantelor la *Fusarium* [133]. Din 2962 de markeri legați semnificativ de rezistența plantelor la *Fusarium*, au fost selectați șapte markeri (SilicoDArT, SNP) și folosiți pentru cartografierea fizică. În urma analizei, s-a constatat că doi din șapte markeri selectați (15.097—SilicoDArT și 58.771—SNP) sunt localizați pe cromozomii 2 și 3 [133]. Markerul 15.097 este ancorat la gena care codifică N-hidroxicinamoiltransferaza putrescinei în timp ce markerul 58.771 este ancorat la gena care codifică precursorul peroxidazei 72 [133]. Un total de 12 DArT au fost asociați cu rezistența la putregaiul știuleților [134]. Unii dintre markerii DArT au fost localizați aproape de gene cu funcții direct legate de rezistența la putregaiul știuleților, cum ar fi o genă responsabilă pentru răspunsul imun care aparține clasei de receptori NBS-LRR [134]. Unii markeri s-au dovedit, de asemenea, strâns asociați cu genele care codifică factori de transcripție (*nactf11* și *nactf61*), gene responsabile de procesul de oxidare-reducere și de activitatea peroxidazei [134].

Regiunile genomice de la pozițiile 4.07–4.1, 6–6.01, 6.04–6.05 și 8.05–8.08 au fost legate de rezistența porumbului la FER și/sau nivelurile reduse de fumonisină din boabe [135]. Genele implicate în metabolismul secundar și compușii/procesele legate de rezistență au fost suprareglate, în special cele legate de biosinteza/rearanjarea peretelui celular și biosinteza flavonoidelor. Printre genele expresate diferențiar, *Zm00001d053603*, *Zm00001d035562*, *Zm00001d037810*,

*Zm00001d037921* și *Zm00001d010840* au fost polimorfe în genotipurile rezistente și susceptibile [135].

Folosind cel mai agresiv izolat de *F. verticillioides*, au fost monitorizate severitatea bolii și profilurile de expresie genetică legate de căile de biosinteză ale acidului salicilic, acidului jasmonic, acidului abscisic, benzoxazinoidelor și proteinelor legate de patogeneză în liniile de porumb vietnamez [136]. Ca rezultat, o inducție mai puternică a genelor de sinteză a acestor metaboliți secundari sugerează idea, că acestea pot fi asociate rezistenței porumbului la agenții cauzali ai fuzariozelor.

Un rol esențial în ontogeneza plantelor și modularea răspunsurilor de apărare îl joacă factorii de transcripție [137-139]. În particular, factorul de transcripție de tip trihelix este versatil din punct de vedere a funcțiilor sale biologice și este implicat în creșterea plantelor, organogeneza, reacția adecvată a gazdei la stres biotic și abiotic [140-142]. Gena *ZmGT-3b*, care codifică factorul de transcripție trihelix, este esențială pentru răspunsul plantei la infecția cu *F. graminearum* prin implementarea unei reduceri rapide și semnificative a expresiei sale pentru a suprima creșterea răsadului și a majora rezistența la boli [142]. La răsaduri de porumb mutant *ZmGT-3b*-knockdown, rezistența la *F. graminearum* și secetă au fost sporite în mod constant concomitent cu suprimarea semnificativă a creșterii plantulelor și a fotosintezei [143]. Genele legate de fotosinteză au fost subreglate în mod specific, în special *ZmHY5*, care codifică un regulator central conservat al dezvoltării răsadului și al răspunsurilor la lumină [143]. În același studiu s-a confirmat că *ZmGT-3b* este un mediator de interacțiune al *ZmHY5* în drojzii și *in planta*. Răspunsurile de apărare constitutive au fost activate sincron în răsaduri *ZmGT-3b*-knockdown, în care conținutul componentelor majore ale peretelui celular, cum ar fi lignina, a fost crescut [143]. Acestea sugerează că *ZmGT-3b* este implicat în coordonarea proceselor de creștere și apărare ca răspuns la pătrunderea fungilor patogeni prin optimizarea expresiei a genelor legate de fotosinteză și răspuns de apărare [142, 143].

La fel, metacaspazele, o clasă de proteaze dependente de cisteină, acționează ca regulatori importanți în răspunsul de apărare a plantelor prin inducerea reacției de hipersensibilitate [144–146]. În genomul porumbului există 11 gene *ZmMC* care au fost clasificate în două tipuri (tip I și II) pe baza diferențelor lor structurale [147]. Au fost investigate diferite modele de transcriere a 11 *ZmMC*-uri în răspunsul de apărare al porumbului mediat de proteina NB-LRR Rp1-D21 [148]. Multe cis-elemente care sunt induse de acidul salicilic, metil-jasmonat, acidul abscisic și auxină au fost identificate în regiunile promotoare ale secvențelor *ZmMC*, care au fost coasociate cu cel puțin un QTL asociat cu rezistența la mai multe boli fungice, inclusiv FER, cu excepția *ZmMC6*-



8. Pe baza analizei profilurilor de expresie genică s-a demonstrat că diferiți *ZmMC*-uri afișează niveluri diferite de transcriere ca răspuns la infecțiile de *Cochliobolous* și *F. verticillioides* [148].

Lipoxigenazele plantelor sunt implicate în sinteza oxilipinilor care joacă un rol crucial în reglarea mecanismelor de apărare împotriva agenților patogeni și influențează rezultatul patogenezei [149-152]. În studiul [153], caracterizarea funcțională a genei ce codifică lipoxigenaza 9, *ZmLOX4*, a fost efectuată prin utilizarea mutantilor care poartă inserții *Mu* în această genă (numită *UFMulox4*) pentru a descoperi mai bine rolul acestor molecule de semnalizare în rezistența porumbului împotriva *F. verticillioides*. Genotiparea a cinci *UFMulox4* a identificat mutantul *UFMu10924* ca fiind singurul care are o inserție în regiunea de codificare a genei. Impactul mutagenezei *ZmLOX4* asupra apărării boabelor împotriva *F. verticillioides* și acumulării de fumonisine a dus la o susceptibilitate crescută în comparație cu liniile consangvinizate W22 și Tzi18 [153]. Mai mult, expresia majorității genelor implicate în căile biosintetice ale lipoxigenazelor, acidului jasmonic și volatilelor, precum și activitatea enzimatică a lipoxigenazeelor, au scăzut sau au fost neafectate de inocularea fungică în mutantul *UFMu10924* [153]. Aceste rezultate confirmă rolul strategic al *ZmLOX4* în controlul apărării împotriva *F. verticillioides* și influența sa asupra expresiei mai multor gene ce codifică lipoxigenaze, acid jasmonic, volatilele [153].

S-a descoperit că 29 de proteine suprareglate în timpul infecției cu *F. graminearum* au fost activ implicate în biosinteza fenilpropanoizilor, inclusiv polifenoloxidazele, fenilalaninoxidazele și alte enzime-cheie [154]. Fenilpropanoizii sunt metaboliți secundari ai plantelor derivați din aminoacidul aromatic fenilalanină în majoritatea plantelor sau tirozină în unele plante monocotiledone [155]. Fenilpropanoizii pot participa la transducția semnalului local și sistemic indusă de genele de răspuns de apărare [155]. În procesul de protejare a plantelor împotriva infecției cu patogeni, enzimele-cheie ale căii fenilalaninei, cum ar fi fenilalanin-amoniu-liazele, peroxidazele și polifenoloxidazele sunt implicate în biosinteza metaboliților ligninei, care asigură o barieră structurală împotriva fungilor, unclusiv fungul necrotrofic *F. graminearum* [154,156]. Analiza căilor GO și KEGG a arătat că proteinele legate de interacțiunea plantă-patogen și biosinteza metaboliților secundari au fost suprareglate, în timp ce proteinele din metabolismul energetic și dezvoltarea plantelor au fost subregulate pentru a rezista infecției de *F. graminearum* și s-a demonstrat că *ZmWRKY83* joacă un rol important în răspunsul gazdei la infecția de *F. graminearum* [154].

Jasmonații sunt cunoscuți pe scară largă în reglarea apărării împotriva agenților patogeni prin homeostazia jasmonaților activi și modulului funcțional COI-JAZ-MYC [157, 158]. Cu toate

acestea, funcțiile diferitelor specii moleculare de jasmonații și modulul COI-JAZ-MYC în interacțiunile porumbului cu *F. graminearum* și reglarea diverșilor metaboliți rămân necunoscute. S-a constatat că aplicarea exogenă a metiljasmonaților a îmbunătățit puternic rezistența la fuzarioza răsadului [159]. Analiza ARN-seq a arătat că metiljasmonații au activat mai multe gene în căile acidului jasmonic [89]. Testele Two-Hybrid, Split-Luciferaze și Pull-down au arătat că coronatina, funcțional și structural asemănătoare acidului jasmonic, funcționează ca un ligand esențial pentru a declanșa interacțiunea dintre *ZmCO1a* și *ZmJAZ15* [154]. Prin implementarea mutațiilor *CRISPR-cas9*-knockout și *Mutator*-insert, s-a demonstrat că mutantul *co1a* este mai rezistent, în timp ce mutantul *jaz15* este mai susceptibil la fuzarioza răsadului [159]. Mai mult, mutantul *opr7-5opr8-2* cu deficit de acid jasmonic a prezentat o rezistență sporită la fuzarioză în comparație cu genotipul sălbatic [154]. Împreună, aceste rezultate oferă dovezi puternice că *ZmJAZ15* joacă un rol esențial în imunitatea porumbului la fuzarioza răsadului, în timp ce *ZmCO1a* și JA endogen în sine ar putea funcționa ca factori de susceptibilitate [154]. Întreruperea genei lipoxigenazei 9 din calea biosintetică a acidului jasmonic, *ZmLOX5*, a dus la o susceptibilitate crescută la GSR, indicând rolul acesteia în apărare la boala respectivă [160].

Rezistența la *A. flavus* este o trăsătură cantitativă complexă [161-163]. Analiza rețelei de co-expresie genetică prin WGCNA a identificat 7 module care au fost asociate în mod semnificativ cu diferite stadii de infecție și 110 gene-hub ale acestor module [161]. Acești regulatori-cheie participă în principal la biosinteza acizilor grași și a antibioticelor. Din 195 gene-candidate opt gene au fost induse de infecția de *A. flavus*. În stadiul T4, 6 gene au fost suprareglate, inclusiv gena Barwin-like (*LOC103652813*), factorul de transcripție MYB41 (*LOC100037746*), chitinaza 2 (*LOC100285638*), factorul de transcripție WRKY 23 (*LOC103654285*), factorul de transcripție presupus 5WRKY3 (*LOC103654285*), *LOC103639781* și *LOC100272820* care codifică o proteină necunoscută. Au fost detectate mai multe gene WRKY care vizează activarea căilor de rezistență (jasmonați, fenilpropanoizi și etilenă) utilizând analiza inferenței cauzale [162].

S-a demonstrat că HIGS reduce infecția gazdei cu diverși agenți patogeni fungici. În lucrarea [163], gena proteazei alcaline (*alk*) a *A. flavus* a fost țintită pentru inactivarea prin HIGS. Un vector ARNi care poartă o porțiune a genei *alk* a fost încorporat în genomul de porumb B104, patru din opt transformanți care au conținut gena din familia *alk*: *alk-3*, *alk-4*, *alk-7* și *alk-9*, au fost autopolenizate la generațiile T4/T6 [163]. La T3, liniile *alk*-transgenice au prezentat o reducere de până la 87% a acumulării de aflatoxină în condiții de laborator. Liniile transgenice *alk-3* și *alk-7* T4 și T5 și T6 *alk-4* și *alk-9* au prezentat o reducere medie de 84% a acumulării de aflatoxină în comparație cu martorii lor nuli sub inoculări pe teren. Hibridii F1 din trei linii

consangvinizate de elită de porumb și liniile transgenice au prezentat, de asemenea, o îmbunătățire semnificativă a rezistenței la acumularea de aflatoxină [163]. Propagarea redusă a *A. flavus* și nivelurile de ADN de  $\beta$ -tubulină fungică au fost observate în boabele transgenice în timpul inoculării *in vitro*, țesuturile transgenice ale frunzelor de *alk-4* și ale boabelor imature au conținut, de asemenea, niveluri de aproximativ 1000 de ori mai mari de ARN mici *alk*-specifci, comparativ cu martorii nuli, ceea ce indică faptul că rezistența sporită la aflatoxină în boabele de porumb transgenic se datorează suprimării infecției cu *A. flavus* prin HIGS a genei *alk* [163].

Precum rezistența la fuzarioză și aspergiloză, rezistența porumbului la acumularea micotoxinelor poartă caracter cantitativ și este asociată cu mai mulți QTL cu semnificație diferită. Identificarea genelor a porumbului asociate cu detoxificarea metaboliților fungici este împiedicată în mare parte de faptul, că rolul micotoxinelor în patogeniza bolilor provocate de mucegaiuri la moment nu este înțeles pe deplin. În studiul [164], treizeci și nouă de SNP asociați semnificativ cu rezistența la acumularea de fumonisină în boabele de porumb au fost găsiți și grupați în 17 QTL. SNP-urii semnificativi se grupau într-un QTL unic atunci când au fost localizați într-o regiune genomică în dezechilibru de linkaj, rezultând în 17 QTL-uri asociați cu acumularea de fumonisină. SNP-uri semnificativi pentru rezistența la acumularea de fumonisină în boabele de porumb au fost găsite în pozițiile 1.07, 1.09, 2.08, 3.02, 3.04, 3.05, 3.06, 3.08, 3.09, 4.02, 4.05, 5.03, 7.03, 7.03, 7.0 [164].

Studiu GWAS fost efectuat pe 339 RIL-uri dintr-o populație MAGIC care fusese folosită anterior pentru a QTL pentru rezistența la FER [165]. În pozițiile 3.08, 4.07, 4.10, 7.03-7.04, 9.04-9.05 și 10.04-10.5 au fost detectați șase QTL-uri pentru conținutul de fumonisină. Cinci dintre cei șase QTL-uri se găsesc în regiuni în care au fost găsiți și QTL-uri pentru rezistența la FER. Cu toate acestea, variația genetică pentru conținutul de fumonisină din bob este condiționată de mulți alți QTL-uri cu efect mic care ar putea prezenta efecte de interacțiune QTL  $\times$  mediu.

Natura cantitativă și moștenirea complexă a rezistenței la acumularea de aflatoxine în porumb au limitat întregresarea rezistenței la acumularea de aflatoxine în genotipurile de interes. Cartografierea QTL [166] a fost efectuată pe o populație biparentală compusă din 241 de familii F2:3 derivate din încrucișarea liniilor consangvinizate Mp705 (sensibilă)  $\times$  Mp719 (rezistentă). Harta linkajului genetic a fost construită cu 1.276 de markeri moleculari SNP și SSR care acoperă o distanță genetică totală de 1.642 cM în toți cei zece cromozomi de porumb. Cartografierea cu mai multe intervale a arătat că majoritatea alelelor asociate cu reducerea acumulării de aflatoxine și sursa pentru efectul mai mare QTL identificați au fost obținute de la Mp719, părintele rezistent. Doi QTL identificați pe cromozomul 1 și cromozomul 3 au fost cele mai stabile în diferite medii

și, atunci când sunt combinate, au explicat 24,6% din variația fenotipică totală în toate cele trei medii. Rezultatele studiului au arătat că aceste regiuni cromozomiale conțin QTL importanți pentru influențarea acumulării de aflatoxină. Genele *GRMZM2G053140*, *GRMZM2G165601*, *GRMZM2G108619* și *GRMZM2G331766* au fost identificate prin analiza GWAS ca fiind asociate cu rezistența la contaminarea cu aflatoxine, *GRMZM2G166166* a fost identificat prin analiza porumbului transgenic [167]. Au fost investigate 55 de gene printre 12 linii aproape izogenice (NIL) de porumb în căile de semnalizare a interacțiunii plantă-patogen care poartă loci de trăsături cantitative ale porumbului (QTL) asociate cu reducerea aflatoxinei [168]. Aceste NIL de porumb au fost obținute din liniile consangvinizate de porumb Mp313E (părinte-donator rezistent) și Va35 (părinte susceptibil recurent). Tehnica cantitativă RT-PCR (qRT-PCR) a fost utilizată pentru a studia modelele de expresie a genelor [168]. Șapte protein-kinaze dependente de calciu și o oxidază de explozie respiratorie au prezentat niveluri diferențiale semnificative de expresie între QTL-NIL de porumb [168]. În plus, au fost examinate și profilurile de expresie genetică ale factorilor de transcripție WRKY. Genele *WRKY52*, *WRKY71* și *WRKY83* de porumb au manifestat niveluri de expresie semnificativ diferențiate între QTL-NIL [168].

Identificarea genelor implicate în rezistența specifică a porumbului la bolile fungice este o direcție de perspective deoarece permite screening-ul genotipurilor de interes deja la nivel de germoplasmă și diminuarea cheltuielilor asociate cu testările plantelor. Însă lipsa informației ample despre genele R de rezistență a porumbului la *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* și acumularea micotoxinelor împiedică abordarea acestei strategii. Cu toate că cercetările recente furnizează un număr mare de QTL asociați cu rezistența la fungii dați, aceștia de sine stătător au un efect mic, iar asamblarea unui număr mare de QTL în genom este legat de multe dificultăți, mai ales când ameliorarea porumbului se efectuează în baza a mai multor caractere de natură cantitativă. Astfel, identificarea genotipurilor de interes în baza testărilor pe fundal provocativ rămâne procedeu actual de selectare a plantelor pentru ameliorarea rezistenței la boli fungice. Pentru această un moment esențial este identificarea veridică și cuantificarea patogenilor în material vegetal.

### **1.3. Aplicarea metodelor moleculare pentru diagnosticarea fungilor patogeni și toxigenici**

Identificarea și clasificarea fungilor are particularitățile sale, care sunt asociate specificității biologiei și ciclului de viață ale acestor microorganisme. Cum s-a menționat mai sus, de mai mulți ani în taxonomia fungilor se utilizează metoda convențională de identificare a speciilor, bazată pe analiza caracterelor morfologice [21, 169]. Simplitatea de abordare face această metodă actuală

până în prezent, ea fiind esențială pentru analiza evoluției fenotipului fungic. Însă caracterele morfologice ale fungilor sunt polimorfe și variază semnificativ sub acțiunea factorilor de mediu, ceea ce face sistematica fungilor în baza doar acestor caractere uneori destul de problematică [170]. Fazele sexuată și asexuată la fungi uneori se deosebesc destul de semnificativ, și în unele cazuri au fost considerate chiar specii diferite [22]. S-a constatat, că analiza morfologică este efectivă pentru clasificarea microorganismelor la nivel familie sau ordin, însă la nivel de specii sau rase rezultatele clasificării pot fi ambigui și contradictorii [171]. Această ambiguitate este determinată de mai mulți factori – evoluția convergentă, hibridizarea interspecifică, prezența speciilor criptice; sub specii criptice se înțeleg speciile cu fenotip identic, dar care se deosebesc la nivel molecular [169, 172]. Pe de altă parte, nu toate caractere morfologice pot servi drept indici de discriminare la nivel de diferiți taxoni, și numărul acestora este limitat. În principal, clasificarea fungilor se face în baza particularităților sporilor, însă aici cercetătorii se confruntă cu mai multe obstacole [169]. În primul rând, nu toate speciile de fungi tind să sporuleze pe medii nutritive artificiale, ceea ce face identificarea lor precisă practic imposibilă - s-a observat, că unele teleomorfe de ascomicete nu produc ascocarpi pe medii nutritive, ceea ce împiedică identificarea acestora în baza caracterelor morfologice [173]. Însă la alte specii care totuși produc spori în condiții controlate, morfologia acestora variază destul de semnificativ în dependența de componenții mediului, și uneori sporii polimorfici pot fi eronat asociate diferitor specii [174]. În general, limitările utilizării caracterelor morfologice în calitate de markeri pentru identificarea și clasificarea fungilor reies din următoarele caracteristici ale acestora:

- caracterele morfologice sunt influențate semnificativ de factorii abiotici;
- furnizează informație ambiguă la nivelul speciilor;
- uneori sunt greu de descris și evaluat din punct de vedere cantitativ;
- estimarea omologiei și analiza evoluției în baza acestor caractere este dificilă.

Astfel, pentru identificarea și clasificarea veridică a fungilor a fost necesară abordarea unor noi procedee robuste în baza caracterelor stabile. Ca o alternativă indicilor morfologici sunt utilizați markerii ADN – secvențe genomice cu structură nucleotidică și poziție în genom cunoscute, care permit identificarea organismelor de interes. Avantajul lor pentru utilizare în sistematică este următorul:

- pot fi ușor identificați prin metode de analiză simple (PCR);
- sunt strict ereditari și variază neuniform, ceea ce permite alegerea secvențelor pentru discriminarea fungilor la nivel de diferiți taxoni;
- pot fi evaluați calitativ și cantitativ;

- este posibilă estimarea omologiei și gradului de rudenie între specii.

Metoda PCR are mai multe aplicări practice, și utilizarea acesteia în identificarea fungilor permite ocolirea mai multor probleme asociate cu sistematica ciupercilor. Metoda în sine se bazează pe amplificarea secvenței de interes și analiza structurii primare ale fragmentului obținut [171]. Astfel, procedeul se bazează pe utilizarea caracterelor genotipice, care, spre deosebire de fenotip, sunt stabile sub acțiunea factorilor de mediu. De asemenea, amplificarea moleculară necesită o cantitate mică de ADN a organismului și permite de a exclude etapa de cultivare a ciupercilor pe medii nutritive [175].

Principiul PCR presupune utilizarea ADN-polimerazei și prezintă o replicare *in vitro* a secvențelor ADN specifice [176]. Această metodă poate genera milioane de copii ale unui anumit fragment de ADN-matrice. Reieșind din cinetica PCR [176], teoretic, cantitatea matricei nu este un factor limitativ, și, ca urmare, în baza unei singure secvențe-țintă se poate genera un număr de ampliconi destul de mare pentru vizualizarea și analiza lor. Astfel, metoda permite analiza moleculară a materialului biologic rar. Deoarece PCR presupune utilizarea primerilor strict complementari unor anumite secvențe, ea permite analiza ADN-lui extras din colonii mixte de fungi, care prezintă o soluție de acizi nucleici de diferită natură [177].

Alegerea secvenței de interes pentru designul primerilor depinde de obiectivul științific. În taxonomia moleculară se utilizează mai multe regiuni genomice, care corespund anumitor cerințe. În primul rând, este esențială informația cât mai amplă despre variabilitatea regiunilor destinate pentru identificare. Actualmente, micologii cel mai des utilizează ca markeri trei secvențe – 28S, 18S, ITS din genomul fungic [178]. Regiunile 18S și 28S reprezintă secvențele clusterului de gene ribozomale, iar ITS este ADN-spacer dintre regiunile ce codifică ARN ribozomal ale subunităților mică și mare de ribozomi. Aceste secvențe se deosebesc esențial prin vitezele diferite de evoluție, ceea ce rezultă în diferite niveluri de variabilitate genetică [179]. Regiunea subunității ribozomale mici evoluează cel mai lent și manifestă puțină variație între taxoni, astfel, ea este utilizată pentru clasificarea fungilor la nivel de taxoni majori, de exemplu, ordin [179]. Regiunea subunității mari conține atât regiuni conservative, cât și două domene hipervaribile [179]; această secvență mai des se utilizează pentru clasificarea ciupercilor la nivel de gen sau familie, însă poate fi folosită și pentru identificarea speciilor. Spre deosebire de acestea, regiunea ITS manifestă cele mai înalte rate de variabilitate genetică și este utilizată pe larg pentru discriminarea speciilor, fiind aprobată de micologi ca regiunea de bază pentru tehnologia de ADN-barcodare [180, 181]. Ultima se datorează faptului, că regiunile ITS sunt înalt repetitive și ușor de amplificat [181]. ADN-barcodare (ADN-barcoding, ADN-cod-de bare) este un principiu de discriminare moleculară a

organismelor, care presupune identificarea unei anumite secvențe cu un caracter specific – rata variației interspecifice a acesteia trebuie să depășească ratele de variație intraspecifică [182]. Particularitatea dată poartă denumire de ”barcode gap” sau decalaj de barcodare și este utilizată pentru discriminarea speciilor [182]. Pe lângă ITS, mai multe secvențe sunt utilizate pentru ADN-barcodare. Aceluiași scop servesc secvențele genomice care corespund subunităților mici (SSU) și mari (LSU) de ribozomi, *RPB1*, *RPB2*, *MCM7* [183]. Însă regiunea ITS totuși rămâne cea mai larg utilizată pentru identificarea moleculară datorită ratei înalte de identificare precisă pentru un număr larg de fungi [184, 185]. Cele mai multe studii metagenomice ale fungilor folosesc regiunea ITS pentru a identifica microorganismele folosind tehnologii moderne de secvențiere, care pot ajuta la identificarea rapidă fără a fi nevoie de a sintetiza ampliconii [186]. Astfel, baza de date GenBank la moment dispune de un număr mare de secvențe ITS [187]. Avantajele regiunii ITS se mai datorează faptului, că secvențele obținute anterior pot fi folosite pentru secvențierea ADN-lui obținut din specii necunoscute [188]. Însă, cu toate avantajele sale și performanță înaltă, utilizarea regiunii ITS ca un marker universal pentru discriminarea fungilor a fost supusă dezbaterilor. S-a constatat, că markerul dat uneori este puțin efektiv pentru speciile din unele genuri de fungi, cum sunt *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* și *Trichoderma*, deoarece acești taxoni au lacune restrânse sau lipsa decalajului în regiunile ITS [173].

Spre deosebire de secvențele clusterului de ARN-ribozomal, care sunt prezente în tandem înalt repetitive, genele din clasa II, care codifică proteine, sunt mai rar utilizate pentru ADN-barcodare, deoarece mai des sunt prezente într-un număr limitat de copii în genom, sunt uneori greu de amplificat și secvențiat [185]. Totuși, este necesar de menționat rolul acestora în taxonomie și ADN-barcodare. Genele ce codifică proteine, conțin regiuni necodificatoare – introni. Uneori ele evoluează mai rapid comparativ cu secvențele ITS și au o rezoluție mai înaltă la nivel de taxoni majori, fiind utili pentru filogenia moleculară [14, 189]. Printre aceste gene cel mai frecvent sunt utilizate secvențele *RPB1*, *RPB2*, factorul de elongare-transcripție *1 $\alpha$*  (*tefl*) și gena  $\beta$ -tubulinei *tub2/BenA* [190]. Ele au fost utilizate într-un șir de studii dedicate identificării speciilor de fungi și sistematicii moleculare. Recent în filogenia moleculară a fungilor se utilizează regiunea genei *MCM7* care este mai eficientă comparativ cu alte gene ce codifică proteine, mai ales în combinația cu regiunea LSU [191].

S-a constatat, că folosirea doar markerului ITS uneori nu este suficientă pentru identificarea mai precisă la nivel de specie a fungilor din unele genuri (*Aspergillus*, *Penicillium*), iar procedura de ADN-barcodare trebuie să fie cuplată cu secvențierea unui marker secundar, de obicei anume din clasa genelor ce codifică proteine [192]. Pentru acest scop este destul de eficientă regiunea *tefl*

și poate servi drept marker secundar pentru discriminarea speciilor din aceste genuri [193]. De asemenea, pentru ADN-barcodare a fungilor din genurile *Aspergillus* și *Penicillium* în calitate de markeri secundari sunt eficiente regiunile genomice *RPB1*, *RPB2*, *tub2* și parțial *CaM* [194]. În calitate de marker secundar pentru ADN-barcoding a *Penicillium spp.* este recomandată gena *tub2* [195]. Pentru analizele filogenetice se recomandă utilizarea regiunilor *RPB2* sau *CaM* [196]. Pentru ADN-barcoding a *Aspergillus spp.* se recomandă în calitate de markeri secundari secvențele genelor *CaM*, *tub2*, *RPB2* [197]. Studii raportează că gena *cyp51A* este de asemenea de perspectivă pentru barcodarea speciilor din genul *Aspergillus* [198].

Pe lângă secvențele menționate se folosesc și alte secvențe genomice pentru discriminarea speciilor fungice și în filogenia moleculară. Utilizarea regiunii IGS plasată între genele ARNr 28S și 18S - regiunea cea mai variabilă a secvenței ADNr permite discriminarea fungilor la nivel de specie și *formae specialis* [199]. Alte secvențe includ genele de avirulență, genele *SIX*, genele mitocondriale *coxI*, *coxII* și regiunea lor intergenică [200]. Pe lângă acestea sunt menționate genele actinei, gene subunității 3 histonice H3, parțial – *GPDH*, genele proteinelor de șoc termic, care permit discreditarea formelor patogenice și nepatogenice [201]. Agenții patogeni strâns înrudiți, care posedă variabilitate diferită de plante-gazdă sau patogenitate, diferă adesea doar dintr-o singură mutație în câteva perechi de baze în genele-țintă utilizate în mod obișnuit pentru identificare [200,202].

Interes deosebit îl prezintă formele toxigenice de fungi, care nu se disting morfologic de la formele netoxigenice [203]. Genele ce reglează sinteza micotoxinelor sunt asociate în clustere ce codifică enzime implicate în căile biosintetice ale metaboliților toxici respectivi [204]. În fiecare cluster se deosebesc regiuni cu diferite niveluri de variabilitate, ceea ce permite discriminarea fungilor toxigenici la nivel de taxoni diferiți. Identificarea genelor implicate în sinteza tricotecenelor, fumonisinelor și aflatoxinelor a permis utilizarea acestor secvențe în calitate de markeri pentru identificarea speciilor-producătoare de micotoxine din genurile *Aspergillus* și *Fusarium*.

Clusterul tricotecenelor în *F. graminearum* și *F. sporotrichioides* constă din trei loci, fiecare conține una sau mai multe gene: locusul *TRII01* cu o singură genă, locusul *TRII-TRII6* cu două gene și clusterul de bază cu 12 gene (Fig. 1.3). Genele coordonează biosinteza, reglarea și transportarea micotoxinelor [204]. În genomul *F. sambucinum* și speciilor înrudite sinteza tricotecenelor este dirijată de clusterul funcțional, care de asemenea include trei loci [205]. Primul locus conține 12 gene, care codifică enzimele ce catalizează formarea isotricodermolei, hidroxilarea, acetilarea și deacetilarea în biosinteza micotoxinelor, gene ce reglează transcrierea și





#### **Fig.1.4. Organizarea clusterului de gene de biosinteză a aflatoxinelor cu includerea nomenclaturii noi și vechi (din [206])**

Utilizarea secvențelor *afl* a permis identificarea efectivă a fungilor aflatoxigenici. În baza secvențelor *aflP*, *aflR*, *aflS* a fost analizată activitatea transcripțională a clusterului biosintetic de aflatoxine la *A. flavus* [207]; secvențele în baza *omtA* (*aflP*) au fost utilizate pentru identificarea și studierea producerii de aflatoxine la *A. parasiticus* [208]; gena *pksA* (*aflC*) a fost utilizată pentru distingere raselor toxigenice de *A. ochraceus* [209]; secvențele *aflC*, *aflQ*, *aflU*, și *aflX* au fost utilizate pentru studiul toxigenității *A. nomiae* [210].

Alte secvențe de gene implicate în sinteza micotoxinelor, care au fost utilizate efectiv pentru identificarea, discriminarea și studierea profilului toxigenic la fungii din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*, includ genele *FUM* asociate cu producerea fumonisinelor la *F. proliferatum* [211], *F. fujikuroi* [212], *F. verticillioides* [213]; gena *Bea1* de sinteză a bovericinei în *F. temperatum* și *F. subglutinans* [214]; gena *brlA* pentru sinteza patulinei în *P. expansum* [215]; gena *OTAbzip* pentru sinteza ocratoxinei A în *A. niger* [216].

Astfel, bazele de date genetice dispun de un spectru larg de secvențe a genomului fungic care pot fi utilizate pentru monitoringul molecular. Informația despre regiunile conservative și variabile oferă posibilitatea de a elabora primeri efectivi pentru identificarea fungilor toxigenici la nivel de diferiți taxoni. Iar studiul extensiv asupra clusterilor de gene implicate în sinteza micotoxinelor permite utilizarea acestor secvențe cu scopul discriminării fungilor toxigenici și atenuarea oportună a riscurilor ce țin de contaminarea producției de porumb cu micotoxine. Așadar, la moment biologia moleculară dispune de un spectru larg de mijloace pentru rezolvarea mai multor probleme atât practice, cât și cele fundamentale din domeniul fitopatologiei, ecologiei și siguranței alimentare.

#### **1.4. Generalizări**

Porumbul este atacat de un spectru larg de fungi necrotrofici. Cei mai importanți fungi fac parte din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*, care cuprind agenții cauzali ai unor boli sistemice devastatoare (FER, GER) și ai deteriorării boabelor pe parcursul depozitării. Fungii din aceste genuri atacă porumbul la nivel mondial la toate etapele de dezvoltare și provoacă pierderi semnificative de recoltă ce duce la foamete în regiunile unde porumbul reprezintă principala sursă de alimentare și furaj. Un risc semnificativ este legat de faptul că acești fungi sunt capabili să sintetizeze micotoxine. Micotoxinele prezintă metaboliți secundari produse sub anumite condiții de fungi filamentosi și au un efect negativ asupra metabolismul uman și animal. Ele aparțin diferitor clase de compuși chimici, cele mai importante micotoxine fiind considerate aflatoxinele,

fumonisinele, tricotecenele, patulina. Consumul lor în cantități mici provoacă diverse dereglări ale metabolismului de la toxicoze acute până la cancerogenează. Din acest motiv cantitatea acestor substanțe în produse alimentare este strict reglementată în mai multe țări. Cantitatea și dinamica acumulării micotoxinelor în porumb sunt influențate de mai mulți factori, printre care cele mai importante sunt practicile agrotehnice de cultivare, umiditatea și temperatura, mai ales în timpul depozitării. Contaminarea producției de porumb cu micotoxine este o problemă majoră mondială, severitatea căreia depinde de zona climatică, practicile de cultivare și depozitare ale porumbului. Regiunile subtropicale și tropicale unde se practică cultivarea extensivă sunt cele mai susceptibile în privința contaminării producției cu metaboliți toxici. Însă și țările dezvoltate se confruntă cu pericolele asociate cu contaminarea porumbului cu micotoxine.

La moment, nu sunt raportate genele majore asociate cu rezistența porumbului la putregaiurile provocate de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. și *Aspergillus* spp. Rezistența la aceste boli precum și rezistența la acumularea micotoxinelor are natură cantitativă, mediată de mai mulți QTL, manifestarea cărora este influențată în mare parte de factorii de mediu. Studiile genomice prin abordarea a mai multor tehnologii moleculare pe diferite populații au elucidat factorii constitutivi și induși, care mediază rezistența la fuzarioza și aspergiloza și au permis identificarea unui număr de QTL și gene-candidate (CG) implicate în rezistența la putregaiurile tulpinii și știuleților, provocate de *Fusarium* spp. și *Aspergillus* spp., dar numai câteva gene au fost raportate ca purtători de rezistență la aceste boli și acumularea micotoxinelor la porumb. Nu sunt raportați loci asociați cu rezistența specifică la peniciloze. Un rol important în formarea rezistenței la bolile fungice joacă genele ce codifică factorii de transcripție și metaboliții secundari, implicați în căile de transducție a semnalelor. Locii asociați cu rezistența la putregaiuri sunt diseminați neuniform pe cromozomi și între populațiile de porumb din diferite regiuni de cultivare, iar implicarea fiecăruia din ei în modelarea rezistenței este diferită. Deși considerate un instrument ameliorator foarte efektiv cu potențial înalt, datele despre markerii QTL la porumb uneori sunt contradictorii, și aceste secvențe sunt greu de cartografiat și manipulat, deoarece rezistența determinată de caractere poligenice depinde de factori de mediu și mecanisme genomice ce previn asocierea mai multor loci într-un genom. Datele insuficiente sau contradictorii referitori la factorii genetici ce conferă rezistența porumbului la *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. și acumularea micotoxinelor nu permit identificarea genotipurilor de interes la nivel de screening molecular. Astfel, testările în câmp sub influența factorilor mediului înconjurător rămân la moment cea mai efektivă metodă pentru a alege soiuri și linii de porumb cu rezistență sporită la fungii menționați.

Și un factor important în abordarea efectivă a acestei strategii este identificarea rapidă și precisă a agenților cauzali asociați cu principalele boli fungice la porumb și contaminarea cu micotoxine.

Metodele tradiționale de identificare a agenților patogeni fungici includ studierea caracterelor morfologice ale acestora, cum ar fi aspectul coloniei și producerea de structuri asexuate pe medii microbiologice sau pe plantă-gazdă. Probele izolate pe medii selective pot fi observate folosind un microscop optic pentru a identifica structurile microscopice. Această metodă necesită mult timp și numai coloniile mature pot fi evaluate. Ocazional, coloniile pot produce conidii doar sub anumite condiții speciale. Recunoașterea simptomelor infecției externe induse de fungi pe plantă-gazdă poate fi folosită și pentru a verifica agentul patogen, deși majoritatea speciilor nu sunt specifice gazdei și plantele pot fi infectate de mai multe specii. Lipsa specificității și diferențele de simptome între populațiile de plante de la diferite latitudini fac foarte dificilă sau chiar imposibilă o identificare precisă bazată doar pe morfologia coloniilor.

Astfel, pentru identificarea și clasificarea veridică a fungilor a fost necesară abordarea unor noi procedee robuste în baza caracterelor stabile. Spre deosebire de caracterele morfologice, markerii moleculari prezintă avantaje semnificative, și anume: sunt strict ereditari, variabilitatea neuniformă și evoluția predictivă permite alegerea secvențelor nucleotidice pentru clasificarea fungilor la nivel de taxoni majori și taxoni minori, permit efectuarea atât a analizei calitative, cât și cantitative, permit estimarea simplă a homologiei moleculare, permit deducerea nivelului rudeniei între speciile îndepărtate, sunt abundenți în genom și pot fi identificați prin metode moleculare rutine, cum ar fi PCR.

Abordarea tehnicilor de diagnostic molecular în baza PCR cu primeri la secvențe genomice specifice fungilor patogeni permite evaluarea rapidă și efectivă a unui număr mare de eșantioane și discriminarea fungilor la nivel de familie, gen, specie, tulpină. Un ultimii ani metoda PCR și modificările sale sunt folosite pe larg pentru identificarea patogenilor vegetali, în primul rând a celor specii care sunt greu de identificat prin metode clasice.

## 2. Materiale și metode

**Material biologic și prelevarea probelor.** În studiul au fost folosite genotipurile de porumb din colecția activă IGFPP: CP137, MK01, KU123, B73, CP148, MAN2281, MAN2459, MAN2461, MAN2451, MAN2308, MAN2526, MAN2425, MAN2452, MAN2414, MAN2413, MAN2424, MAN2448, MAN2488, MAN2493, MAN2491, MAN2483, MAN2470, MAN2466, MAN2463. Plantele au fost cultivate pe loturile experimentale ale IGFPP în perioada 2019-2022 cu respectarea procedeelelor agrotehnice pentru cultura dată. Pentru analiza stării fitosanitare a câmpurilor de porumb și materialului semincer depozitat au fost folosite frunze și boabe, iar pentru analiza gradului de rezistență/susceptibilitate a unor genotipuri au fost folosite boabe mature. Boabele de porumb au fost colectate la faza de maturitate fiziologică (M6) cu umiditatea <30%. Materialul colectat a fost păstrat în camere frigorifice în pachete zip-lock. Înainte de extragerea acizilor nucleici mostrele au fost tratate cu soluția 2% CaOCl<sub>2</sub> și spălate cu apă distilată pentru eliminarea impurităților și microflorei superficiale. Probele au fost selectate prin randomizare simplă și clusterizată: din 6-10 plante, colectate randomizat, s-a pregătit proba totală, care s-a analizat în 6 repetiții. Plantele au fost analizate în baza ratei de infectare cu diferite specii de fungi și indicii morfologici asociați cu cedarea apei: numărul de pănuși pe știulete, diametrul coceanului, numărul de rânduri de boabe pe știulete, acoperirea știuletelui cu pănuși, perioade înflorire-coacere. Mostrele de sol au fost colectate de pe loturile experimentale plantate cu porumb la sfârșitul sezonului de vegetație.

**Extragerea și purificarea acizilor nucleici.** Extragerea ADN-lui din material vegetal a fost efectuată prin metoda elaborată în baza protocoalelor de extragere cu soluțiile tampon CTAB și SDS [217–219]:

1. 1 g de material vegetal se omogenizează în mojar cu adăugarea 3 ml de tampon de extracție 5% SDS (A1, Tab.1);
2. Masa omogenizată se transferă în eprubete de 10 ml și se incubează timp de 1 oră la temperatura de 65°C;
3. Se adaugă 0,5 V de acetat de amoniu (7,5 M), 10 mg de PVP(M=360 kda) la fiecare ml de tampon, se amestecă prin inversie și se incubează la 4°C timp de 30 min;
4. Centrifugarea 20 min la 4000 rpm;
5. Supernatantul se transferă în eprubetă nouă, se adaugă volum egal de alcool izopropilic și se incubează la 4°C timp de 30 min. În caz când nu apare sedimentul eprubetele se lasă la 4°C peste noapte;
6. Centrifugarea 20 min la 4000 rpm;

7. Sedimentul se usucă și se resuspendează în 500 μl de NaCl (1,2 M), apoi se transferă în eprubete de tip Eppendorf;
8. Se adaugă volum egal de cloroform-alcool izoamilic (24:1), se inversează și se centrifughează 10 min la 10 000 rpm;
9. Supernatantul se transferă în eprubetă nouă și se repetă punctul 8;
10. Supernatantul se transferă în eprubetă nouă, se adaugă 2 V de etanol rece (96%), se inversează și se incubează la -18°C peste noapte;
11. Eprubetele se centrifughează 10 min la 10 000 rpm;
12. Sedimentul se usucă și se resuspendează în 300 μl de tampon de extracție CTAB (Anexa 1). În cazul dacă sedimentul nu se dizolvă eprubetele se incubează la 55°C;
13. La soluție se adaugă 2 V de tampon de sedimentare CTAB (A1, Tab.1), se incubează 1 oră (sau peste noapte) la temperatura camerei (20°C);
14. Se centrifughează 10 min la 10 000 rpm;
15. Sedimentul se spală în etanol 70%;
16. Se centrifughează 2 min la 10 000 rpm;
17. Sedimentul se spală în etanol 85%;
18. Se centrifughează 2 min la 10 000 rpm;
19. Sedimentul se usucă și se dizolvă în 200 μl de apă distilată și autoclavată.

Extragerea ADN-lui total din mostre de sol a fost efectuată în baza protocolului ISO cu modificări [220]:

1. 0.5 g de sol se omogenizează în mojar cu 0.5 g de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apoi se transferă în eprubetă de 10 ml;
2. Se adaugă 2 ml de tampon de extragere SDS și se incubează la 65°C timp de 1 oră;
3. Suspensia se răcorește, se adaugă 120 mg de PVP (M=360 kda) și 0.5 V de acetat de amoniu (7,5 M). Se incubează timp de 30 min la 4°C;
4. Se centrifughează 10 min la 4000 rpm. Supernatantul se transferă în eprubetă nouă;
5. Se adaugă volum egal de alcool izopropilic și se incubează la -20°C timp de 30 min;
6. Se centrifughează 10 min la 8000 rpm la 4°C;
7. Sedimentul se spală cu alcool izopropilic 80% și se usucă la temperatura camerei;
8. Se adaugă 1 ml de tampon de extragere CTAB și se incubează timp de 30 min la 65°C;

9. Se adaugă 2 ml de tampon de sedimentare CTAB și se incubează 1 oră la temperatura camerei;
10. Se centrifughează 20 min la 8000 rpm;
11. Sedimentul se dizolvă în 350 μl de NaCl 1,5 M și se transferă în eprubetă de tip Eppendorf;
12. Se adaugă 350 μl de cloroform și se centrifughează 10 min la 12000 rpm;
13. Supernatantul se transferă în eprubetă nouă și se adaugă 2 V de etanol 96% rece, se incubază la -20°C peste noapte;
14. Se centrifughează 10 min la 10 000 rpm;
15. Sedimentul se spală în etanol 70%;
16. Se centrifughează 2 min la 10 000 rpm;
17. Sedimentul se spală în etanol 85%;
18. Se centrifughează 2 min la 10 000 rpm;
19. Sedimentul se usucă și se dizolvă în 200 μl de tampon TE (Anexa 1).

**Primeri.** Identificarea speciilor de fitopatogenilor fungici a fost efectuată în baza reacției PCR și modificărilor sale (PCR convențională, nested-PCR, qPCR) cu set de primeri specifici, elaborați în laboratorul Genetica moleculară (IGFPP).

Primerii pentru identificarea speciilor de fungi netoxigenice au fost elaborați în baza secvențelor genelor house-keeping din genomul fungilor (Tab.2.1 ).

**Tabelul 2.1. Primerii elaborați pentru identificarea moleculară a fungilor patogeni asociați porumbului**

Primer	Secvența 5'→3'	Specia	Gena
aoch1	CAGGATCATCTTCGATACCTTAGGA	<i>A. ochraceus</i>	<i>tub2</i>
aoch4	GCCACCGGAAGCCTAGAAG		
aqoch2*	ACCCATCGAAATCAGAGTCGAAAA		
aqoch3*	CGTTTCGAATAGGCGAAAGGAGATA		
acl1	TGATGGAAGATTCAGAGCCATACA	<i>A. clavatus</i>	<i>tub2</i>
acl4	CGTGAAGGTTTTGTGCGAAGCA		
aqcl2*	CGTGGATATGGGCTGACAGATTTA		
aqcl3*	ATTTCCATCAGATCCATGCTCAGT		
fbt1	TCAGACCGGTCAGTGCGTAA	<i>Fusarium spp.</i>	<i>tub2</i>
fbt4	CCATCATGTTCTTGGGGTTCGAA		
fbt2	AGCTGTCCAACCCCTCTTACG		
fbt3	CAGCGCGAAAGAGTGAGC		
fqcbt1*	CACGGTCTCGACAGCAATGG		
fqcbt2*	CGGCACGGGGAACATACTTG		
feqin1	CTGGGCTTCGGCAGGTCAA	<i>F. equiseti</i>	<i>tub2</i>
feqin4	GCGCGTGAGCTTGTGTGTT		
fpeqin2*	TCCCCAGAATCAATACGCTAACC		

fqqin3*	TCACTGGGTAACAAGGTCGAAGA		
fqin1*	ACGTGGCGGGGTAATTTTCAT	<i>F. incarnatum</i>	<i>tef1</i>
fqin2*	GGAAACCAACCTTCTCGAACTTCT		
fspte1	CAGACTTGGCGGGGTAGTTTC	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>tef1</i>
fspte4	GAGCGTCTGGTAGGCATGTT		
fqspte2*	CTCTCATACGACGACTCGACAAG		
fqspte3*	TGTGTGGGAAGGGCAAAGC		
fcute1	CATCCCAACCCCGCCGATA		
fcute4	CGCGCCTAGGGAATGGTTTG	<i>F. culmorum</i>	<i>tef1</i>
fcute2	CGATACATGGCGGGGTAGTTT		
fcute3	ATGAGCCCCACCAGAAAAATTACG		
pcit1	CCTTGATGGCGATGGACAGT		
pcit4	CAGCACCGGATTGACCGAAA		
pcit2	CTACAACGGAACCTCCGATCTC	<i>P. citrinum</i>	<i>tub2</i>
pcit3	AGCACCGGATTGACCGAAA		
pqcit15*	CCTTGATGGCGATGGACAGT		
pqcit6*	GGAGATCGGAGGTTCCGTTGTA		
pex1	AACGCCACTCTCTCCGTTCA		
pex4	GGGTCAACTCGGGGACGTT		
pex2	CTCTCTCCGTTACCAGCTT	<i>P. expansum</i>	<i>tub2</i>
pex3	TCAACTCGGGGACGTTGAC		
pqex5*	ACGCCACTCTCTCCGTTCA		
pqex6*	GCGGAGACAAGGTGGTTCAG		
pgr1	TGGATTACAGGCAAACCATTTC		
pgr4	ACCGTAGCCTAGATGATCAAA		
pqgr2*	CCAGTGGATGGCATGTCTGAT	<i>P. griseofulvum</i>	<i>tub2</i>
pqgr3*	TTCGGTTCAGTTCGGCTAT		
pqgr5*	CCAGTGGATGGCATGTCTGAT		
pqgr6*	TCCCAGTTCGGCTATACTACA		
pver1	ATTGACGGGTTCCCTAACTTGGATT		
pver4	ATGCACGTTTATTCCGGTTCCA		
pqver2*	TCGATGGTGACGGACAGTAAGT	<i>P. verrucosum</i>	<i>tub2</i>
pqver3*	GGTTCAGTCGTTGAACTCACAT		
pqver5*	AATTGACGGGTTCCCTAACTTGGATT		
pqver6*	CAGACGTGCAATCCACCAGAA		
pbrbt1	CCGCTATGGCTGGGTATCAAT		
pbrbt4	TAGCCTGGGCGGTCAAGAATA		
pbrbt2	TGCTAACTGGCTCAAAGGCAAA	<i>P. brevicompactum</i>	<i>tub2</i>
pbrbt3	TGCACAACCAGAGTTCTTCACA		
pqbrbt5*	AACTGGCTCAAAGGCAAATATCT		
pqbrbt6*	TGCACAACCAGAGTTCTTCACAT		
pchbt1	GTTGCTAACTGGATTACAGGCAAAC		
pchbt4	CACCGCTGGCCTAGATTGTC		
pqchbt2*	TGATGGGGATTCTGGTGGATCA	<i>P. chrysogenum</i>	<i>tub2</i>
pchbt3*	CCGCTGGCCTAGATTGTCAAA		

\*primeri utilizați în qPCR

Primerii pentru identificarea speciilor de fungi toxigenici au fost elaborați în baza secvențelor genomice implicate în sinteza aflatoxinelor, tricotecenelor, fumonisinelor, patulinei, zearalenonei (Tab. 2.2)



**Tabelul 2.2. Primerii elaborați pentru identificarea moleculară a fungilor toxigenici asociați cu porumbul**

Primer	Secvența 5'→3'	Specia	Gena
moch1	GCCGCAAGGTCAGTGAATGT	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	<i>nrps</i>
moch4	CAGCTCGGCTCGATCAACAG		
moch2	GGCTTCGTGTTGTCCCTTCT		
moch3	TGGGTTGAACTTCTCGCCATT		
mqoch7*	TGAAATGGAACACGTCGAGAATGG		
mqoch8*	CCACAGGTTGGGGATAGTTGGA		
mpat1	GTGCTCGAACCCTCACCAAT	<i>P. expansum</i>	<i>idh</i>
mpat4	TCCTGGGGAGATGGCATTGA		
mpat2	TAGCAAAGATTCCTCGTCAAGTG		
mpat3	AGTGGGACAGTTCCTGGACAT		
mqpat1*	ACTCGGACGAATTGACGTGATTAT		
mqpat2*	CCAGCTCAACGAAACCCATGA		
mze1	TGGCATGATGTGAGCCACCA	<i>F. equiseti</i>	<i>PKS13</i>
mze4	GTTGCCCGTGTCCGACAATAC		
mze2	CTTGGATGCGACGCCTACAC		
mze3	GCGACGGCCATATCTGTTTCC		
mqze1*	AGATATGGCCGTGCTGGAG		
mqze2*	TTGCCCGTGTCCGACAATAC		
mafl1	CCGAAAGCTCCGGGATAGC	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>aflR</i>
mafl4	CAGTGTTTGTAGTGCTAGCGAAAAG		
mafl2	GTGCGATGCACCAAGGAGAA		
mafl3	CAGAGCGTGTGGTGGTTGATT		
mqaf1*	AAGTGCGAGGCAACGAAAAGG		
mqaf2*	ACAGCTATCCCGGAGCTTTCG		
ftri8gr1	CTTCCGGTAATGTTTCTCGTCACT	<i>F. graminearum</i>	<i>TRI8</i>
ftri8gr4	CGCTGCTGAGGGTTTACCAT		
fqtri8gr2*	CTCGTCACTTCCTTGATGACACA		
fqtri8gr3*	GGGGGCCGACATTCCTC		
fufum6ve1	GCCTTTGTTTGGGGCCATGA	<i>F. verticillioides</i>	<i>FUM6</i>
fufum6ve4	CTGAGACCCTCGCCAGTTTTG		
fqfum6ve2*	TCGCCCTTGCACCATTGAC		
fqfum6ve3*	AGCCTGCCGCTTGAACCTTG		
fprfum61	TCGGATTGTCACGCCTTTGT	<i>F. proliferatum</i>	<i>FUM6</i>
fprfum64	GTCCTTGGCGTTCAGCATTG		
fqprfum62*	ATCGCCCTCTGCACGATAGA		
fqprfum63*	TGGGAGTTGCTCTGAGTGA		
afaq1	ACTGCCCAAAGGTGCTCTTC	<i>A. flavus</i>	<i>aflQ</i>
afaq4	TACAAACCGACCGGGGCATA		
aqfaq3*	ACACCCGTCCATTGATTCTCCTA		
aqfaq4*	GTTTCTGGCGGGGAGTCTTTT		
aqfaq5*	GGTGCTCTTCTACTGCCGAAT		
aqfaq6*	GTTTCTGGCGGGGAGTCTTTT		
apap1	TTGCTCGGTAGTGCCATGTT	<i>A. parasiticus</i>	<i>aflP</i>
apap4	GGCTTCCATAACACATATTCTCCAA		

aqpap2*	CCGCGAAAGAACAAACAGAGA		
aqpap3*	AACACATATTCTCCAACCTTCTTGCT		
afap1	CTTTGTTCCGGTAGTGCCATCTTGA	<i>A. flavus</i>	<i>aflP</i>
afap4	GCCATAGCACATATTCTCCAACCT		
aqfap2*	GTGTCCGGTGTGCCTATTTAACC		
aqfap3*	AAGGCTTTCGGTCCGGTTGATG		
aqfap5*	CCAACAGAGAGCTGGGAAGTC		
aqfap6*	GCCATAGCACATATTCTCCAACCT		
mtri11cu1	CGGCAAGGCGAATGTCAAAC	<i>F. culmorum</i>	<i>TRI11</i>
mtri11cu4	GCAGCCGTCTACTTCCTATGC		
mtri11cu2	TCGTTCTCAACCAAGGTCTGT		
mtri11cu3	AGAGGTCCGGTCTACATACACA		
mqtri11cu7*	AGTCCCTGTGTAGATAACAAGGTCAA		
mqtri11cu8*	TTGCTCTCTGCAGCCGTCTA		
mtri11sp1	AAGATCACACAAGGGCTGAAATCT	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>TRI11</i>
mtri11sp4	CGTGTGGTTGAGTGAAATACTTTGG		
mtri11sp2	GACGACTGCTACCCTGCTTTC		
mtri11sp3	CATGTCGTTCTCAACCAAGGTCTA		
mtri8cu1	GTCCCCTTCTGGAAGTACTTGTT	<i>F. culmorum</i>	<i>TRI8</i>
mtri8cu4	TGGTATACTGCACCTCCTGGAT		
mtri8cu2	AGCGCGAATTGAGTCCAAAGT		
mtri8cu3	CTGCGCCTGGAAACTTAACCA		
mqtri8cu7*	CGCGCTTTGTTGGTACTTCTG		
mqtri8cu3-8*	CTGCGCCTGGAAACTTAACCA		
mtri8sp1	ATCGTACAACCGACAGTCATTTCA	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>TRI8</i>
mtri8sp4	GACAGAGTGCATGAAGGTAGTGA		
mtri8sp2	TCGTTTCTGTTCCAGATTACGAGG		
mtri8sp3	GACAGAGTGCATGAAGGTAGTGA		

\*primeri utilizați în qPCR

Genotiparea plantelor de porumb a fost efectuată în baza secvențelor elementelor mobile [221] ale genomului plantelor (Tab.2.3).

**Tabelul 2.3. Primerii elaborați în baza elementelor mobile ale porumbului**

Primer	Secvența 5'→3'	Clasa de element
D1	GCAGGCTGGAAGAGCAGAAG	Activator
D2	CCCGTCCGATTTGACTTT	Activator
D5	CCCTTGTTGTGCATGAAGA	CACTA
D6	GCACCTGACGCATCCAGAA	CACTA
D8	CCGAGTTCAGCGCTATAACGA	Far1
D10	CATGGCTTGCTGATTCGTGAA	Far1
D12	GGTTGAAGCAGTTAAGGCCTCA	MuDR
D14	TCATCATCTACGGAAGGGTTGTC	MuDR
pb3	GCTCCGATGCCA	iPBS
pb4	CTCACGATGCCA	iPBS
pb5	GCGGAGTCGCCA	iPBS
pb6	AGGTGGGCGCCA	iPBS
pb20	GGCTCAGATGCCA	iPBS

**Amplificarea și vizualizarea produselor.** Protocolul PCR convențională include denaturarea inițială de 3 min la 94°C, urmată de 45 de cicluri: denaturarea 30 sec la 94°C, alinierea 30 sec la 55-60°C în dependența de valorile  $T_m$  (A2, Tab.1), elongarea 30 sec la 72°C. Amplificarea se finisează cu elongarea terminală de 7 min la 72°C.

Protocolul nested-PCR pentru identificarea patogenilor include două runde consecutive. Runda I constă în denaturarea inițială de 3 min la 94°C, urmată de 30 de cicluri: denaturarea 30 sec la 94°C, alinierea 30 sec la 55-60°C, elongarea 30 sec la 72°C. Amplificarea se finisează cu elongarea terminală de 7 min la 72°C.

Runda II constă în 30 de cicluri: denaturarea 30 sec la 94°C, alinierea 30 sec la 55-60°C, elongarea 30 sec la 72°C. Amplificarea se finisează cu elongarea terminală de 7 min la 72°C.

Protocolul qPCR include denaturarea inițială de 4 min la 94°C, urmată de 40 de cicluri: denaturarea 15 sec la 94°C, alinierea 30 sec la 60°C, extinderea 30 sec la 72°C.

Analiza calității ADN-ului izolat și separarea produselor amplificării a fost efectuată în gel de agaroză 1,5-2% cu adăugarea bromurei de etidiu, tampon de migrare 1xTBE, fragmentele de interes au fost comparate cu markeri moleculari comerciali (ThermoFisher Scientific). Timp: 1 h la 6V/cm. Vizualizarea s-a efectuat în razele UV la lungimea unde 302 nm.

**Identificarea și cuantificarea micotoxinelor.** Analiza fumonisinei B1, aflatoxinei B1, zearalenonei, DON, toxinei T-2 și ocratoxinei A în mostre de bob de porumb a fost efectuată cu utilizarea kit-urilor comerciale ELISA (Elabscience) conform protocolului furnizat de către producător [222].

Extragerea aflatoxinelor totale:

1. Se omogenizează 2 g de boabe și se transferă în eprubetă pentru centrifugare;
2. Se adaugă 5 ml de 70% metanol, se oscilează timp de 5 min, se centrifughează la 4000 rpm timp de 10 min la temperatura camerei;
3. Se colectează 500  $\mu$ l de supernatant, se transferă în eprubetă de tip Eppendorf, se adaugă 500  $\mu$ l de apă deionizată, se amestecă;
4. Se colectează 50  $\mu$ l de soluție pentru analiză;

Extragerea fumonisinei B1:

1. Se omogenizează 1 g de boabe și se transferă în eprubetă pentru centrifugare;
2. Se adaugă 5 ml de apă deionizată, se amestecă timp de 5 min, se centrifughează la 4000 rpm timp de 10 min la temperatura camerei;

3. Se colectează 100  $\mu$ l de supernatant, se transferă în eprubetă de tip Eppendorf, se adaugă 900  $\mu$ l de tampon de reconstituire, se amestecă 2 min;

4. Se colectează 50  $\mu$ l de soluție pentru analiză;

Extragerea DON:

1. Se omogenizează 2 g de boabe și se transferă în eprubetă pentru centrifugare;

2. Se adaugă 10 ml de apă deionizată, se amestecă timp de 5 min, se centrifughează la 4000 rpm timp de 10 min la temperatura camerei;

3. Se colectează 100  $\mu$ l de supernatant, se transferă în eprubetă de tip Eppendorf, se adaugă 900  $\mu$ l de tampon de reconstituire, se amestecă 2 min;

4. Se colectează 50  $\mu$ l de soluție pentru analiză;

Extragerea toxinei T-2

1. Se omogenizează 2 g de boabe și se transferă în eprubetă pentru centrifugare;

2. Se adaugă 20 ml de metanol 60%, se amestecă timp de 5 min, se centrifughează la 4000 rpm timp de 10 min la temperatura camerei;

3. Se colectează 1 ml de supernatant, se transferă în eprubetă nouă, se diluează cu apă deionizată în raport 1:5;

4. Se colectează 50  $\mu$ l de soluție pentru analiză;

Extragerea ocratoxinei A:

1. Se omogenizează 4 g de boabe și se transferă în eprubetă pentru centrifugare;

2. Se adaugă 10 ml de metanol 70%, se amestecă timp de 5 min, se centrifughează la 4000 rpm timp de 10 min la temperatura camerei;

3. Se colectează 1 ml de supernatant, se transferă în eprubetă nouă, se adaugă 1 ml de 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, se amestecă;

4. Se colectează 50  $\mu$ l de soluție pentru analiză;

Extragerea zearalenonei:

1. Se omogenizează 2 g de boabe și se transferă în eprubetă pentru centrifugare;

2. Se adaugă 8 ml de metanol 90%, se amestecă timp de 5 min, se centrifughează la 4000 rpm timp de 10 min la temperatura camerei;

3. Se colectează 500 µl de supernatant, se transferă în eprubetă nouă, se adaugă 1 ml de 90% metanol, se amestecă;

4. Se colectează 500 µl de supernatant, se transferă în eprubetă nouă, se adaugă 2 ml de apă deionizată, se maestecă;

5. Se colectează 50 µl de soluție pentru analiză;

Coeficient de diluție: 60;

Limita de detecție: 18 ppb.

Cuantificarea micotoxinelor:

1. 50 µl de supernatant se colectează pentru analiză;

2. În godeurile pe placa de microtitrare se adaugă câte 50 µl de soluție pentru analiză și 50 µl de HRP-ligand, apoi 50 µl de soluție AWS;

3. Placa se acoperă cu staniol și se incubează 30 min la 25°C;

4. În fiecare godeu se adaugă 300 µl de tampon de spălare și se spală godeurile.

Procedura se repetă de 5 ori la intervale de 30 sec;

5. Se adaugă 50 µl de reagent A și reagent B în fiecare godeu. Se amestecă atent și se incubează 15 min la 25°C;

6. Se adaugă 50 µl de stop-soluție, se amestecă;

7. Se măsoară densitatea optică la lungimea de undă 450 nm (lungimea de referință - 630 nm). Procedura trebuie să fie finisată în timp de 10 min după reacție;

Se construiește curba de calibrare în baza probelor-standard și se estimează cantitatea de micotoxine în mostre de interes.

**Prelucrarea datelor.** Pentru analiza datelor au fost folosite următoarele teste statistice și indice:

Evaluarea distribuției: testul Shapiro-Wilk ( $p < .05$ );

Evaluarea varianței: testul Levene ( $p < .05$ );

Coeficientul de corelație Pearson:  $r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$ , unde  $n$  – numărul

de perechi în eșantion,  $x, y$  – valorile din două mulțimi comparabile;

Compararea valorilor medii: testele one-way ANOVA, Student ( $p < .05$ );

Clusterizarea: UPGMA, coeficientul Manhattan, eficacitatea clusterizării a fost evaluată prin compararea matricelor cofenetice [223];

Conținutul informației polimorfe (pentru markeri dominanți):  $PIC = 1 - (p^2 + q^2)$ , unde  $p$  – frecvența alelei,  $q$  – frecvența alelei nule ( $1 - p$ ); [224]

Rata polimorfismului:  $PP = \frac{n_p}{n} * 100$ , unde  $n_p$  – numărul benzilor polimorfe,  $n$  – numărul total de benzi generate de primer; [224]

Puterea de rezoluție a primerului:  $R = \sum BI_i$ , unde informativitatea ampliconului  $BI_i = 1 - (2 * |0.5 - p|)$ ,  $p$  – frecvența alelei; [224]

Rata de multiplexare efectivă:  $E = n_p * \left(\frac{n_p}{n}\right)$ , unde  $n_p$  – numărul de benzi polimorfe,  $n$  – numărul total de benzi generați de primer; [224]

Indicele markerului:  $MI = E * PIC$ ; [224]

Puterea de discriminare a primerului:  $D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_i^K n_i(n_i - 1)$ , unde  $N$  – numărul de genotipuri,  $K$  – numărul de paterne distincte,  $n_i$  – numărul de ampliconi per genotip generat de primer [224].

**Utilaj de laborator, dispozitive, aplicații utilizate.** Pentru efectuarea analizelor au fost folosite:

Amplificatoare: GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific, SUA), CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, SUA);

Centrifuga: EBA 200 (Hettich), Mikro120 (Hettich), Microspin FV-2400 (Biosan), Mikro22R (Hettich);

Cuantificarea ADN-lui: NanoDrop Genova Nano (Jenway);

Termostat: CH-100 (Biosan);

Echipament de laborator optice și de precizie transiluminator UV, 312 nm;

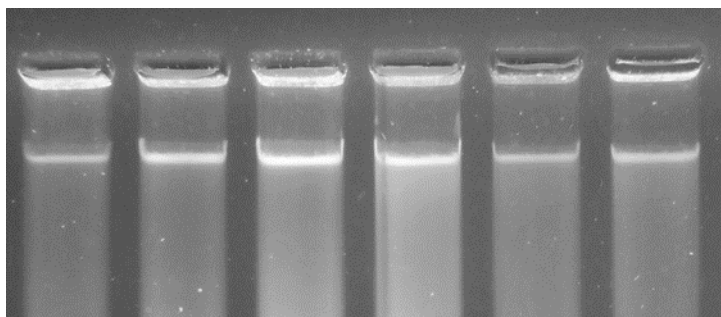
Laminar-boxe, hote.

Aplicațiile SOFT: GelAnalyzer (Istvan Lazar Jr. & Istvan Lazar Sr. ©, 2010), Microsoft Office 2013 (Microsoft ©, 1975), PSPP (GNU Project ©, 1983), POPGENE ver. 1.32 (F., Yeh, R., Yang, T., Boyle, Z., Ye, J., Mao ©, 1999), GIMP ver. 2.10.24 (GNU Project ©, 1983), Primer3 ver. 4.1.0 (A., Untergasser, M., Remm, T., Koressaar & H., Skaletsky ©, 1996).

### **3. Testarea primerilor și optimizarea protocoalelor PCR pentru analiza calitativă și cantitativă a fungilor patogenici în mostre de material vegetal și sol**

#### **3.1. Testarea primerilor *de novo* pentru cuantificarea unor fungi toxigenici și potențial toxigenici prin nested-PCR**

Efectuarea reacției PCR necesită ADN-matrice pur în cantități optime pentru amplificarea veridică a secvenței de interes și absența inhibării cauzate de impurități și supraîncărcare cu matrice. Obținerea benzilor clar definite cu masă moleculară mare în urma electorforezei în gel de agaroză corespunde ADN-ului genomic extras destul de pur și integru pentru efectuarea majorităților de analize PCR (Fig.3.1). Parametrii de electroforeză: tampon 0,5xTBE, gel 1% agaroză, 6V/cm de gel, 45 min.



**Fig.3.1. Electroforegrama mostrelor de ADN total extras din boabe de porumb prin metoda combinată SDS-CTAB**

Pentru identificarea precisă a patogenilor și diagnosticarea bolilor fungice prin metode moleculare este esențial de a elabora primeri specifici pentru fiecare taxon și un protocol PCR veridic. Obținerea ampliconilor ce corespund secvenței de interes și lipsa sintezei de produși nespecifici definesc amplificarea reușită.

Eficacitatea metodei nested-PCR constă în specificitatea sporită datorită utilizării a două perechi de primeri în două runde de amplificare, unde perechea externă joacă rol de matrice pentru amplificarea subsecventă a secvenței de interes cu primerii interiori în runda a doua. Astfel, se micșorează riscul de amplificare nespecifică, care poate duce la rezultate fals-negative din cauza concurenței dintre situsurile de aliniere a primerilor pe ampliconii de interes și a celor nespecifici, generați în fiecare ciclu de PCR. Spre deosebire de qPCR, nested-PCR nu necesită reactivi specifici adiționali (ex. SYBR Green) și aparat de amplificare real-time, care sunt destul de costisitori. Reacția poate fi efectuată într-un termocycler destinat PCR convenționale. Din acest

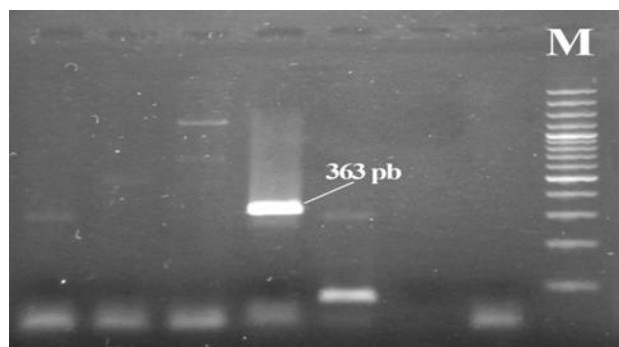
punct de vedere, este rațional de a utiliza nested-PCR pentru screening-ul calitativ al eșantioanelor de material vegetal și selectarea mostrelor pentru analiza cantitativă prin qPCR.

Eficacitatea primerilor pentru nested-PCR a fost evaluată în două etape: evaluarea specificității cu ajutorul metodelor bioinformatică (analiza BLAST) și optimizarea parametrilor PCR pentru obținerea ampliconului specific, caracteristicile cărora corespund particularităților esențiale. Diferența procedurii constă în faptul, că concomitent se analizează doi ampliconii sintetizați subsecvent cu două perechi de primeri diferiți. Astfel, pasul critic constă în elaborarea primerilor înalt specifici secvenței de interes în prima rundă – obținerea heteroduplexului nespecific din cauza neconcordanței dintre secvențele nucleotidice ale primerului și ADN-matrice induce sinteza prioritara de amplicon nespecific și obținerea rezultatelor fals-negative în runda a doua.

Amplificarea este totdeauna un pas necesar pentru testarea primerilor chiar și în cazul complementarității ideale dintre oligonucleotide și matrice, deoarece parametrii reacției PCR trebuie să fie optimizați reieșind din particularitățile amplificatorului utilizat, reactivi pentru efectuarea reacției de polimerizare, calitatea și cantitatea ADN-matrice, etc. Parametrul critic este temperatura de aliniere, deoarece temperatura prea joasă duce la generarea ampliconilor nespecific, iar temperatura prea înaltă poate duce la degradarea primerilor pe parcursul ciclurilor de amplificare și scăderea sau chiar lipsa ampliconilor de interes (rezultat fals-negativ). Astfel, pentru micșorarea riscului amplificării nespecifice este necesar ca alinierea primerilor să fie efectuată la temperaturi cât mai ridicate, iar temperatura optimă fiind în limitele valorilor, când dispar benzile nespecifice și la mărirea ulterioară a temperaturii de aliniere începe să dispară și ampliconul de interes. S-au testat experimental temperaturile de referință între 50°C și 65°C. Numărul ciclurilor a variat între 30-35 pentru o rundă.

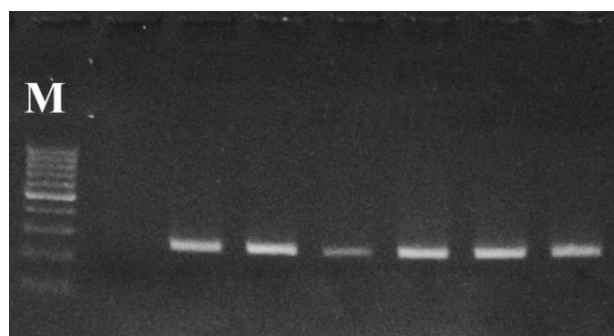
Analiza BLAST a perechilor pex1-pex2 și pex3-pex4 a demonstrat, că deși perechile sunt înalt specifici secvenței tub2 din genomul *P. expansum*, ele se pot alinia și cu alte secvențe din genomul *Penicillium* spp. și *Aspergillus* spp. din cauza complementarității parțiale. Efectuarea amplificării cu alinierea primerilor la temperatura de 55°C în cel puțin o rundă a indus sinteza nespecifică, iar la temperatura de 65°C au dispărut ampliconii de interes din cauza degenerării heteroduplexului matrice-primer (Fig.3.2). Doar alinierea primerilor la 60°C în runda I și II a generat o bandă de 363 pb.





**Fig.3.2. Electroforegrama ampliconului de interes obținut cu primerii pex1-pex2, pex3-pex4 la alinierea de 60°C. M – marker molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (material – ADN extras din frunze de porumb)**

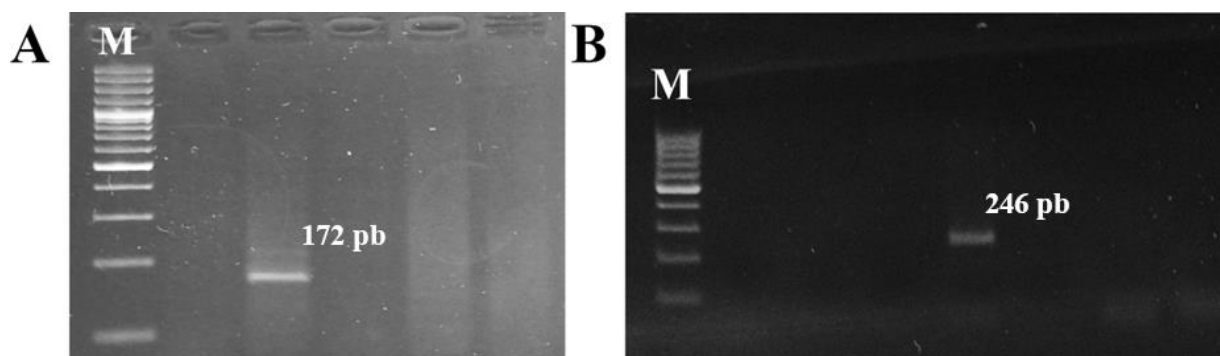
Pe lângă aceste perechi de primeri pentru identificarea *P. expansum* au fost elaborate și perechile pebt1-pebt4, pebt2-pebt3, de asemenea complementari secvenței genei *tub2*. Primerii au demonstrat specificitate înaltă și pot fi folosiți ca alternativă pentru perechile pex1-pex4, pex2-pex3 (Fig.3.3). Parametrii nested-PCR: 60°C în runda I și II, 30+30 cicluri de amplificare, în calitate de material s-a folosit ADN-ul extras din boabe de porumb de diferite genotipuri.



**Fig. 3.3. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii pebt1-pebt2, pebt3-pebt4. M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific**

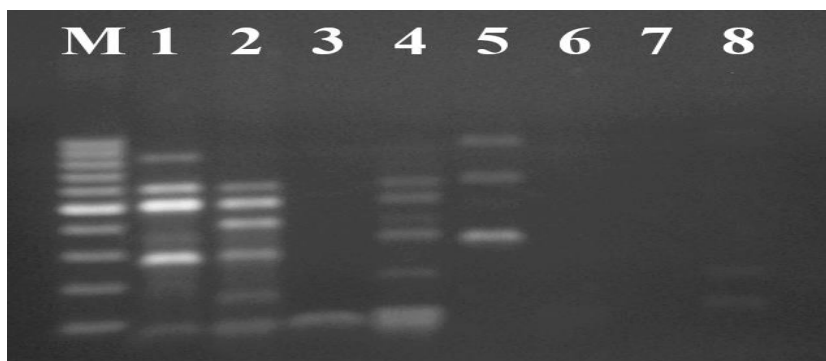
La rândul său, două perechi de primeri au fost elaborați pentru identificarea *P. chrysogenum*. Prima pereche pch2-pch3, complementară clusterului ribozomal *18S*, a fost folosită pentru efectuarea PCR convențională, iar perechile pchbt1-pchbt4 (runda I) și pchbt2-pchbt3 (runda II) complementare genei *tub2* au fost folosite pentru amplificarea în nested-PCR. Perechii pch2-pch3 îi corespunde ampliconul cu masa 246 pb, iar primerii elaborați în baza genei beta-tubulinei au generat un fragment de 172 pb, care se observă pe electroforegrame (Fig.3.4). Parametrii amplificării primerilor la gena *tub2*: alinierea la 60°C în runda I și II, 30+30 cicluri de amplificare. Parametrii amplificării primerilor la gena *18S*: Ta=60°C, 45 cicluri de amplificare într-o rundă. Astfel, perechile de primeri în baza secvențelor a două gene de menaj din genomul *P. chrysogenum* au fost la fel de efective pentru identificarea speciei respective. Avantajul perechii

pch2-pch3 constă în faptul, că ia poate fi folosită pentru amplificarea veridică într-o singură rundă și demonstrează o rată foarte joasă de cazuri de amplificare nespecifică, iar perechea pchbt2-pchbt3 poate fi folosită de asemenea pentru reacția qPCR.



**Fig.3.4. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii pchbt1-pchbt4 și pchbt2-pchbt3 (A), pch2-pch3 (B). M – marker molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific. Material: ADN extras din boabe de porumb de diferite genotipuri**

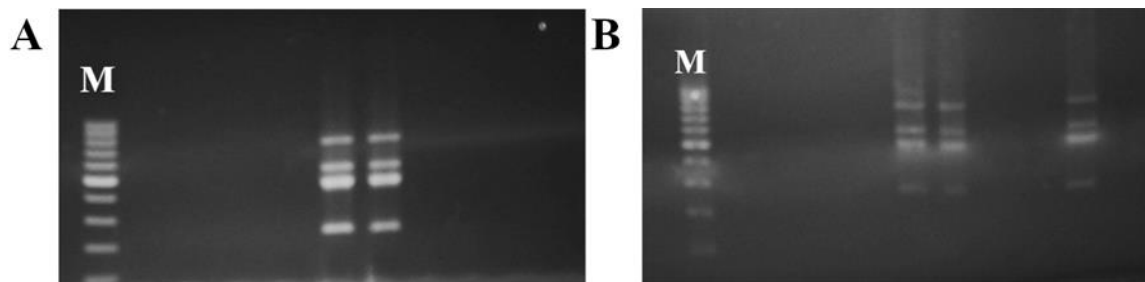
Inițial, pentru identificarea patogenilor *A. flavus* și *A. parasiticus* au fost elaborați primerii af1-af2, af3-af4, ap1-ap2 și ap3-ap4 în baza secvențelor *tef1* din genomul fungilor respectivi. Însă amplificarea de test la alinierea de 55°C a dus la generarea ampliconilor nespecifici cu ambele perechi de primeri și rezultate fals-negative într-o singură serie, ceea ce indică că parametrii nested-PCR nu au fost optimi (Fig.3.5).



**Fig. 3.5. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii pentru identificarea *A. parasiticus* și *A. flavus* (material – ADN extras din boabe de porumb): 1-4 – perechile af1-af2 (runda I) și af3-af4 (runda II), 55°C, 30 și 30 de cicluri; 5-8 - perechile ap1-ap2 (runda I) și ap3-ap4 (runda II), 55°C, 30 și 30 de cicluri; M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific**

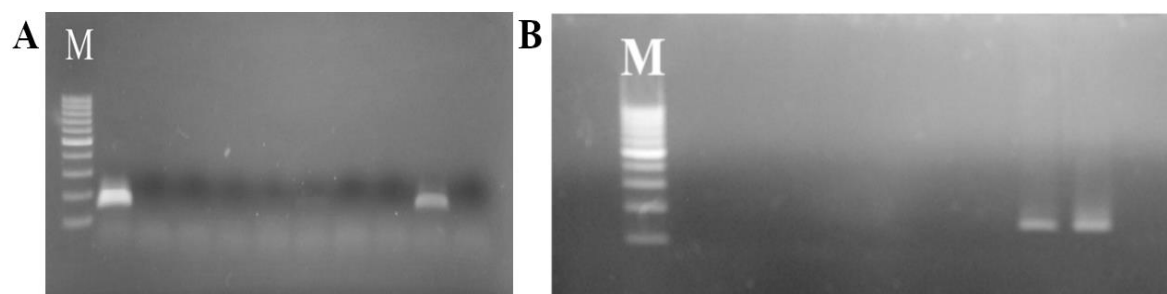
Ridicarea temperaturii de aliniere în runda I și II nu a dus la majorarea semnificativă a specificității reacției. Amplificarea la  $T_a$  de 65°C a dus la dispariția ampliconilor și lipsa produselor

de sinteză. Utilizarea primerilor în alte combinații de asemenea nu a rezultat în obținerea ampliconilor de interes (Fig.3.6).



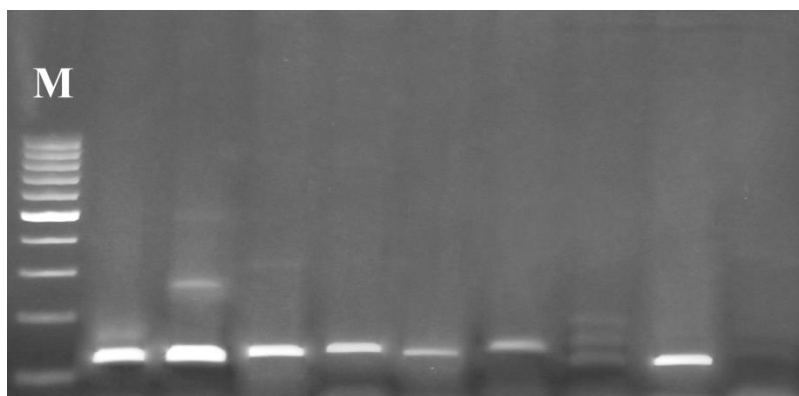
**Fig.3.6. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii pentru identificarea *A. parasiticus* și *A. flavus* în diferite combinații (material – ADN extras din boabe de porumb): A – perechile af1-af4 în prima rundă, af2-af3 în runda II, 60°C, 30+30 cicluri; B – perechile ap1-ap4 în runda I, ap2-ap3 în runda II, 60°C, 30+30 cicluri; M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific**

Reieșind din rezultatele experimentale, primerii ap1, ap2, ap3, ap4, af1, af2, af3, af4 au fost excluși din analiză din cauza nespecificității. În schimb, primerii elaborați în baza secvențelor din clusterul *afl* din genomul *Aspergillus spp.* au demonstrat specificitate înaltă. Perechile de primeri afap1-afap4, aqfap2-aqfap3 pentru gena *aflP* și afaq1-afaq4, aqfaq2-aqfaq3 pentru gena *aflQ* din genomul *A. flavus* au generat ampliconi de interes la  $T_a$  de 60°C în runda I și II, 30+30 cicluri de amplificare (Fig.3.7). Material: ADN extras din frunze de porumb.



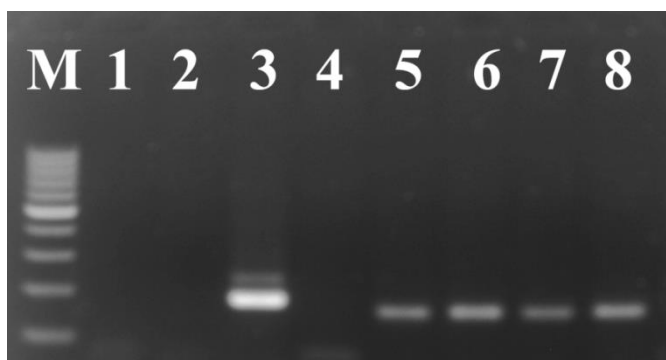
**Fig.3.7. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii la două gene din clusterul *afl* specific pentru *A. flavus*: A - perechile de primeri afap1-afap4, aqfap2-aqfap3 la gena *aflP*; B - perechile de primeri afaq1-afaq4, aqfaq2-aqfaq3 la gena *aflQ*; M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific**

Perechile de primeri apap1-apap4 (I rundă) și aqpap2-aqpap3 (II rundă) au generat un fragment de 120 bp care corespunde ampliconului complementar secvenței *aflP* din genomul *A. parasiticus* toxicogenic (Fig.3.8). Parametrii nested-PCR: 60°C în runda I și II, 30+30 cicluri de amplificare.



**Fig.3.8. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii pentru gena *aflP* specifică pentru *A. parasiticus*. M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific. Material: ADN extras din boabe de porumb**

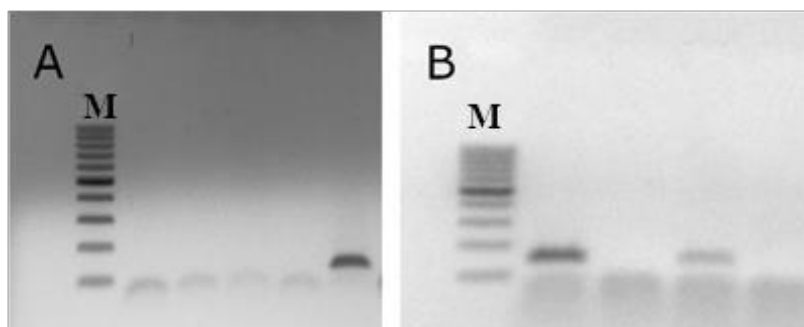
Pe lângă speciile *A. flavus* și *A. parasiticus*, care sunt considerați contaminanți majori cu aflatoxine ai produselor alimentare, au fost testași și primeri pentru identificarea altor specii de *Aspergillus* care sunt asociați cu contaminarea porumbului pe parcursul vegetației și depozitării pe o scară mai mică. Speciile *A. clavatus* și *A. ochraceus* au fost identificați în baza secvenței *tub2*. Primerii aoch1-aoch4 și aqoch2-aqoch3 au generat un amplicon de 181 pb specific *A. ochraceus*, iar cu perechile acl1-acl4 și aqcl2-aqcl3 a fost amplificată banda de 152 pb specifică pentru *A. clavatus*. Reacția PCR cu acești primeri a demonstrat specificitatea înaltă a acestora (Fig.3.9). Parametrii PCR: 60°C în runda I și II, 30+30 cicluri de amplificare. Material: ADN din patru mostre de boabe de porumb, depozitate timp de un an.



**Fig.3.9. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii la gena *tub2*, specifică pentru două specii din genul *Aspergillus*: 1-4 – perechile aoch1-aoch4 și aqoch2-aqoch3 (*A. ochraceus*), 4-8 - perechile acl1-acl4 și aqcl2-aqcl3 (*A. clavatus*), M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific**

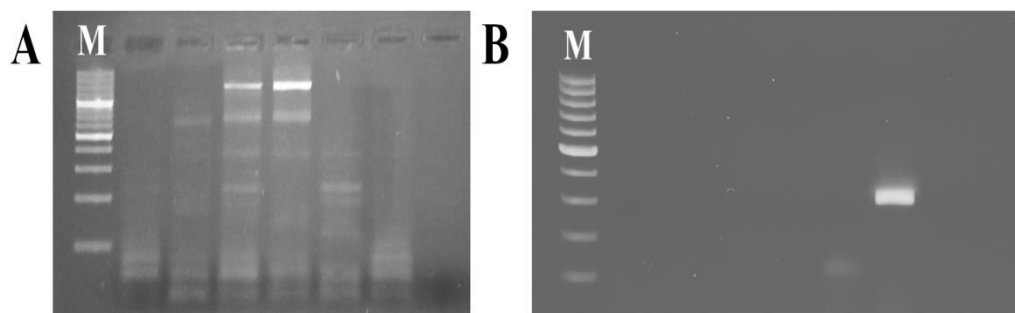
În baza secvenței *FUM6* au fost elaborate două perechi de primeri specifici speciilor toxigenice de *F. verticillioides* și *F. proliferatum*. Fragmentele prognozate au fost de 179 pb și 123 pb respectiv (Fig.3.10). Ampliconii de interes au fost obținuți la  $T_a$  între 58°C și 60°C. Parametrii

PCR: 59°C în runda I și II, 30+30 cicluri de amplificare [225]. Material: ADN extras din patru mostre de boabe de porumb de diferite genotipuri. Alinierea la temperaturi sub 58°C a indus sinteza nespecifică, iar majorarea mai sus de 63°C a rezultat în cazuri frecvente de rezultate fals-negative. La 65°C nu s-au generat benzi. Astfel, pentru alinierea primerilor a fost aleasă temperatura optimă de 60°C.



**Fig.3.10. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii la gena *FUM6*, specifică pentru două specii din genul *Fusarium*: A – perechile fprfum61-fprfum64 (runda I), fqprfum62-fqprfum64 (runda II); B – perechile fufum6ve1-fufum6ve4 (runda I), fqfum6ve2-fqfum6ve3 (runda II); M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific**

În unele cazuri sinteza nespecifică a rezultat nu din nespecificitatea primerilor sau  $T_a$  nepotrivită, ci din supraîncărcarea mix-lui de reacție cu matrice. Deoarece este greu de prognozat concentrația secvenței-țintă în ADN total extras din plante infectate, alegerea cantității optime de matrice în reacție este efectuată empiric într-o serie de amplificări cu factor de diluției diferit a ADN-lui. Efectul supraîncărcării cu matrice asupra specificității amplificării a fost des observat în cazurile identificării speciilor producătoare de ocratoxina A (Fig.3.11). Parametrii PCR: 59°C în runda I și II, 30+30 cicluri de amplificare. Material: ADN extras din frunze de porumb.



**Fig.3.11. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii moch1-moch4 și moch2-moch3, specifice genei *nrps* din genomul *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.***

**A – 6 probe cu concentrația de 20 ng de ADN în mix de reacție, B – proba totală din patru genotipuri, factor de diluție 1:20; M – marker molecular DNA Ladder 100 bp, Thermo Fisher Scientific**

Astfel, au fost testați primerii pentru identificarea agenților patogeni fungici în mostre de material vegetal. Parametrii optimi pentru amplifica sunt reprezentați în Anexa 2.

### **3.2. Testarea primerilor *de novo* pentru cuantificarea unor fungi toxigenici și potențial toxigenici prin qPCR**

Designul primerilor pentru analiza qPCR a fost efectuat în baza secvențelor de gene asociate cu sinteza micotoxinelor și genelor de menaj specifice pentru fungi. Secvențele au fost alese din baza de date GenBank prin algoritmul de aliniere globală, scopul căruia costă în evidențierea secvențelor nucleotidice de interes specifice la nivel de tulpină, specie, gen. Alegerea secvențelor de interes s-a efectuat în baza a trei criterii:

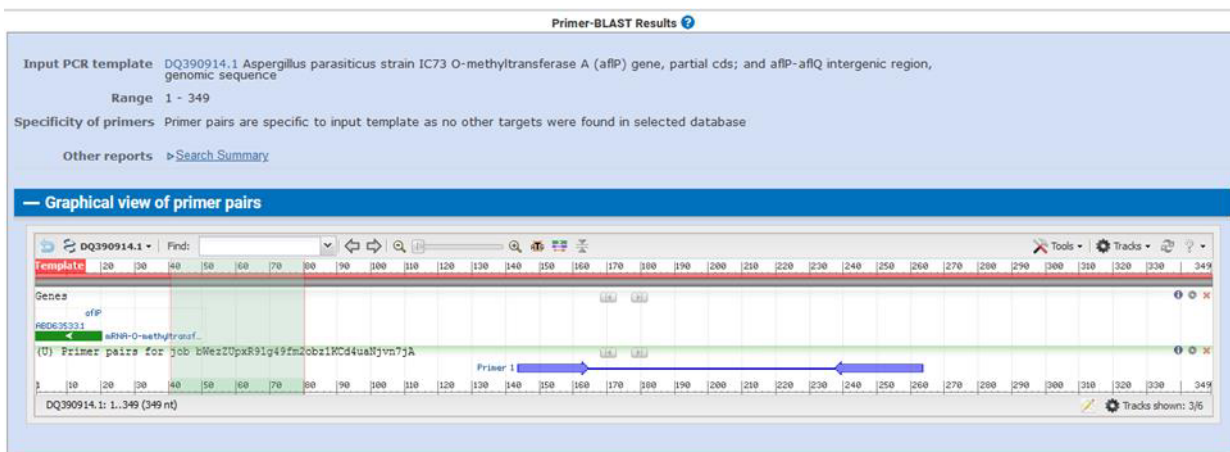
- similaritate (ideal – 100%)
- număr minim de lacune
- valoarea E minimă

Secvențele din baza de date GenBank ce corespundeau cerințelor au fost alese pentru elaborarea primerilor cu ajutorul aplicației soft Primer3. Astfel, pentru identificarea și cuantificarea unor fungi producători de micotoxine au fost elaborați *de novo* în baza genelor *TRI11*, *aflQ*, *aflR*, *aflP*, *PKS13*, iar pentru identificarea fungilor potențial toxigenici au fost folosite secvențe de gene de menaj, pe larg utilizate în taxonomia moleculară (A2, Tab.1).

Specificitatea primerilor a fost evaluată în două etape. Prima etapă consta în analiza BLAST a oligonucleotizilor obținuți. A doua etapă a constat dintr-o serie de amplificări pe mostre de ADN extras din porumb cu simptome de boli fungice pentru testarea eficacității primerilor.

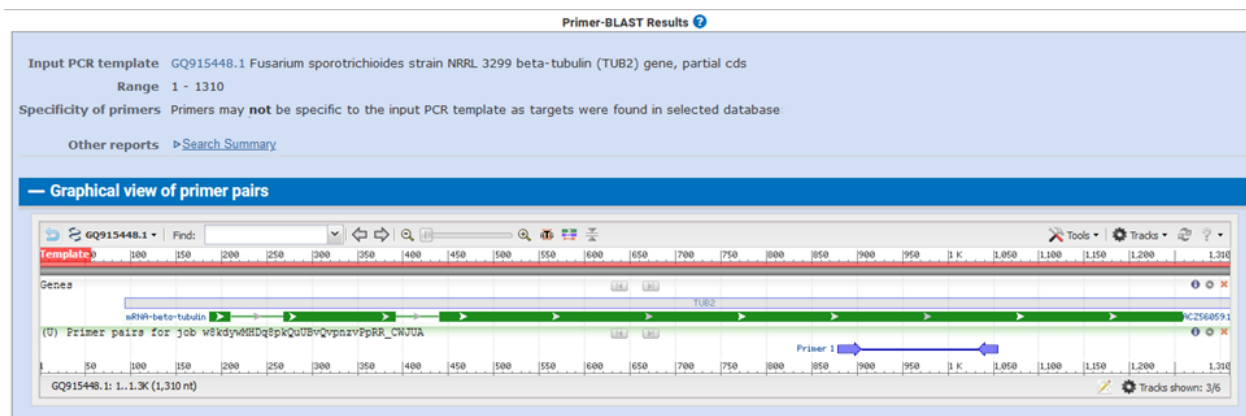
Utilizarea secvențelor înalt specifice din genomul fungilor a permis elaborarea primerilor cu randament mic de aliniere nespecifică prognozat, ceea ce a fost demonstrat în majoritatea

cazurilor prin analiza BLAST a primerilor experimentali în limitele cladei *Opisthokonta* (Fig.3.12.).



**Fig.3.12. Rezultatele analizei BLAST a perechii de primeri aqpap2-aqpap3 pentru identificarea *A. parasiticus* prin qPCR**

Însă în unele cazuri alinierea experimentală a demonstrat complementaritatea parțială a primerilor cu alte secvențe din genomul fungic și posibilitatea obținerii ampliconului nespecific cu masa moleculară prognozată, ca în cazul primerilor elaborați în baza secvenței *tub2* pentru identificarea *F. sporotrichioides* (Fig.3.13.).

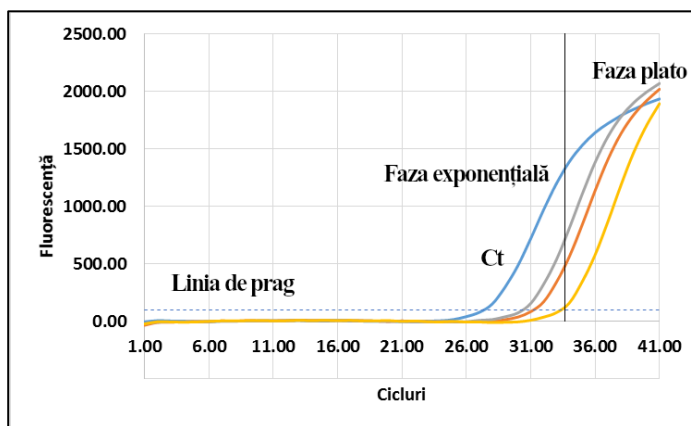


**Fig. 3.13. Rezultatele analizei BLAST a perechii de primeri fqspt1-fqspt2 pentru identificarea *F. sporotrichioides* prin qPCR**

În acest caz, dacă era posibil, a fost utilizată perechea de primeri în baza secvenței alternative (în caz de față, *tef1*) cu specificitate mai înaltă și posibilitatea alinierii eronate mai joasă. În caz contrar au fost impuși parametrii de amplificare mai stricte și/sau utilizată hot-start ADN-polimerazei.

Reacția PCR cantitativă în timp real funcționează în esență în același mod ca și end-point PCR - mai multe cicluri de amplificare în care ADN-ul matrice este inițial denaturat, urmat de aliniere cu primeri care vizează secvențe specifice, și de extinderea ulterioară a unei catene

complementare de la fiecare primer de către o ADN polimerază termostabilă, rezultând în creștere exponențială a numărului de ampliconi în timpul PCR. Cu toate acestea, spre deosebire de endpoint PCR (PCR convențională), creșterea numărului de ampliconi este înregistrată pe parcursul reacției prin detectarea unui reporter fluorescent care indică acumularea de ampliconi în timpul fiecărui ciclu (Fig. 3.14).



**Fig.3.14. Reprezentarea grafică a cineticii qPCR**

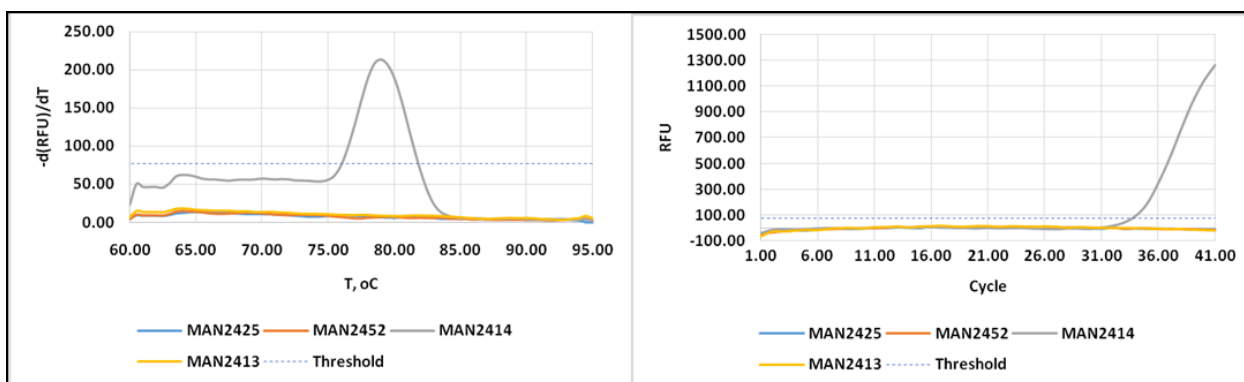
De obicei, sunt utilizate două sisteme reporter, și anume, agentul fluorescent SYBR green de intercalare și sistemul de sondă TaqMan. În lucrarea dată a fost folosit sistemul de cuantificare în baza agentului SYBR green. Agentul SYBR green se leagă de întreaga moleculă de ADN dublu catenar prin intercalare între perechile de baze adiacente. Când complexul ADN-reporter este format, este emis un semnal fluorescent. Pe măsură ce numerele de ampliconi se acumulează după fiecare ciclu de PCR, se observă o creștere corespunzătoare a fluorescenței. Deoarece SYBR green se leagă de tot ADN-ul dublu catenar, este esențial să se utilizeze perechi de primeri care sunt foarte specifice pentru secvența lor țintă pentru a evita generarea de produse nespecifice care ar contribui la semnalul fluorescent, rezultând într-o supraestimare a cantității de secvență-țintă. Poate fi necesară optimizarea extensivă a concentrațiilor de primer utilizate în testele qPCR cu SYBR green pentru a se asigura că se formează numai produsul vizat. Perechile de primeri care prezintă auto-complementaritate ar trebui, de asemenea, evitate pentru a preveni formarea dimerilor de primeri. Este necesară efectuarea analizei a curbei de disociere (topire) post-PCR pentru a confirma că semnalul de fluorescență este generat numai din matrice-țintă și nu din formarea de produse PCR nespecifice. În timpul analizei curbei de disociere, ADN-ul dublu catenar este încălzit la un gradient de temperatură și nivelurile de fluorescență sunt măsurate la fiecare punct discret de temperatură. Pe măsură ce matrice dublu catenar este încălzit, acesta se denaturează, rezultând în scădere corespunzătoare a fluorescenței datorită disocierii agentului SYBR green de produsul dublu catenar. Temperatura la care 50% din ADN-ul dublu catenar este



denaturat poate fi utilizată pentru a confirma faptul că secvența-țintă este prezentă, împreună cu prezența altor secvențe nespecifice și dimeri de primer.

Pentru primerii elaborați *de novo* au fost construite curbele de amplificare și disociere. Curba de amplificare prezintă dependența valorilor fluorescenței relative (RFU) de numărul de cicluri PCR. Acumularea signalului fluorescent determină reacția pozitivă. Lipsa ADN-lui de interes în mix de reacție rezultă în faptul că valorile RFU nu depășesc valorile de fundal iar graficul prezintă o linie dreaptă. În baza curbei de disociere au fost analizate proprietățile disociative ale ampliconului și determinată temperatura la care ADN-ul mono-catenar reasociază cu catena complementară și revine la forma sa dublu-catenară. Analiza curbei de disociere a dat informația despre cantitatea, lungimea și structura ampliconului obținut. Rezultatele testării experimentale ale primerilor sunt date în continuare.

Figura 3.15 prezintă curbele de amplificare și disociere pentru perechea de primeri mqtri11sp7- mqtri11sp8 specifici genei *TR111* (*Fusarium spp.*) asociată cu sinteza DON și T-2. Se observă, că curbele de amplificare pentru probele fără ADN-țintă reprezintă o linie dreaptă, în timp ce curba de amplificare pentru proba MAN2414 care conține copii ale genei *TR111* definește o creștere exponențială a fluorescenței, adică a fragmentului amplificat. Curba de disociere prezintă un singur vârf clar definit cu un punct de topire de 79°C, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate. Trecerea târzie (după ciclu 30) la faza exponențială și depășirea valorilor de prag a fluorescenței relative dovedește cantitatea mică a genei de interes în proba analizată.

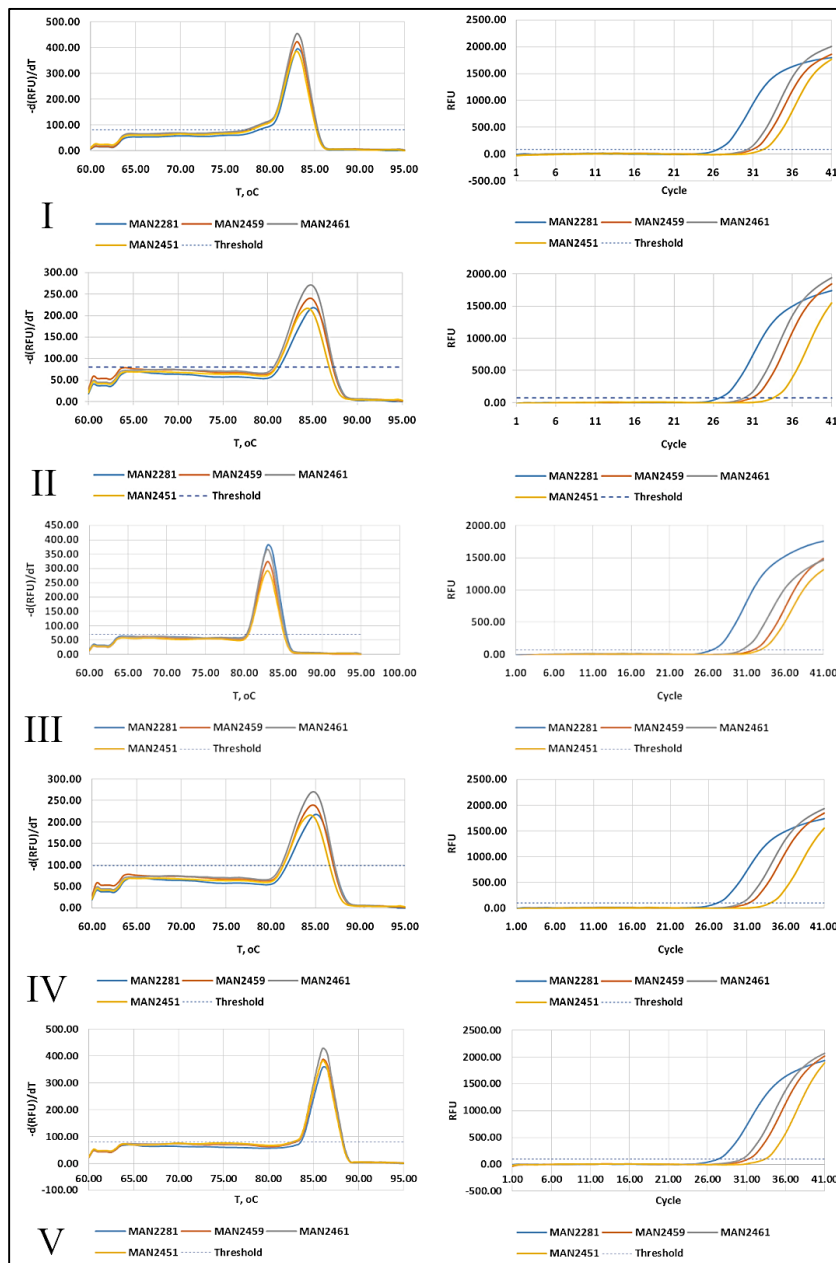


**Fig.3.15. Curbele de disociere (stânga) și amplificare (dreapta) ale fragmentelor obținute în PCR în timp real folosind perechea de primeri mqtri11sp7-mqtri11sp8 la gena *TR111* (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței)**

În continuare sunt prezentate rezultate testării experimentale ale unor perechi de primeri elaborați în baza secvențelor genelor *aflP*, *aflQ*, *aflR* ale *Aspergillus spp.* Aceste gene codifică enzime specifice ce sunt asociate cu calea biosintetică a aflatoxinelor, iar rata de variabilitate intra-

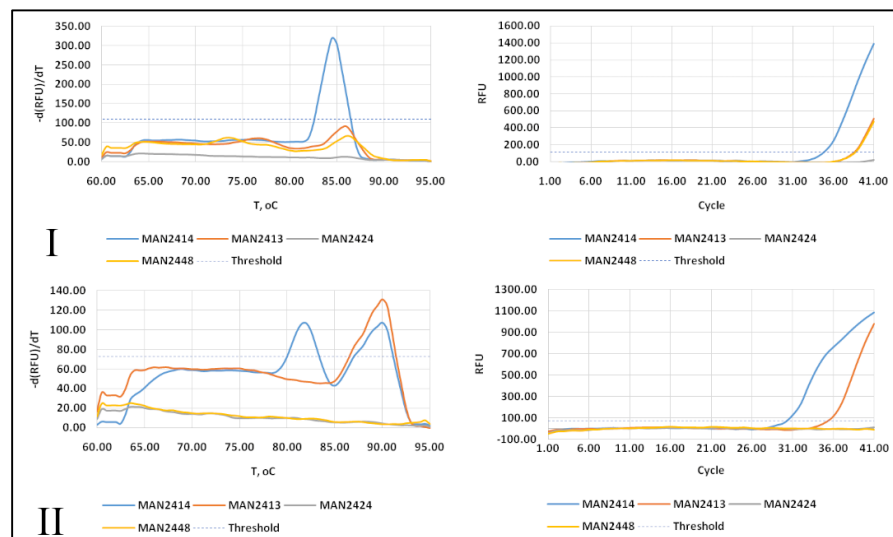
și interspecifică permite de a folosi aceste secvențe pentru a discrimina diferite tulpini toxigenice de *Aspergillus* la nivel de specii sau grup de specii. Figura 3.16I este prezentat graficul amplificării și disocierii a produselor reacției qPCR cu perechea de primeri aqfaq3-aqfaq4. Primerii sunt specifici secvenței genei *aflQ* a *A. flavus*, producător de aflatoxine. În toate patru mostre se observă creșterea exponențială rapidă a valorilor fluorescenței relative, ceea ce indică cantități semnificative ale genei de interes în mostre. Curba de disociere manifestă un vârf clar diferit la temperatura 83°C. Lipsa artefactelor pe graficul de disociere vorbește despre omogenitatea ampliconului sintetizat în urma reacției PCR și specificității primerilor utilizați. Pe figura 3.16II sunt prezentate rezultatele testării altei perechi de primeri, aqfaq5-aqfaq6, la fel elaborați în baza secvenței *aflQ*, specifice pentru *A. flavus*. Unele tulpini ale acestei specii sunt capabile să sintetizeze aflatoxina B1. Graficul de disociere a ampliconilor generați de perechea aqfaq5-aqfaq6 arată un singur vârf clar definit cu un punct de topire de 81°C, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate. Cea mai mare cantitate de secvență-țintă se observă în mostra MAN2281 (valorile fluorescenței relative depășesc valorile de prag la ciclul 27), iar în mostrele MAN2461, MAN2459 și MAN2451 cantitatea ADN-lui de patogen este mai mică. Astfel, perechile de primeri aqfaq3-aqfaq4 și aqfaq5-aqfaq6, elaborați în baza secvențelor genei *aflQ* specifice tulpinilor toxigenice de *A. flavus*, s-au dovedit dea fi la fel de eficienți pentru identificarea și cuantificarea principalelor producătorilor de aflatoxine. Figura 3.16III prezintă rezultatele testării perechii de primeri pentru identificarea *A. parasiticus* folosind gena *aflP* ca secvență-țintă. Ca și în cazul precedent, graficul de disociere arată un vârf unic bine definit cu un punct de topire de 83°C, ceea ce confirmă omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate. Cantitatea cea mai înaltă a fungului se observă în mostra de MAN2281. Figura 3.16IV prezintă diagramele de amplificare și disociere pentru perechea de primeri la secvența genei *aflR* comună pentru două specii - *A. parasiticus* și *A. flavus*, care este implicată în biosinteza aflatoxinelor, obținute ca rezultat al analizei PCR în timp real a probelor de boabe de porumb. În toate probe se observă o creștere exponențială a fluorescenței, dar valorile RFU depășesc valorile de prag neuniform. Adică, în toate mostre analize sunt prezente tulpinile aflatoxigenice de *Aspergillus spp.*, însă cantitatea genei de interes este diferită, și în boabele MAN2451 cantitatea patogenului este cea mai mică. Curba de disociere manifestă un singur vârf clar definit la temperatura 85°C, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate. A doua pereche pentru gena *aflR* specifică *Aspergillus spp.* a generat ampliconi de interes în aceleași linii de porumb analizate, iar creșterea exponențială a cantității produsului desemnează pattern similar pentru perechile mqaf11-mqaf12 și maf12-maf13

(Fig.3.16V). Pe curba de disociere se observă un singur vârf la temperatura 86°C, ce vorbește despre omogenitatea produsului sintetizat în urma amplificării și specificitatea primerilor. Astfel, ambele perechi de primeri elaborați în baza secvenței genei *aflR* sunt efective pentru identificarea și cuantificarea sumară a tulpinilor aflatoxigenice de *A. flavus* și *A. parasiticus*.



**Fig.3.16. Curbele de disociere (stânga) și amplificare (dreapta) ale fragmentelor obținute în PCR în timp real folosind perechile de primeri la clusterul *afl* (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței): I – aqfaq3-aqfaq4, *aflQ*, *A. flavus*; II – aqfaq5-aqfaq6, *aflQ*, *A. flavus*; III – aqpap3-aqpap4, *aflP*, *A. parasiticus*; IV – mqaf11-mqaf12, *aflR*, *Aspergillus spp.*; V – maf12-maf13, *aflR*, *Aspergillus spp.***

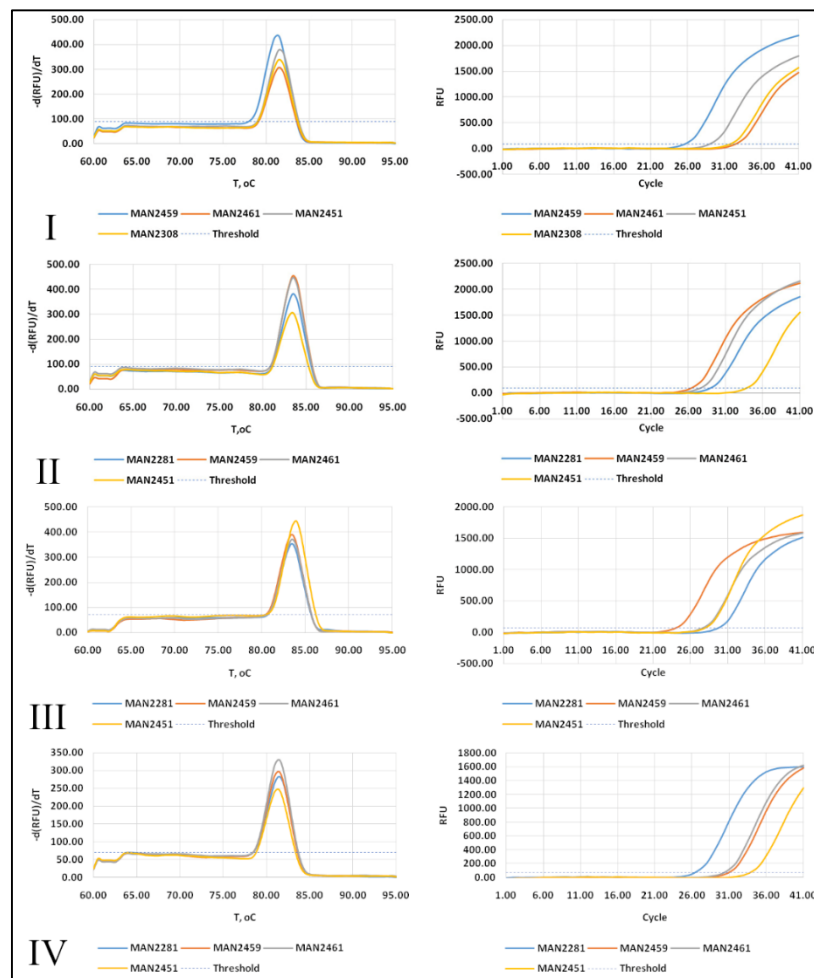
Perechea de primeri mze2-mze3 a fost elaborată în baza secvenței genei *PKS13* specifică fungului *F. equiseti*. Tulpinile toxigenice ale acestei specii sunt capabile să producă micotoxina zearalenonă. Pe figura 3.17I se observă, că curba de amplificarea în proba de ADN extras din boabe de porumb a liniei MAN2414 manifestă creștere exponențială după pragul de 35 cicluri, în timp ce pentru probele de MAN2413 și MAN2448 curba amplificării trece linia de prag aproape de sfârșitul amplificării. Aceasta presupune cantități destul de mici de secvență-țintă și, ca urmare, a tulpinilor toxigenice de *F. equiseti* în probe. Pentru MAN2424 curba amplificării prezintă o linie dreaptă, ceea ce dovedește lipsa secvenței-țintă în mixul de reacție. Curba de disociere prezintă un vârf clar definit de 84.5°C, ceea ce dovedește omogenitatea fragmentului sintetizat și specificitatea primerilor elaborați în baza genei *PKS13*. Graficele de amplificare cu perechea de primeri mqze7-mqze8, elaborați în baze altei secvențe nucleotidice a genei *PKS13* specifice *F. equiseti* au arătat creștere exponențială a secvenței de interes în două probe de porumb, care la fel au dat semnal pozitiv cu perechea mze2-mze3 (Fig.3.17II). Însă perechea mze2-mze3 de asemenea a dat semnal pozitiv în probele MAN2281, MAN2459, MAN2461, MAN2308, MAN2448, care nu au generat ampliconi de interes cu perechea mqze7-mqze8. Probabil, secvențele amplificate cu perechile mqze7-mqze8 și mze2-mze3 au omologie diferită pentru diferite tulpini de *F. equiseti*. Cantitatea patogenului în probe de asemenea a fost destul de mică. Pe graficul de disociere doar un vârf clar trece valorile de prag – la 90°C. Se poate presupune, că populația *F. equiseti* este destul de eterogenă, reprezentată de mai multe tulpini toxigenice cu mutații în locusul *PKS13* și pentru identificarea veridică a fungului este rațional de a folosi ambele perechi de primeri.



**Fig.3.17. Curbele de disociere (stânga) și amplificare (dreapta) ale fragmentelor obținute în PCR în timp real folosind perechile de primeri la gena *PKS13* (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței): I – mze2-mze3; II – mqze7-mqze8**

Pentru identificarea moleculară a fungilor producători de fumonisine au fost folosite secvențele clusterului genomic *FUM*, care codifică mai multe enzime asociate căilor biosintetice a diferitor micotoxine din clasa respectivă. Se poate observa că diagramele de amplificare ale probelor care conțin gena *FUM6* arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică a cantității de fragment amplificat (Fig. 3. 18I). Graficul de disociere arată un singur vârf bine definit cu un punct de topire de 81.5°C pentru perechea de primeri specifică genei *FUM6* a *F. proliferatum*, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii testate. În mostrele MAN2459 și MAN2451 valorile fluorescenței relative depășesc valorile de prag mai devreme comparativ cu valorile respective în probele MAN2461 și MAN2308, ceea ce indică cantitatea mai mare a genei de interes în aceste mostre. Diagramele de amplificare cu perechea de primeri fqfum6ve2-fqfum6ve3 pentru secvența genei *FUM6* specifică altui fung, *F. verticillioides*, manifestă creșterea exponențială a valorilor fluorescenței relative și, respectiv, a cantității genei de interes (Fig. 3. 18II). Adică, toate patru probe de porumb au fost infectate cu tulpini toxigenice de *F. verticillioides*. În mostra MAN2451 se observă, că valorile fluorescenței trec valorile de prag abia după ciclul 35 ce dovedește cantitatea mică de secvența-țintă în proba dată. Curbele de disociere în toate patru mostre au manifestat un vârf clar definit la temperatura 83.5°C, ce împreună cu lipsa vârfurilor adiționali la alte valori de temperatură vorbește despre specificitatea primerilor elaborați. În baza secvenței genei *FUM1*, care codifică enzima fumaraza și participă în calea biosintetică a fumonisinelor, au fost elaborate două perechi de primeri: perechea mqfumpro2-mqfumpro3, specifică *F. proliferatum*, și mqfumc2- mqfumc3, comună pentru tulpinile toxigenice de *F. proliferatum* și *F. verticillioides*. Mai jos (Fig. 3.18III) sunt reprezentate rezultatele testării perechii mqfumpro2-mqfumpro3. Se observă creșterea exponențială în patru probe de boabe de porumb, ceea ce indică, că aceste mostre au fost infectate cu tulpinile toxigenice de *F. proliferatum*, iar cantitatea secvenței de interes este diferită. Curba de disociere manifestă un singur vârf la temperatura 84.5°C. Adică, fragmentul este omogen, iar perechea de primeri este specifică secvenței-țintă. Aceleași mostre de porumb infectat cu *F. proliferatum* toxigenic au fost utilizate pentru testarea perechii de primeri mqfumc2-mqfumc3 pentru identificarea tulpinilor toxigenice de *Fusarium spp.* (*F. proliferatum* și *F. verticillioides*). În toate probele se observă creșterea exponențială a fluorescenței și acumularea secvenței de interes, însă în mostrele de boabe MAN2281 și MAN2461 cantitatea de ADN-țintă este mai mică comparativ cu datele obținute pentru amplificarea cu perechea de primeri mqfumpro2-mqfumpro3 (Fig.3.18IV). Iar în mostrele MAN2459 și MAN2451 cantitatea secvenței-țintă este mai mare comparativ cu rezultatele amplificării ADN-lui din aceste mostre cu primeri specifici doar tulpinilor toxigenice de *F.*

*proliferatum*. Din aceasta se poate deduce că boabele MAN2459 și MAN2451 au fost infectate simultan de tulpinile toxigenice de *F. proliferatum* și *F. verticillioides*, ceea ce a dus la creșterea cantității de ADN de interes. Curba de disociere manifestă un singur vârf la temperatura 83.5°C, ceea ce dovedește omogenitatea fragmentului și specificitatea primerilor. Perechea mqfumc2-mqfumc3 este efectivă pentru cuantificarea și monitorizarea concomitentă a *F. proliferatum* și *F. verticillioides*, care sunt agenți cauzali ai FER în porumb și producători activi de fumonisine.

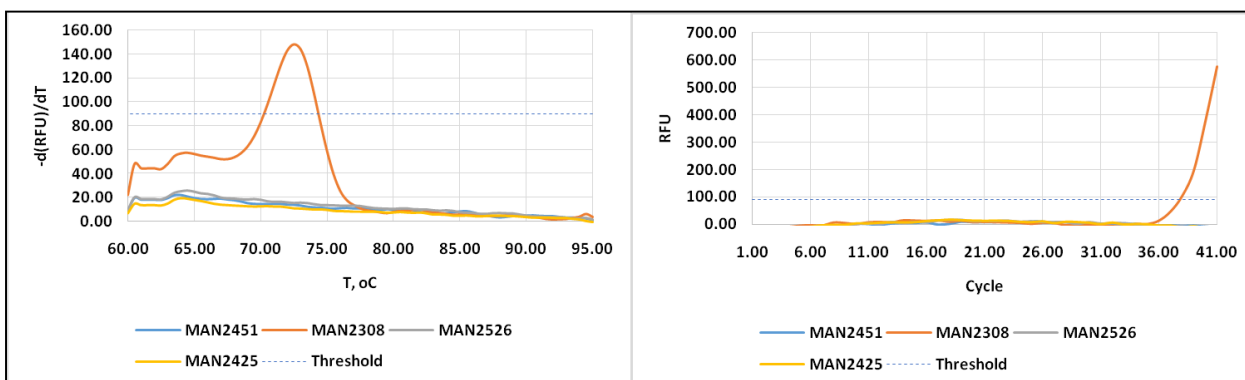


**Fig.3.18. Curbele de disociere (stânga) și amplificare (dreapta) ale fragmentelor obținute în PCR în timp real folosind perechile de primeri la clusterul *FUM* (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței): I – fqprfum62-fqprfum63, *FUM6*, *F. proliferatum*; II – fqfum6ve2-fqfum6ve3, *FUM6*, *F. verticillioides*; III – mqfumc2-mqfumc3, *FUM1*, *Fusarium spp.*; IV – mqfumpro2-mqfumpro3, *FUM1*, *Fusarium spp.***

Astfel, au fost testate experimental perechile de primeri elaborați în baza secvențelor genelor *TRI11*, *TRI8*, *FUM6*, *aflQ*, *aflR*, *aflP*, *PKS13* implicate în sinteza fumonisinelor, aflatoxinelor, zearalenonei, tricotecenelor și specifice tulpinilor toxigenice de *Fusarium spp.* și *Aspergillus spp.*

În continuare sunt reprezentate rezultatele analizei experimentale ale unor perechi de primeri elaborați în baza secvențelor de gene de menaj specifice *Fusarium sp.* și *Penicillium sp.* Aceste secvențe pot fi utilizate atât pentru monitorizarea și cuantificarea fungilor patogeni în porumb, cât și pentru construirea curbei-standard pentru evaluarea cantităților relative a genelor de interes în reacția real time PCR.

Pe figura 3.19 sunt date rezultatele amplificării a mostrelor de ADN extras din porumb cu perechea f<sub>qeq7</sub>-f<sub>qeq8</sub> elaborată în baza genei *tef1a* specifică *F. equiseti*. În mostrele lipsite de patogen curbele de amplificare prezintă o linie dreaptă, iar în mostre MAN2308 infectată cu acest patogen se observă creșterea exponențială a cantității genei de interes după ciclul 35. Adică, cantitatea ADN de patogen în boabe este foarte mică. Curba de disociere manifestă doar un vârf la temperatura 73°C, fragmentul este omogen, iar perechea de primeri este specifică.

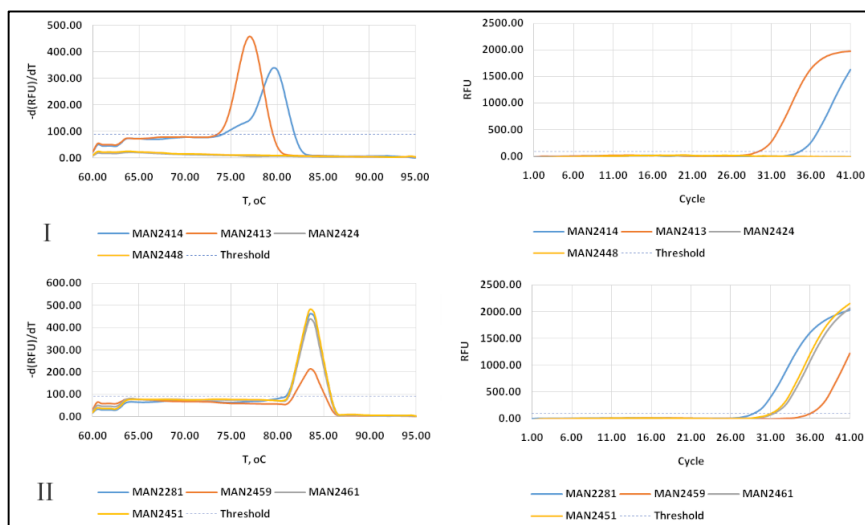


**Fig.3.19. Curbele de disociere (stânga) și amplificare (dreapta) ale fragmentelor obținute în PCR în timp real folosind perechea de primeri f<sub>qeq7</sub>-f<sub>qeq8</sub> la gena *tef1* specifică *F. equiseti* (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței)**

Mai jos sunt reprezentate rezultatele amplificării cu primerii pentru identificarea unor specii de *Penicillium* elaborați în baza secvenței genei *tub2* care sintetizează β-tubulina.

Perechea *pcit15*-*pcit6* este specifică genei *tub2* a *P. citrinum*, care infestază boabele de porumb și este capabil să producă unele micotoxine (Fig. 3.20II). În probele de MAN2413 și MAN2414 se observă creșterea valorilor de fluorescență, în timp ce curba de amplificare în probele MAN2424 și MAN2448, care sunt lipsite de secvența de interes, prezintă o linie dreaptă. Curbele de disociere pentru probele infectate manifestă două vârfuri clare: la 77°C și 79.5°C. Ca și în cazul *F. equiseti*, se poate presupune, că populația *P. citrinum* în boabele de porumb analizate este eterogenă și reprezentată de mai multe tulpini cu mutații în regiunea secvenței genei *tub2*. Următoarea pereche de primeri *pqex5*-*pqex6* (Fig.3.20I) este specifică *P. expansum*, tulpinile toxigenice ale căruia sunt capabile să sintetizeze patulina, și în patru mostre analizate se observă

creșterea exponențială a secvenței-țintă. Omogenitatea ampliconului sintetizat și specificitatea primerilor este dovedită de un vârf clar definit la temperatura de 83.5°C.



**Fig.3.20. Curbele de disociere (stânga) și amplificare (dreapta) ale fragmentelor obținute în PCR în timp real folosind primeri la gena tub2 specifică *Penicillium spp.* (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței): I – pcit15-pcit6, *P. citrinum*; II – pqex5-pqex6, *P. expansum***

Astfel, a fost demonstrată eficacitatea primerilor pentru qPCR elaborați în baza secvențelor genelor "housekeeping" și genelor implicate în căile biosintetice ale unor micotoxine periculoase pentru monitorizarea fungilor din g. *Aspergillus*, *Fusarium* și *Penicillium*. Primerii au demonstrat specificitate înaltă și pot fi utilizate cu succes pentru cuantificarea principalelor agenți cauzali ai bolilor fungice la porumb și producători de fumonisine, aflatoxine, tricotecene, zearalenonă.

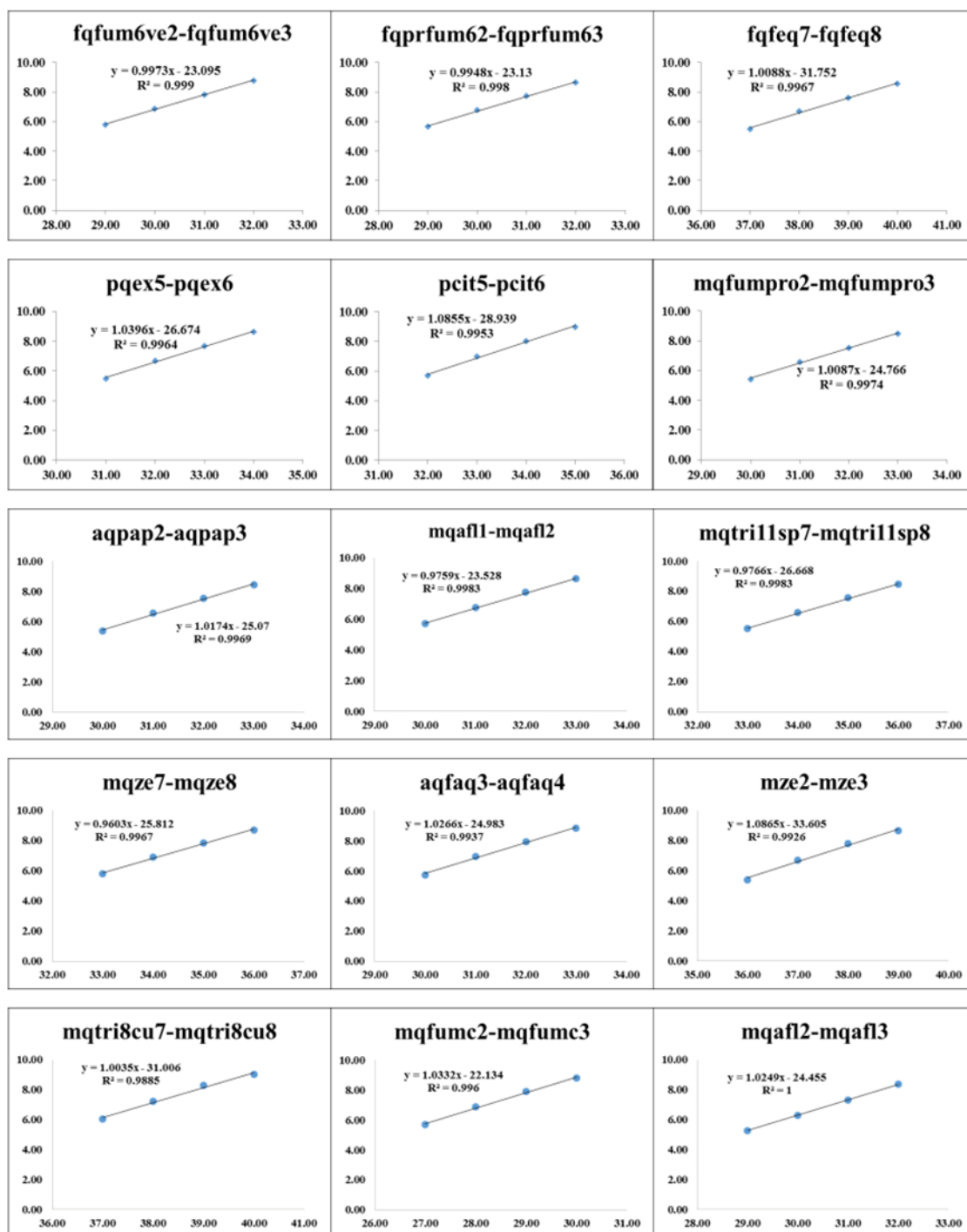
Eficacitatea absolută a qPCR este indicată prin dublarea fragmentului amplificat în fiecare ciclu de reacție. Cu toate acestea, această regulă este rar respectată, deoarece mai mulți factori pot afecta acumularea fragmentului de interes: cantitatea și puritatea ADN-ului, condițiile de reacție, concentrația de reactiv etc. Acești factori provoacă interferențe și valorile reale RFU pe baza cărora este apreciată cantitatea de ADN pot fi înșelătoare. Prin urmare, după optimizarea protocolului qPCR și evaluarea specificității primerilor, este esențial să se analizeze eficacitatea amplificării (Fig.3.21). Există mai multe abordări pentru acest scop, dar cea mai comună și validată metodă se bazează pe amplificarea fragmentului de interes în diluții în serie de concentrații cunoscute. Valorile Cq obținute sunt reprezentate grafic pe o scară logaritmică de-a lungul concentrațiilor corespunzătoare. După aceea, se generează o curbă de regresie liniară prin punctele de date și se calculează panta liniei de tendință. Eficiența se calculează prin formula:

$$E = -1 + 10^{(-1/pantă)}$$



Deși simplă metodic, această abordare creează anumite neplăceri, deoarece crește volumul de muncă prin necesitatea amplificărilor suplimentare. Acest moment este critic atunci când se efectuează o serie mare de reacții. Prin urmare, mai multe studii au fost dedicate derivării unui protocol pentru evaluarea eficienței qPCR pe baza unei singure reacții. Una dintre ele presupune analizarea dinamicii schimbării valorilor RFU în timpul amplificării folosind diferite abordări matematice. În lucrarea curentă, se utilizează următorul procedeu:

1. Sunt derivați logaritmi la baza 2 ale valorilor RFU într-o reacție.
2. Se selectează valorile obținute în secțiunea exponențială a curbei de amplificare. Valorile terminale sunt excluse deoarece în tranziția către secțiunea platou eficiența reacției scade în mod natural datorită epuizării amestecului de reacție și inhibării cu produsul final, iar aproape de valorile de prag, valorile reale RFU sunt perturbate de fluorescența de fundal. Astfel, sunt selectate 4-6 valori intermediare.
3. Valorile selectate sunt trasate de-a lungul valorilor ciclului respectiv, este generată curba de regresie. Coeficientul  $a$  din ecuația  $y = ax + b$  obținută denotă eficiența reacției.



**Fig.3.21. Graficele eficacității reacției qPCR cu unii primeri specifici pentru fungi patogenici**

Se observă că eficacitatea variază între 96-108% și, prin urmare, se potrivește intervalului de amplificare dorit de 90-110%. Cele mai mici valori au fost observate pentru perechile de primeri mqze7-mqze8, iar cele mai mari – pentru perechile de primeri mze2-mze3. Datele obținute demonstrează că polimeraza Taq funcționează la capacitate aproape maximă, iar interferența factorilor secundari la acumularea produsului final este nesemnificativă.

### 3.3. Utilizarea reacției PCR pentru analiza cantitativă și semicantitativă a patogenilor fungici

Pentru cuantificarea secvențelor de ADN în mostre se utilizează în principal metoda real-time PCR. Metoda real-time PCR este considerată standardul de aur pentru cuantificarea secvențelor de interes în eșantionul de mix de ADN și se aplică în rezolvarea problemelor diverse în domeniul fitopatologiei și diagnosticului molecular. PCR cantitativă s-a dovedit de-a fi robustă, reproductibilă și sensibilă. Deoarece PCR este capabilă să amplifice un fragment specific de ADN, a fost utilizată în diagnosticarea agenților patogeni. Odată cu creșterea cantității de date de secvențiere disponibile, este literalmente posibil să se proiecteze primeri qPCR pentru fiecare microorganism de interes. Principalele avantaje ale qPCR sunt că această metodă asigură detectarea și cuantificarea rapidă și cu randament ridicat a secvențelor de ADN-țintă în diferite probe de acizi nucleici. Timpul mai mic de amplificare este facilitat de amplificarea și vizualizarea simultană a ampliconilor ADN nou formați. Mai mult, qPCR este mai sigură în ceea ce privește evitarea contaminărilor încrucișate, deoarece nu este necesară nicio manipulare ulterioară cu probe după amplificare. Alte avantaje ale qPCR includ o gamă dinamică largă pentru cuantificare și multiplexarea amplificării mai multor ținte într-o singură reacție.

Există mai multe abordări pentru a estima cantitatea de secvență țintă din eșantion, care implică diferite modele matematice și testări suplimentare. Fiecare dintre ele are argumentele sale pro și contra și uneori utilizarea lor este limitată la anumite domenii de aplicare.

**Metoda Double-delta Cq.** Această metodă de cuantificare este efectuată după qPCR și presupune utilizarea a două valori cheie - valorile Cq ale probei testate și valorile Cq ale probei de referință. O genă cu expresie constitutivă servește ca genă de referință și, de obicei, este una dintre genele menajere. Valorile Cq din probele de studiu tratate și netratate sunt utilizate pentru a dezvălui diferența în pliul de expresie a genei studiate folosind formula

$$\Delta Cq = Cq(\text{gena de interes}) - Cq(\text{gena de menaj})$$

Practic,  $\Delta Cq$  este diferența dintre valorile Cq pentru gena de interes și gena de menaj pentru o anumită probă. Acest lucru este esențial pentru a normaliza gena de interes la o genă care nu este afectată de experimentul. Cuantificarea se efectuează în patru pași:

1. Se ia media valorilor Cq pentru gena de menaj și gena testată în condițiile experimentale și de control (4 valori). Cele 4 valori sunt: gena de interes - grupa experimentală (TE), gena de interes - control (TC), gena de menaj - grupa experimentală (HE) și gena de menaj - control (HC).

2. Se calculează diferențele dintre valorile experimentale (TE – HE) și valorile de control (TC – HC). Acestea sunt valorile  $\Delta\Delta Cq$  pentru condițiile experimentale ( $\Delta\Delta Cq_{TE}$ ) și, respectiv, de control ( $\Delta\Delta Cq_{TC}$ ).

3. Apoi, se calculează diferența dintre valorile  $\Delta\Delta Cq$  pentru condițiile experimentale și de control ( $\Delta\Delta Cq_{TE} - \Delta\Delta Cq_{TC}$ ) pentru a ajunge la valoarea double-delta Cq ( $\Delta\Delta\Delta Cq$ ).

4. Deoarece toate calculele sunt în baza logaritmică 2, de fiecare dată când cantitatea de ADN se dublează, valorile Cq scad cu 1 și nu se vor înjumătăți. Trebuie calculată valoarea  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  pentru a obține modificarea pliului de expresie.

După cum se poate observa, valoarea obținută nu arată conținutul absolut al secvenței țintă din probă. Ea arată doar cum se modifică activitatea anumitor gene sub influența unor factori luați în considerare în experiment. Valorile obținute sunt întotdeauna comparate cu valorile respective ale unei gene de referință cu sinteza constitutive, care nu este afectată de condițiile experimentale. Prin urmare, această abordare este utilizată pentru a evalua expresia diferențială a genelor funcționale, în timp ce parametrul în sine este semicantitativ. Deși unele cercetări implică posibilitatea utilizării acestei abordări pentru cuantificarea secvențelor reale de ADN genomic, aceasta se limitează la evaluarea activității transcripționale. Mai mult, delta-delta Cq presupune că eficiența de amplificare a genelor țintă și de referință sunt aceleași, ceea ce poate să nu fie întotdeauna cazul [219]. Diferențele de eficiență a amplificării dintre gene și probe pot duce la cuantificare inexactă. În al doilea rând, metoda delta-delta Cq poate să nu fie potrivită pentru analiza genelor cu niveluri de expresie semnificativ diferite. În aceste cazuri, este posibil ca modificarea relativă a pliului în expresia genei să nu reflecte cu exactitate diferențele adevărate în exprimare [219].

Testul bazat pe qPCR pentru cuantificarea numărului de copii absolute al secvențelor țintă presupune utilizarea curbei de calibrare obținută după efectuarea amplificării mai multor probe cu concentrații de ADN cunoscute. Curbele de calibrare sunt foarte reproductibile și permit generarea de date sensibile și reproductibile. Cu toate acestea, modelul curbei de calibrare externă trebuie să fie validat temeinic, deoarece acuratețea cuantificării absolute prin PCR în timp real depinde în întregime de acuratețea standardelor. Orientările de mai jos sunt esențiale pentru utilizarea corectă a metodei curbei standard pentru cuantificarea absolută:

- Este important ca ADN-ul sau ARN-ul să aparțină unei singure specii.
- Este necesară pipetarea precisă deoarece standardele trebuie diluate pe mai multe ordine. ADN-ul plasmid sau ARN-ul transcris *in vitro* trebuie concentrat pentru a măsura o valoare

A260 precisă. Acest ADN sau ARN concentrat trebuie apoi diluat pentru a fi la o concentrație similară cu ținta din probele biologice.

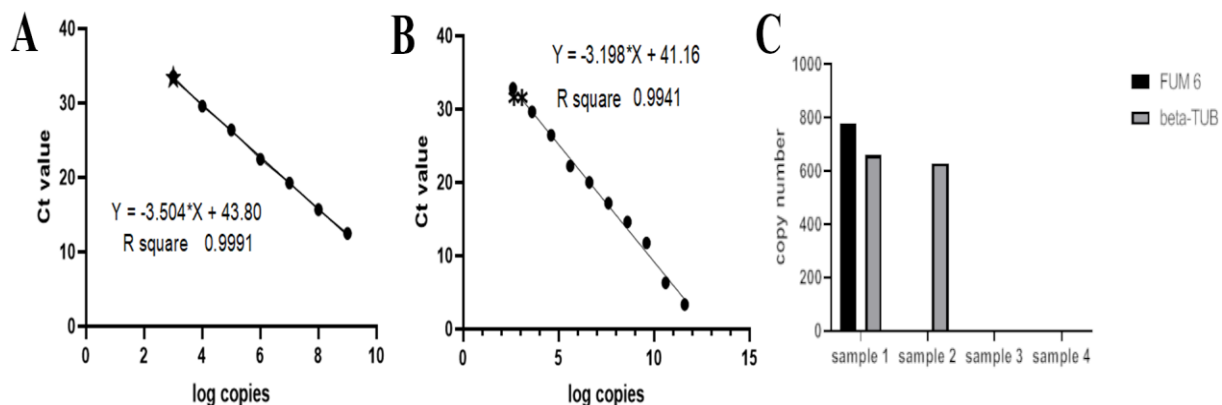
- Trebuie luată în considerare stabilitatea standardelor diluate, în special pentru ARN. Standardele diluate se împart în alicote mici, se păstrează la  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  și se dezgheață o singură dată înainte de utilizare.

Cantitățile absolute ale standardelor trebuie mai întâi identificate prin unele mijloace independente. ADN-ul plasmid și ARN-ul transcris *in vitro* sunt utilizate în mod obișnuit pentru a pregăti standarde absolute. Concentrația este măsurată cu A260 și convertită în numărul de copii folosind greutatea moleculară a ADN-ului sau ARN-ului.

Pentru unii primeri (perechile de primeri fqfum6ve2-fqfum6ve3 pentru gena *FUM6* a *Fusarium verticillioides*, implicată în sinteza fumonisinei) a fost calculată eficacitatea și construită curba standard de etalonare pentru analiza cantitativă. Inițial, pentru analiza cantitativă a fost sintetizat fragmentul de interes prin PCR convențională cu primeri la gena *FUM6*. S-a efectuat analiza electroforetică, ampliconul a fost excizat, eluat din gel de agaroză și purificat. Concentrația de ADN a fost cuantificată pe SFEC, iar numărul de copii în 1 ng a fost calculat reieșind din lungimea fragmentului amplificat. Apoi au fost pregătite diluții seriale de AND-standard. Diluțiile au fost analizate prin PCR în timp real cu probele de interes.

Pentru fiecare reacție real-time PCR amplificatorul calculează valorile Cq (cycle threshold sau pragul de amplificare). Acest parametru reprezintă numărul de cicluri de amplificare necesare ca curba de fluorescență să treacă pragul valorilor de fundal. Valorile Cq sunt invers proporționale cantității de ADN-țintă în probă, adică cu cât mai mare este concentrația secvenței de interes, cu atât valorile Ct vor fi mai mici.

Diluțiile seriale de ADN-standard cu număr de copii cunoscut au fost analizate prin PCR în timp real, valorile Cq au fost înregistrate și utilizate pentru a construi curba standard. În același timp, ADN-ul extras din boabe de patru plante de porumb (probele 1, 2, 3, 4) a fost testat pentru prezența genei *FUM6* cu această pereche de primeri. Aceste rezultate sunt prezentate pe figura 3.22A. Eficiența calculată a primerilor pentru panta este de 93%.



**Fig.3.22. A - Relația dintre numărul inițial de copii a matricei în reacție și valoarea Cq pentru perechea de primeri specifică genei *FUM6*; B - Relația dintre numărul inițial de copii al standardului în reacție și valoarea Cq pentru perechea de primeri specifică genei beta-tubulinei în *Fusarium spp.*; C - Date sumare ale analizei qPCR a patru probe de porumb. Asteriscul indică numărul de copii log/valoarea**

Una din patru probe de porumb (proba 1) a fost testată pozitiv pentru gena *FUM6*. Folosind relația, s-a putut calcula numărul de copii ale genei *FUM6* din această probă. Valoarea medie a Cq în 3 replici a fost de 33,37, ceea ce corespunde la aproximativ 780 de copii per 20 ng de ADN-matrice.

În continuare același procedeu s-a folosit pentru cuantificarea în probă a *Fusarium spp.* Inițial a fost sintetizat fragmentul de interes prin nested-PCR cu primeri la gena beta-tubulinei specifică genului *Fusarium*. S-a efectuat analiza electroforetică, ampliconul a fost excizat, eluat din gel de agaroză și purificat. Concentrația de ADN a fost cuantificată pe spectrofotometru, iar numărul de copii în 1 ng a fost calculat reieșind din lungimea fragmentului amplificat. Apoi au fost pregătite diluții seriale de ADN-standard. Diluțiile au fost analizate prin PCR în timp real cu probele de interes.

Deci, diluțiile în serie ale standardului ADN cu număr de copie cunoscut au fost analizate prin PCR în timp real, valorile Cq au fost înregistrate și utilizate pentru a construi o curbă standard. Eficiența calculată a primerilor este de 105%. Graficul dependenței valorilor Cq de numărul log de copii ale genei este prezentat pe figura 3.22B.

Două din patru probe de porumb au fost testate pozitiv pentru gena beta-tubulinei din genomul *Fusarium spp.* Folosind relația, s-a calculat numărul de copii ale acestei gene în probe. Valoarea medie Cq a 3 replicări a fost de 32,12 pentru o probă și de 32,34 pentru cealaltă probă

pozitivă. Aceasta corespunde la aproximativ 650 de copii per 20 ng de ADN în mix de reacție. Datele totalizate ale analizei qPCR a patru mostre de porumb sunt prezentate în figura 3.22C.

După cum se observă, în prima probă ambele perechi de primeri au dat semnal pozitiv, ceea ce înseamnă că atât genele *FUM6* ale *F. verticillioides* (gena implicată în sinteza micotoxinelor) cât și gena de beta-tubulină (gena care nu este implicată în sinteza micotoxinelor) sunt prezente în probă. Numărul de copii ale fragmentelor detectate este foarte similar, astfel se poate presupune că toată populația de *Fusarium* prezent în prima probă de porumb este *F. verticillioides* care conține gena *FUM6* și, prin urmare, este potențial micotoxigen. A doua mostră de porumb a fost pozitivă numai pentru gena de beta-tubulină și nu a conținut gena *FUM6* din genomul *F. verticillioides*. Deci, această probă este probabil contaminată cu o altă specie de *Fusarium* sau tulpina de *F. verticillioides* netoxigenică. Celelalte două probe (3 și 4) nu au fost testate pozitive pentru niciuna dintre gene, ceea ce înseamnă că probele nu au fost infectate cu *Fusarium*.

Nu orice genă poate servi ca standard pentru construirea curbilor de calibrare, iar secvența se selectează pe baza seriei qPCR amplificate de interese individual. Prin urmare, selectarea standardelor este o problemă particulară pentru obținerea de rezultate veridice, iar cuantificarea exactă este esențială. Cea mai bună opțiune este achiziționarea de standarde comerciale, care nu sunt întotdeauna accesibile. Pe de altă parte, nu fiecare analiză necesită cunoașterea numărului de copii exact al secvențelor de interes. Pentru evaluarea sensibilității plantelor la ciuperci, în general este suficient să evaluăm diferența de acumulare a ADN -ului patogenului în probe de țesut vegetal. Prin urmare, alți parametri care dezvăluie această diferență pot fi aleși ca criterii discriminatoare. Cel mai convenabil este utilizarea valorilor  $C_q$ , deoarece sunt scalare și reflectă nemijlocit cantitatea ADN -ului țintă din eșantion. După cum s-a menționat mai sus, în qPCR reacția pozitivă se distinge prin acumularea semnalului de fluorescență, reprezentat prin parametrul  $C_q$ , care este invers proporțională în raport cu cantitatea de ADN de interes. Astfel, cu cât mai repede valoare  $C_t$  trece valorile de prag, cu atât mai mare este cantitatea acizilor nucleici în proba analizată. Se menționează, că valorile  $C_q \leq 29$  indică o abundență de secvență de interes în probă. Adică, reieșind din faptul că între valoarea de prag și concentrația ADN-lui în mostră există o relație distinctă, valoare  $C_q$  poate fi utilizată ca mărime scalară pentru estimarea diferenței dintre cantitățile de ADN patogenului în mostră de material vegetal fără necesitatea de a utiliza un standard [226]. Pentru analiză au fost alese boabe de porumb de două genotipuri – CP137 și CP148, pentru care prin alte teste deja a fost stabilită diferența între gradele de susceptibilitate la infecții fungice [227]. Boabele au fost culese la două perioade de depozitare. Din material vegetal a fost extras ADN total,

care a fost testat pentru prezența secvențelor specifice genomului fungilor prin qPCR. Valorile Cq sunt prezente în tabelele 3.1 și 3.2.

**Tabelul 3.1. Valorile Cq obținute în urma amplificării mostrelor de ADN extras din boabe de porumb de porumb cu primeri pentru fungi toxigenici (din [227])**

CP 148 (2008)	CP 148 (2018)	CP 137 (2008)	CP 137 (2018)
38.50	39.80	38.02	32.25
45	35.59	36.89	23.22
36.88	45	45	45
35.99	36.51	34.35	28.13
35.66	45	39.01	35.82
37.74	36.90	37.50	23.55
38.01	37.70	35.77	38.49
45	45	45	23.48
44.16	35.18	37.11	23.48

**Tabelul 3.2. Rezultatele testului post-hoc a acumulării genelor asociate cu sinteza micotoxinelor în mostre de boabe de porumb (din [227])**

<i>Comparări între perechi</i>		HSD <sub>.05</sub> = 5.6359 HSD <sub>.01</sub> = 7.0884	Q <sub>.05</sub> = 3.9013    Q <sub>.01</sub> = 4.9068
<b>CP 148 (2008):CP 148 (2018)</b>	M <sub>1</sub> = 38.13 M <sub>2</sub> = 36.95	1.19	Q = 0.82 ( <i>p</i> = .93674)
<b>CP 148 (2008):CP 137 (2008)</b>	M <sub>1</sub> = 38.13 M <sub>3</sub> = 36.95	1.18	Q = 0.82 ( <i>p</i> = .93722)
<b>CP 148 (2008):CP 137 (2018)</b>	M <sub>1</sub> = 38.13 M <sub>4</sub> = 28.55	9.58	Q = 6.63 ( <i>p</i> = .00050)*
<b>CP 148 (2018):CP 137 (2008)</b>	M <sub>2</sub> = 36.95 M <sub>3</sub> = 36.95	0.00	Q = 0.00 ( <i>p</i> = .00000)
<b>CP 148 (2018):CP 137 (2018)</b>	M <sub>2</sub> = 36.95 M <sub>4</sub> = 28.55	8.39	Q = 5.81 ( <i>p</i> = .00212)*
<b>CP 137 (2008):CP 137 (2018)</b>	M <sub>3</sub> = 36.95 M <sub>4</sub> = 28.55	8.40	Q = 5.81 ( <i>p</i> = .00211)*

\*diferența veridică la  $p < .05$

Analiza impactului genotipului și perioadei de depozitare asupra acumulării ADN-lui fungic în boabe a fost efectuată cu ajutorul testului ANOVA. A fost observată influența semnificativă a genotipului și perioadei de depozitare asupra valorilor Cq la  $p < .05$  în condiții studiate:  $F(3, 24) = 10.38$ ,  $p = 0.000144$ . Rezultatele post-hoc Tukey test au demonstrat diferența semnificativă dintre CP 148 (2008):CP 137 (2018),  $p = .0005$ ; CP 148 (2018):CP 137 (2018),  $p = .00212$ ; CP 137 (2008):CP 137 (2018),  $p = .00211$ . Astfel, s-a demonstrat eficacitatea utilizării valorilor Cq pentru estimarea gradului de diferență dintre susceptibilitate/rezistență a genotipurilor de porumb. Eficacitatea utilizării acestui parametru este validată și prin lucrări recente, care demonstrează posibilitatea identificării pacienților ce prezintă risc epidemiologic în baza valorilor Cq [228,229].



Cu toate acestea, există unele inconveniente în utilizarea valorilor C<sub>q</sub> datorită faptului că acestea sunt invers proporționale cu cantitatea de secvență de ADN țintă din probă. În cazul evaluărilor de corelare sau regresie, acest lucru poate complica interpretarea datelor obținute sau poate duce la concluzii incorecte dacă parametrii studiați se modifică neliniar. Prin urmare, pentru comoditate, este necesar să se convertească această valoare astfel încât valorile derivate să fie direct proporționale cu cantitatea de ADN țintă din probă, ceea ce le-ar face mai vizuale și mai reprezentative. În acest scop, valorile C<sub>q</sub> obținute experimental pentru secvențele de ADN utilizate pentru a identifica diferite ciuperci au fost normalizate la valorile C<sub>q</sub> a genei de referință. Pentru referință s-au folosit valorile medii C<sub>q</sub> pentru genele ARN ribozomal. S-au efectuat următoarele calculări:

- $\Delta C_q$  s-a calculat după formula  $\Delta C_q = C_{q_{\max}} - C_{q_{\text{mostră}}}$ , unde  $C_{q_{\max}}$  reprezintă cea mai mare valoare C<sub>q</sub> în serie experimentală, adică valoarea C<sub>q</sub> în probă cu cea mai mică concentrație de ADN de interes;
- Normalizarea s-a efectuat cu perechea de primeri 183-184 la clusterul ribozomal 18S din genomul eucariotic. Pentru fiecare probă de ADN a fost măsurată valoarea C<sub>q</sub>, a fost calculată valoarea medie C<sub>q</sub>, iar valorile C<sub>q</sub> ale fiecărei probe de ADN au fost scăzute din această valoare medie C<sub>q</sub>. Valorile obținute ale  $\Delta C_q$  au fost utilizate pentru normalizarea concentrațiilor de ADN (au fost produse atât valori pozitive, cât și negative). Normalizarea valorii C<sub>q</sub> pentru fiecare probă a fost realizată prin formula:  $\Delta C_{q_{\text{mostră}}} = C_q + \Delta C_q$

Cu toate avantajele sale, metoda qPCR are și anumite limitări, legate în primul rând de necesitatea aparatului costisitor și construirea curbei de calibrare în baza căreia se face cuantificarea. Însă unele cercetări nu necesită cunoașterea precisă a concentrației secvenței de interes în probă, ci doar gradul de diferență dintre mostrele analizate. Din acest motiv, pentru rezolvarea unor probleme practice uneori este rezonabil de a utiliza procedee alternative mai ieftine și simple de analiză cantitativă sau semicantitativă.

**Cuantificarea genelor de interes prin PCR convențională cu aplicarea distribuției Poisson.** PCR convențională este în general considerată o metodă calitativă. Dar utilizarea diluției în serie și împărțirea amestecului de reacție cu următoarea aplicare a analizei statistice permite utilizarea PCR convențională ca metodă cantitativă sau semi-cantitativă. Principiul tehnologiei constă în partiționarea ADN-lui total într-un număr de probe individuale, care sunt analizate prin PCR, semnalele pozitive sunt numărate și apoi se deduce numărul secvențelor de interes în particulă sau probă. Probabilitatea că proba va conține k copii de secvență-țintă este dirijată de distribuția binomială și Poisson. În cazul când numărul de particule  $n$  este destul de mare iar

distribuția este randomizată probabilitatea apariției secvenței-țintă în particulă poate fi dedusă din relația  $1/n$ . Când  $n$  este destul de mare (30 și mai mult) iar probabilitatea  $1/n$  este mică, distribuția binomială poate fi aproximată prin distribuția Poisson [230].

Pentru a evalua eficiența PCR convenționale pentru cuantificarea fungilor patogeni, a fost extras ADN total din 1 g de boabe de porumb (anul 2021) și analizat prin metoda nested-PCR pentru prezența speciilor toxigenice din genul *Aspergillus*. Probele ce au conținut ADN fungic au fost diluate în raport 1:50 folosit pentru cuantificarea prin metoda end-point PCR cu aplicarea distribuției Poisson. Pentru reacție au fost luate câte 10 μl de ADN total. În reacție s-au utilizat aceleași primeri la genele asociate cu sinteza aflatoxinelor de *Aspergillus spp.* Pentru cuantificarea secvențelor de interes, soluția de ADN total a fost repartizată uniform în 30 de mixuri de reacție în care s-a efectuat amplificarea prin PCR convențională. După amplificare s-au numărat probele negative (absența ampliconului de interes) și s-a calculat numărul copiilor a secvenței de interes prin formula utilizată pentru droplet-digital PCR:

$$m = -n * \ln(E) \text{ [230]}$$

unde  $m$  reprezintă numărul de secvență-țintă în probă,  $n$  – numărul partițiilor în seria de reacție,  $(E)$  – probabilitatea particulelor nule.

Astfel, după amplificare a fost efectuată analiza electroforetică a probelor, s-a calculat numărul total de benzi și valoarea  $E$ , în baza căreia s-a obținut numărul total de copii în mixul de reacție. Același eșantion a fost supus qPCR cu primeri specifici și s-au obținut valori medii  $C_q$  în trei repetiții. Valorile  $C_q$  au fost normalizate la secvența 18S a genomului eucariotic. Mediile dintre genotipuri au fost comparate folosind testul Student,  $p < .05$  (Tab. 3.3).

**Tabelul 3.3. Analiza comparativă a gradului de susceptibilitate la *Aspergillus spp.* a genotipurilor de porumb, reieșind din numărul de copii obținute prin PCR convențională și valorilor  $C_q$  normalizate la gena de menaj 18S**

Valorile $C_q$		Numărul de copii calculat în baza distribuției Poisson	
CP137	CP148	CP137	CP148
20.09	11.53	2.18	8.1
20.84	11.71	17.37	0
21.19	13.21	15.3	1.23
20.54	9.46	20.79	5.59
20.18	10.52	25.11	0
t=14.11, p<.001*		t=3.13, p<.001*	

\*diferență semnificativă la  $p < .05$

Ambele procedee au evidențiat o diferență veridică la  $p < .05$  în gradului de susceptibilitate la *Aspergillus spp.* a genotipurilor de porumb. Deoarece valorile obținute folosind distribuția

Poisson reprezintă numărul absolut de copii ale unei secvențe țintă în probe, în timp ce Cq (inclusiv valorile sale normalizate) este un parametru semicantitativ, compararea valorilor lor numerice ar putea duce la concluzii eronate cu privire la interschimbabilitatea lor pentru evaluarea cantității fungice. Cu toate acestea, dacă ambele abordări reflectă în același mod diferența în acumularea de ADN fungic în probele de plante, ar fi rezonabil să presupunem că valorile obținute din ambele grupuri diferă de media lor într-un mod similar. Prin urmare, compararea valorilor obținute s-a realizat prin următorii pași:

1. Au fost obținute valori medii pentru fiecare genotip în ambele grupuri.

2. A fost calculat raportul  $x/x_m$ , unde  $x$  este valoarea obținută în experiment și  $x_m$  este valoarea medie a fiecărui parametru (numărul de copii, Cq). Un exemplu de calcul este dat pentru valorile Cq normalizate pentru genotipul CP137 (valoarea medie – 20,57):

$$20.09 \rightarrow 20.09/20.57 \rightarrow 0.98$$

$$20.84 \rightarrow 20.84/20.57 \rightarrow 1.01$$

$$21.19 \rightarrow 21.19/20.57 \rightarrow 1.03$$

$$20.54 \rightarrow 20.54/20.57 \rightarrow 0.99$$

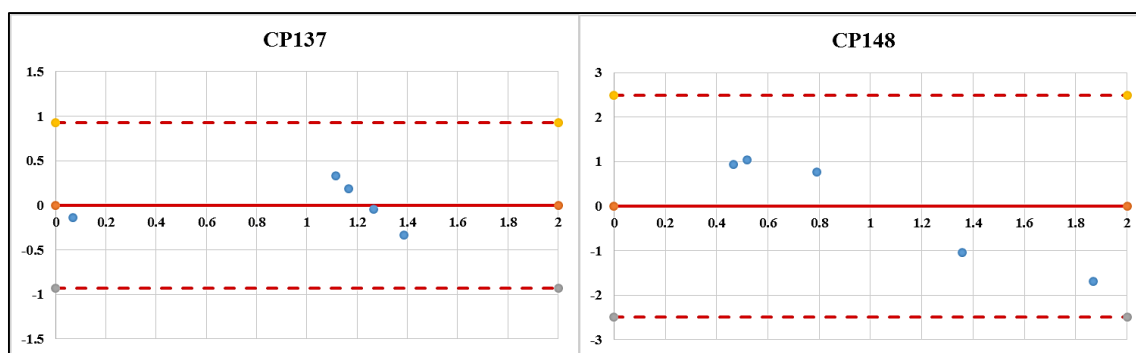
$$20.18 \rightarrow 20.18/20.57 \rightarrow 0.98$$

3. După aceea, rapoartele obținute pentru valorile Cq și numărul de copii au fost împerecheate, au fost calculate mediile și diferențele. Exemplul de calcul este dat în tabelul 3.4 de mai jos:

**Tabelul 3.4. Diferența și mediile între raporturile obținute pentru valorile Cq și numărul de copii calculate cu utilizarea distribuției Poisson**

Genotip	Cq	Poisson	Media	Diferența
CP137	0.98	0.13	0.56	0.84
	1.01	1.08	1.04	-0.06
	1.03	0.95	0.99	0.08
	1	1.29	1.14	-0.29
	0.98	1.55	1.27	-0.57
CP148	1.02	2.72	1.87	-1.69
	1.04	0	0.52	1.04
	1.17	0.41	0.79	0.76
	0.84	1.87	1.36	-1.04
	0.93	0	0.47	0.93

4. Mediile și diferențele calculate au fost utilizate ca coordonate pentru a construi diagrama Bland-Altman, unde liniile intermitente indică intervalele de fidelitate superior și inferior (Fig. 3.23):

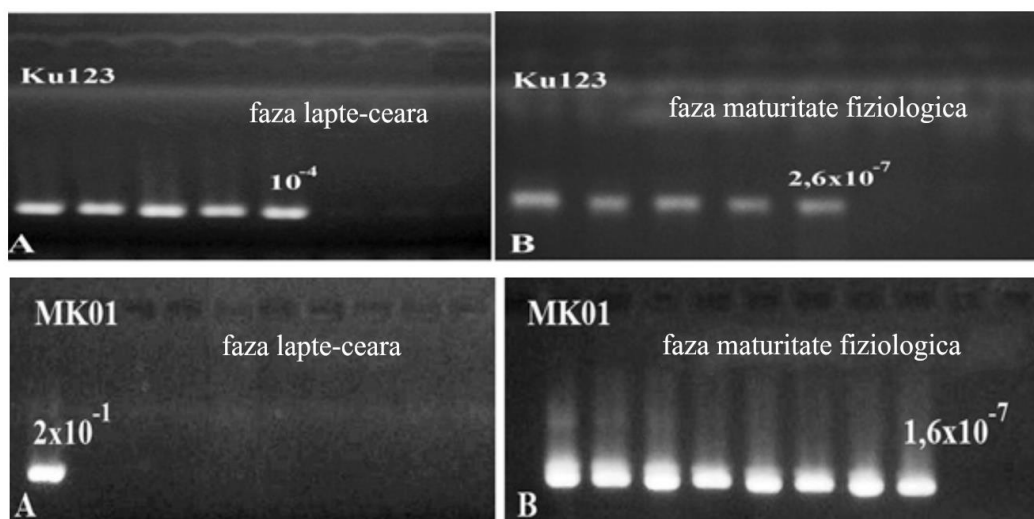


**Fig. 3.23. Diagrama Bland-Altman a numărului de copii de gene implicate în sinteza aflatoxinelor de *Aspergillus spp.* pentru genotipurile CP137 și CP148 obținute în urma end-point PCR cu aplicarea distribuției Poisson și valorilor Cq normalizate la secvența 18S**

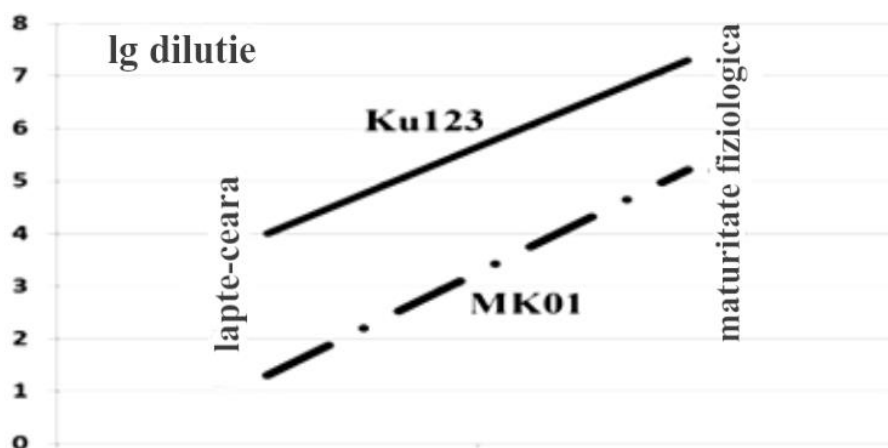
Astfel, PCR convențională cu aplicarea distribuției Poisson poate fi utilizată în anumite cazuri ca alternativă a reacției qPCR. Avantajele acestui procedeu în ceea ce protocolul dat nu necesită utilaj special și/sau reactivi adiționali și poate fi efectuat pe un amplificator pentru PCR convențională. Însă procedeul dat presupune efectuarea unui număr mare de reacții pentru analiza unei singure probe, iar micșorarea numărului de partiții în seria de amplificarea duce la mărirea erorii și calculul greșit a numărului de copii în probă. Astfel, această metode nu este efectivă când este necesar de analizat un număr mare de probă.

Un alt procedeu de aplicare a PCR convențională pentru analiza cantitativă se bazează pe diluări consecvente ale probei de ADN inițială cuplată cu o serie de amplificări. Se fixează diluarea la care nu s-au produs ampliconi în urma reacției PCR și, reieșind din cinetica PCR și posibilitatea de a genera o cantitate detectabilă de secvență de interes pe o singură copie ale acesteia, se calculează numărul de copii de ADN-țintă în proba inițială. Aceasta înseamnă că, cunoscând factorul de diluție, este posibil să se calculeze câte copii ale ADN-ului analizat au fost prezente în proba nediluată [231].

Pentru analiza nested-PCR s-au folosit primeri specifici la *Fusarium spp* și un amestec de 5 probe de ADN pentru fiecare dintre cele două linii MK01 și Ku123 la stadiile lapte-țeară și maturitate fiziologică (Fig.3.24). Ca urmare, sa demonstrat că cel puțin 20 de copii ale ADN-ului agentului patogen sunt prezente în 1 g de probă MK01 la faza lapte-țeară și cel puțin  $1,6 \times 10^5$  copii în stadiul de maturitate fiziologică. În cazul liniei Ku123, cel puțin 104 copii de ADN patogen sunt prezente în 1 g de probă în faza lapte-țeară și cel puțin  $2,6 \times 10^7$  copii în stadiul de maturitate fiziologică. Graficul modificărilor valorilor logaritmului comun al factorului de diluție a ADN-ului pentru ambele porumb linii în două etape de dezvoltare este prezentată pe Fig.3.25.



**Fig. 3.24. Cuantificarea *Fusarium* spp. în mostre de ADN extras din boabe mature și boabe la faza lapte- ceară de Ku123 și MK01 în baza diluărilor consecvente. Numerele din figurile A și B indică ultima diluție a probei, când semnalul de amplificare este încă detectat (din [231])**



**Fig.3.25. Lg de diluție ADN a probelor MK01 și Ku 123 în fazele de lapte- ceară și maturitate fiziologică (din [231])**

Spre deosebire de cuantificarea qPCR cu ajutorul curbei de calibrare, acest procedeu este semicantitativ, însă permite de a compara rata de infectare și a evalua diferența în susceptibilitate a genotipurilor de porumb la patogeni fungici. Însă ca și în cazul metodei PCR convențională cu aplicarea distribuției Poisson, limitația constă în necesitatea efectuării a mai multor probe într-o serie de reacție.

PCR convențională bazată pe teste digitale este o metodă eficientă și simplă din punct de vedere tehnic pentru analiza cantitativă a agenților patogeni din plante. Nu necesită reactivi specifici de echipamente de laborator sofisticate. Spre deosebire de qPCR, nu este necesară nicio

curbă standard pentru cuantificarea numărului de copii per probă. Acesta a permis cuantificarea mai multor agenți patogeni fungici toxigeni și netoxigeni în plantele de porumb, dezvăluie impactul genomului asupra cantității de ADN fungic din organismul gazdă.

Cu toate acestea, utilizarea pe scară largă a acestei abordări este restricționată de unele limitări critice. Pentru a efectua o singură cuantificare este nevoie de un număr mare de amplificări (nu mai puțin de 30). Prin urmare, o analiză se dovedește a fi prelungită și laborioasă. Rata de diluție ar trebui să fie calculată empiric în analiza preliminară pentru a găsi concentrația optimă de ADN pentru un număr adecvat de efecte negative într-o amplificare.

Astfel, avantajele metodei în comparație cu real-time PCR includ următoarele:

- Nu este necesar aparataj sofisticat și reagenți specifici; analiza se efectuează pe amplificator pentru PCR convențională
- Diluția terminală diminuează interferența dintre molecule de ADN și mărește eficacitatea aplicării multiplex-PCR prin amplificarea concurentă
- Nu este necesară curba de calibrare
- Metoda este universală.

La rândul său, sunt și anumite dezavantaje:

- Necesitatea unui număr mare de probe într-o serie de reacție
- Optimizarea diluției pentru a obține un număr adecvat de probe negative

Cu toate acestea, PCR convențională bazată pe analize digitale se dovedește de a fi eficientă pentru anumite tipuri de obiective practice. Poate fi folosit ca o alternativă la qPCR pentru laboratoarele cu venituri mici atunci când urmează să fie analizată o cantitate mai mică de probe. De asemenea, poate fi folosit pentru a restrânge căutarea și a verifica cele mai perspective soiuri de plante pentru analize cantitative ulterioare folosind metode validate.

ADN-ul extras prin metoda combinată a fost de calitate înaltă pentru utilizarea în analiza PCR. Prin testările experimentale s-a dovedit, că primerii *de novo* pentru qPCR și nested-PCR au arătat o specificitate ridicată pentru identificarea unor ciuperci patogene asociate cu bolile infecțioase a porumbului și alterarea boabelor în timpul depozitării. Primerii proiectați pentru clustere genomice asociate cu căile biosintetice ale fumonisinelor, aflatoxinelor, tricotecenelor, zearalenonei au permis discriminarea ciupercilor toxigenice care produc clasele principale de micotoxine, cantitățile cărora sunt reglementate de legislația Uniunii Europene și Republicii Moldova. Testele alternative de evaluare cantitativă a secvențelor de ADN bazate pe PCR convențională și valorile Cq au permis elucidarea diferenței semnificative statistic între probele analizate. Prin urmare, aceste abordări pot fi utilizate pentru analiza cantitativă și semicantitativă

a acumulării de ciuperci în probele de porumb și sol. Protocolul nested-PCR optim a inclus 30 de cicluri în runda I și II și temperatura de aliniere între 55-60°C (A2, Tab.1) pentru identificarea speciilor de funghi patogeni. Pentru analiza calitativă și cantitativă PCR a fost necesar 20 ng de ADN-matrice.

## **4. Impactul factorilor de mediu și a genotipului asupra ratei de acumulare a patogenilor fungici în plante de porumb**

### **4.1. Starea fitosanitară a câmpurilor experimentale de porumb și materialului semincer depozitat în Banca de gene IGFPP**

Solul prezintă focarul natural al infecției fungice, unde fungii patogeni sunt prezenți în calitate de parte integră a microbiotei. Plantele de porumb se află în contact permanent cu solul prin intermediul sistemului radicular și părților aeriene (tulpină, ancore, frunze), astfel fungii au posibilitatea de a infecta gazda prin răni și peri radiculari, utilizând sistemul vascular pentru propagare. În alte cazuri, patogenii pot propaga activ prin țesuturile protective ale plantei cu ajutorul apresorilor, iar vântul și insectele pot transmite sporii la distanțe mari și disemina infecția pe câmpuri de porumb îndepărtate. Plantele infectate în continuare produc boabe contaminate, și fără luarea măsurilor fitosanitare înainte de depozitare materialul semincer reprezintă de sine stătător sursa de răspândire a infecției. La sfârșitul sezonului de vegetație organele de porumb infectate în stadiu de descompunere în câmp sunt sursa secundară de infectare a solului cu patogeni. Situația se agravează în cazul monoculturii de porumb și nerespectarea agrotehnicii de cultivare, ce rezultă în acumularea din an în an a agenților cauzali de principale boli fungice pe câmpurile de porumb. Astfel, monitoringul stării fitosanitare al câmpurilor de porumb este necesar pentru prognozarea diseminării infecției fungice și luarea măsurilor preventive înainte de semănat și depozitare.

#### ***4.1.1. Dinamica fungilor din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* în plante de porumb și sol crescute pe câmpurile experimentale sub acțiunea factorilor climatici***

Propagarea fungilor este influențată în mod semnificativ de factorii abiotici ai mediului înconjurător, temperatura aerului, cantitatea de precipitații și umiditatea aerului fiind limitativi pentru dezvoltarea și înmulțirea microorganismelor. Valorile temperaturii aerului în perioada de monitorizare (2020-2022) au variat destul de uniform și nu s-a observat influența semnificativă a anului asupra parametrului respectiv (Tab. 4.1). Spre deosebire de temperatură, valorile umidității relative a aerului au variat mai pronunțat între ani. Reieșind din acest parametru, lunile cele mai nefavorabile pentru dezvoltarea fungilor au fost mai-iulie 2022 și august 2020, când valorile respective nu au atins nici 55%. Cele mai mici cantități de precipitații au fost înregistrate în lunile aprilie și august 2020, mai și iunie 2022 [232].



**Tabelul 4.1. Valorile unor factori abiotici limitativi pentru propagarea fungilor\***

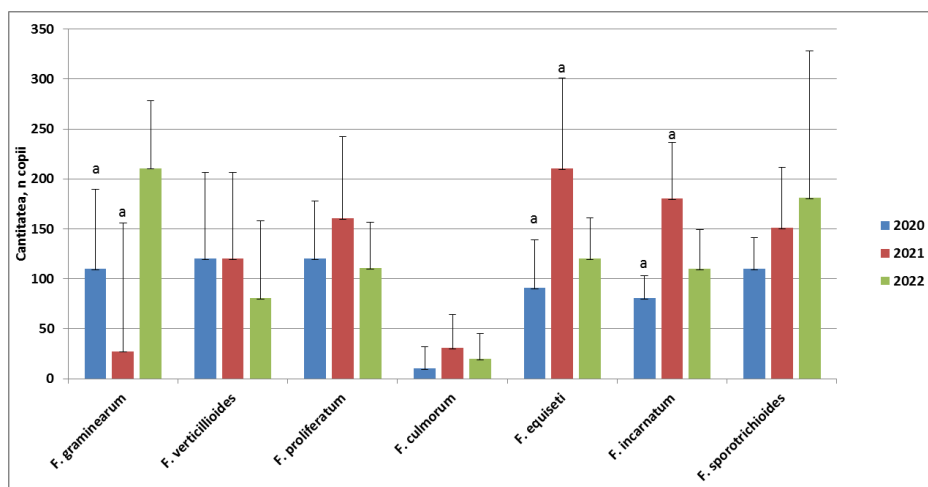
	Temperatură medie a aerului (°C)					
	Martie	Aprilie	Mai	Iunie	Iulie	August
2020	7.8±4.38 <b>ab</b>	11.3±4.64 <b>a</b>	13.9±3.56	21.3±4.88 <b>a</b>	23.2±3.12	23.5±3.16
2021	3.4±3.09 <b>a</b>	8±3.51 <b>ab</b>	14.8±2.26	19.7±5.14 <b>ab</b>	23.5±3.58	21.3±2.62
2022	3.2±4.07 <b>b</b>	10.2±3.51 <b>b</b>	16.5±3.51	21.9±2.26 <b>b</b>	23.3±2.14	23.4±2.02
	Umiditatea relativă a aerului (%)					
	Martie	Aprilie	Mai	Iunie	Iulie	August
2020	57±12.61 <b>a</b>	35±18.71 <b>ab</b>	63±16.11 <b>a</b>	64±16.56 <b>a</b>	53±11.44 <b>a</b>	47±7.41 <b>ab</b>
2021	67±18.28 <b>ab</b>	64±16.16 <b>a</b>	68±6.34 <b>b</b>	71±9.52 <b>a</b>	64±14.08 <b>a</b>	66±7.38 <b>a</b>
2022	55±21.76 <b>b</b>	60±13.97 <b>b</b>	49±8.58 <b>ab</b>	53±8.63 <b>a</b>	48±10.23 <b>a</b>	62±13.12 <b>b</b>
	Suma de precipitații (mm)					
	Martie	Aprilie	Mai	Iunie	Iulie	August
2020	20±1.22 <b>a</b>	4.4±0.52 <b>a</b>	66±11.44 <b>a</b>	86±11.6 <b>a</b>	85±6.77 <b>a</b>	4.5±1.17 <b>a</b>
2021	36±3.91 <b>a</b>	38±2.22 <b>a</b>	104±12.62 <b>a</b>	87±13.93 <b>b</b>	116±28.99 <b>ab</b>	112±22.95 <b>a</b>
2022	11±2.11 <b>a</b>	70±8.6 <b>a</b>	21±4.38 <b>a</b>	6.7±1.54 <b>ab</b>	82±22.58 <b>b</b>	82±1.57 <b>a</b>

\*literalele **ab** indică valorile, care diferă semnificativ la  $p < .05$

În stratul superficial de sol au fost identificați *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. clavatus*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *P. verrucosum*, *P. brevicompactum* [232]. Astfel, în sol au fost prezente speciile asociate cu bolile infecțioase și deteriorarea producției la porumb. Majoritatea microorganismelor detectați au fost reprezentate de fungi toxigenici, identificați în baza secvențelor genomice implicate în căile biosintetice a principalelor clase de micotoxine. Cantitatea fungilor în mostre analizate a variat în dependență de specie și anul colectării. Analiza PCR cu aplicarea distribuției Poisson a demonstrat, că cele mai abundente microorganisme au aparținut genului *Aspergillus* (190 de copii de genă-țintă per 100 mg de sol), urmate de *Penicillium spp.* (158 copii pe 100 mg de sol). Speciile de *Fusarium* au fost prezente în cantități mai mici (112 copii pe 100 mg de sol). Predominanți au fost fungii ce aparțin grupului de organisme saprotrofice și patogeni oportuniști.

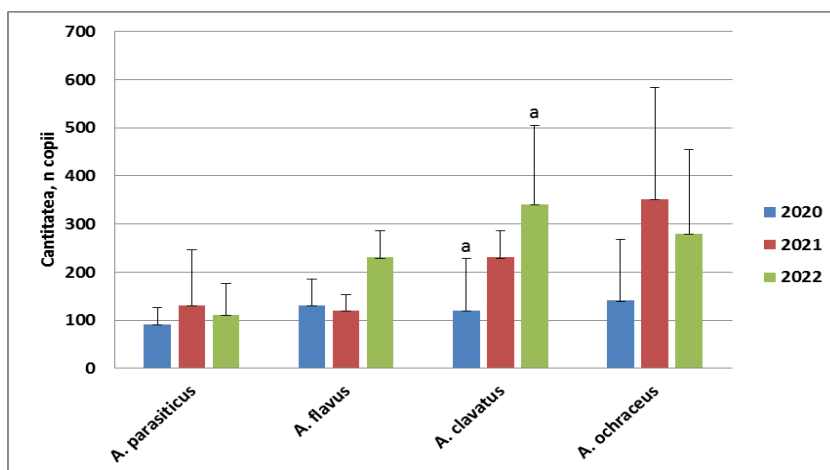
Printre speciile de *Fusarium* cantitățile cele mai mici au fost înregistrate pentru *F. culmorum* (Fig. 4.1). Pe lângă *F. graminearum*, această specie este asociată cu fuzarioza știuleților la porumb. Însă *F. graminearum* a fost identificat în cantități mult mai înalte, cu excepția anului 2021, când cantitatea ambelor specii în sol a fost similară. Cantitățile maxime de *F. graminearum* au fost înregistrate în 2022, în același sezon s-au observat cantități maxime pentru *F. sporotrichioides* [232]. Pentru majoritatea speciilor cantități minime au fost observate în 2020, iar maxime – în 2021. Condițiile sezonului de vegetație au acționat semnificativ asupra cantității în sol a *F. graminearum* [ $F(2,15)=4.61$ ,  $p=.027$ ], *F. equiseti* [ $F(2,15)=5.26$ ,  $p=.019$ ], *F. incarnatum* [ $F(2,15)=8.18$ ,  $p=.003$ ]. Pentru aceste specii s-a stabilit, că cantitățile lor au variat semnificativ

între anii 2020-2022. Pentru alte specii de *Fusarium* nu s-a stabilit un efect semnificativ al anului asupra dinamicii cantității lor în sol.



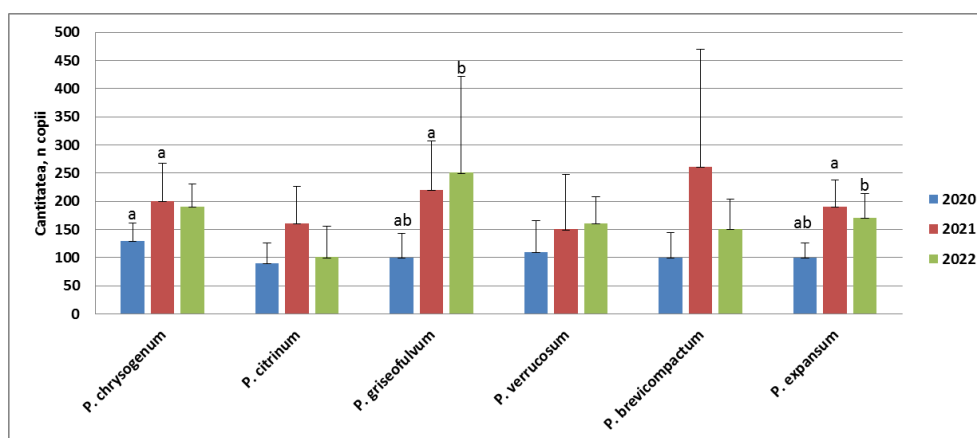
**Fig. 4.1. Cantitățile medii de fungi din genul *Fusarium* în sol (număr de copii pe 100 mg de sol). Literele indică sezoanele de vegetație dintre care cantitatea fungilor respectivi a variat semnificativ**

În general, factorii climatici ale anului nu au afectat semnificativ cantitățile fungilor *Aspergillus spp.* în sol (Fig.4.2). Excepția a fost doar *A. clavatus*, care a fost identificat în cantități mai mari în anul 2022 [ $F(2,15)=5.75$ ,  $p=.014$ ]. Împreună cu *A. ochraceus*, aceste două specii au fost cele mai abundente în sol dintre fungi din genul *Aspergillus*. Speciile *A. flavus* și *A. parasiticus*, capabile să producă aflatoxine, au fost identificate în cantități mai mici.



**Fig. 4.2. Cantitățile medii de fungi din genul *Aspergillus* în sol (număr de copii pe 100 mg de sol). Literele reprezintă sezoanele de vegetație dintre care cantitatea fungilor respectivi a variat semnificativ**

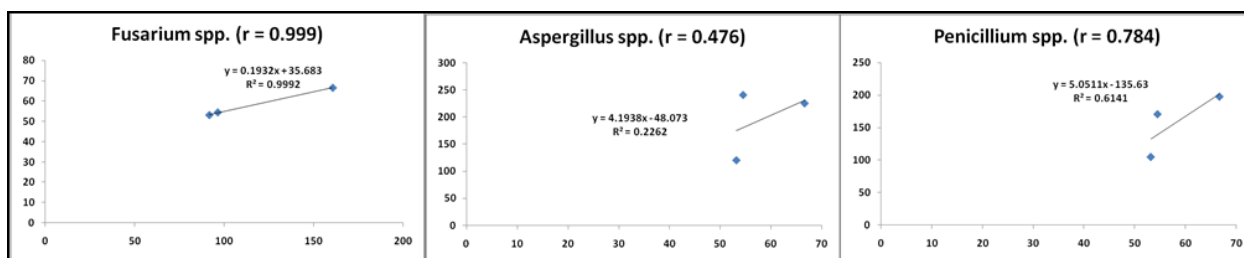
Cantitatea speciilor de *Penicillium* în sol [232] a fost mai mare comparativ cu *Fusarium spp.*, iar influența factorilor de mediu asupra dinamicii fungilor în sol a fost mai semnificativă comparativ cu *Aspergillus spp.* Cea mai mică cantitate de fungi s-a observat în anul 2020, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. brevicompactum* și *P. expansum* au fost mai abundenți în 2021 (Fig.4.3). Speciile *P. chrysogenum* și *P. griseofulvum* au predominat în sol. Anul de vegetație a afectat semnificativ cantitățile de *P. chrysogenum* [ $F(2,15)=3,85$ ,  $p=.045$ ], valorile respective au variat între anii 2020 și 2021. De asemenea, cantitățile de *P. expansum* au fost afectate de condițiile anul de vegetație [ $F(2,15)=8,98$ ,  $p=.003$ ] și diferență semnificativă în cantitățile de ciuperci a fost observată între anii 2020-2021 și 2020-2022.



**Fig. 4.3. Cantitățile medii de fungi din genul *Penicillium* în sol (număr de copii pe 100 mg de sol). Literele reprezintă sezoanele de vegetație dintre care cantitatea fungilor respectivi a variat semnificativ**

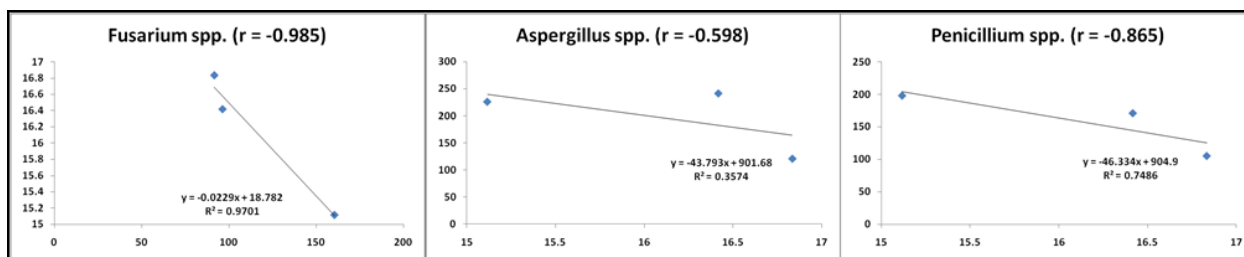
Astfel, condițiile anului au afectat neuniform dinamica fungilor în sol, nu s-a stabilit o concordanța între patogenitatea fungilor și acumularea în sol a acestora [232]. S-a observat o corelație pozitivă între cantitățile de *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* în sol și valori medii ale umidității relative (Fig. 4.4). Pentru *Fusarium spp.* corelația dintre cantitatea de ciuperci și valorile factorului respectiv a fost foarte puternic pozitivă, în timp ce pentru *Penicillium spp.* corelația a fost puternic pozitivă și pentru *Aspergillus spp.* era deja moderat pozitiv. Deși umiditatea aerului este un factor restrictiv pentru propagarea ciupercilor, impactul său poate fi diminuat de accesibilitatea umidității și, prin urmare, distribuția neuniformă a precipitațiilor în timpul sezonului de vegetație ar putea afecta impactul umidității aerului asupra acumulării ciupercilor în sol. Diferența în coeficientul de corelație Pearson pentru *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* ar putea fi explicată și prin sursele suplimentare de infestare a solului cu diferite ciuperci – *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* sunt considerați „ciuperci de depozitare”,

prin urmare, materialul de semințe de porumb în sine poate servi ca sursă de contaminare a solului cu agenții patogeni respectivi.



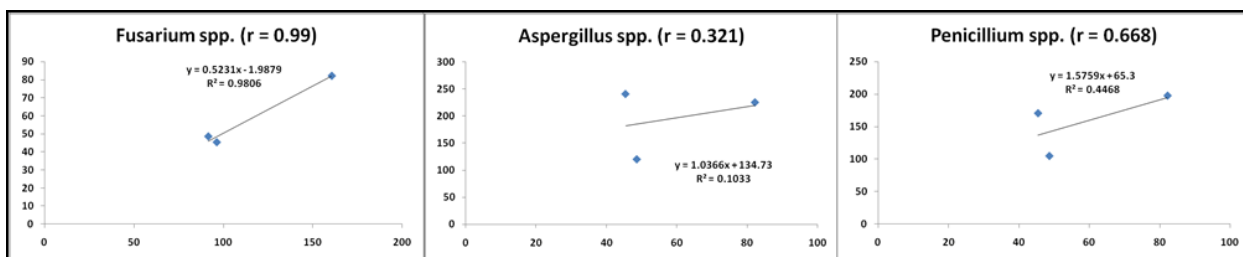
**Fig. 4.4. Corelația dintre valorile medii ale umidității relative a aerului în sezonul primăvară-vară (2020-2022) și cantitățile de *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* în sol**

Dimpotrivă, corelația dintre cantitatea de ciuperci din sol și temperatura aerului a fost negativă (Fig. 4.5). O corelație negativă foarte puternică între parametrii studiați a fost observată pentru *Fusarium spp.* și *Penicillium spp.*, în timp ce pentru *Aspergillus spp.* a existat o corelație negativă moderată. Fungii *Aspergillus* sunt mai specifici regiunilor sudice și sunt capabile să se propage la temperaturi medii mai ridicate în comparație cu genul *Fusarium*. Acestea din urmă cuprind specii care au nevoie de intervale diferite de temperaturi optime ale aerului pentru propagare, pentru unele dintre ele temperaturile mai scăzute sunt esențiale și sunt mai specifice zonelor temperate, cum ar fi *F. graminearum*. Căldura verii afectează negativ unele genotipuri de porumb, susceptibile la temperaturi ridicate ale aerului, iar plantele ofilite devin substrat pentru propagarea ciupercilor saprotrofe, slăbind corelația negativă dintre cantitățile de *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* în sol și valorile umidității relative a aerului în timpul vegetației de porumb.



**Fig. 4.5. Corelația dintre temperaturile medii ale aerului din sezonul primăvară-vară (2020-2022) și cantitățile de *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* în sol**

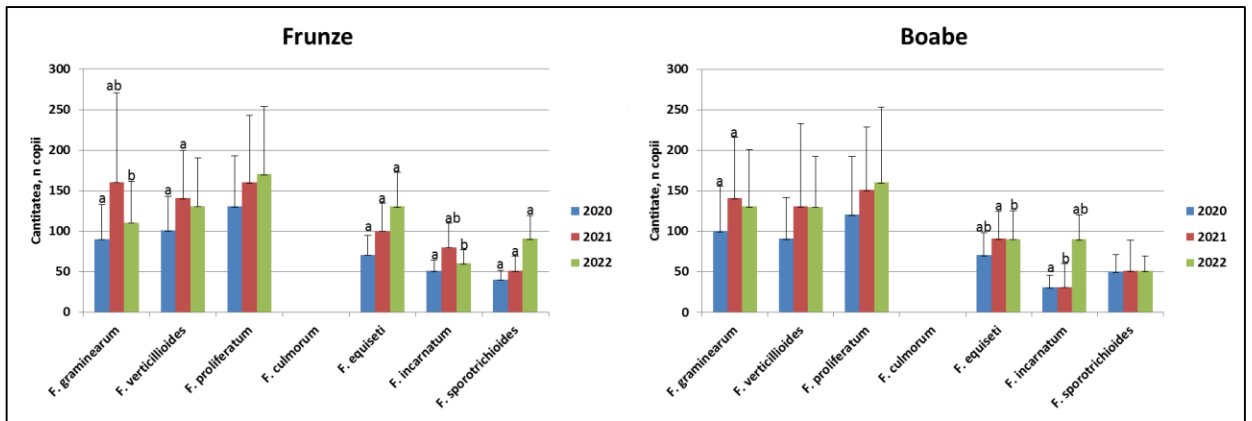
În general, corelația dintre cantitățile de precipitații din perioada vegetației porumbului și cantitățile de fungi au prezentat o tendință pozitivă (Fig. 4.6). Pentru *Fusarium spp.* acest parametru a fost puternic pozitiv, în timp ce pentru *Aspergillus spp.* era slab. Prin urmare, cantitatea de ciuperci *Aspergillus* din sol a fost mai puțin influențată de cantitățile de precipitații în comparație cu ciupercile *Penicillium* și *Fusarium*.



**Fig. 4.6. Corelația dintre cantitățile de precipitații din sezonul primăvară-vară (2020-2022) și cantitățile de *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* în sol**

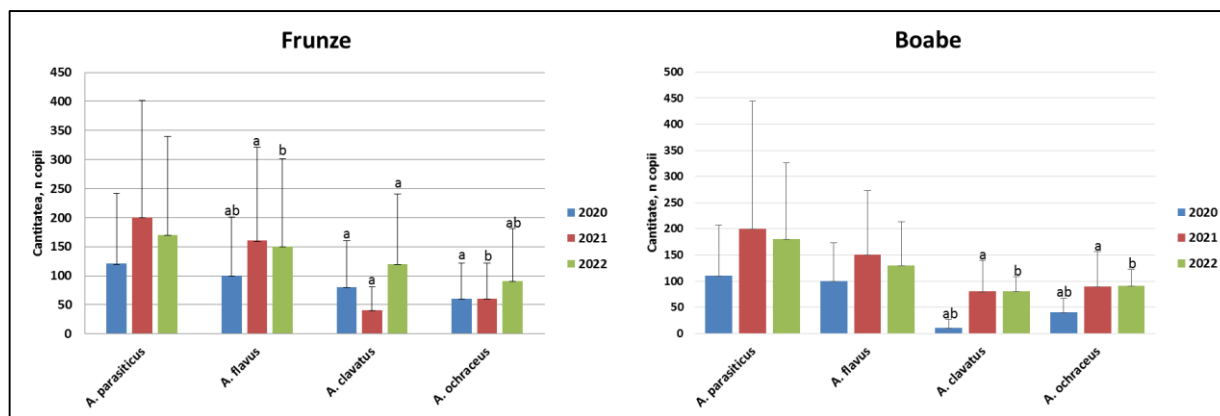
Astfel, agenții cauzali majori și minori ai FER și GER, precum și agenți patogeni oportuniști precum *Aspergillus spp.* și *Penicillium spp.* care provoacă alterarea cerealelor în timpul depozitării au fost identificate în sol pe o perioadă de 3 ani de monitorizare. Multe dintre aceste specii sunt capabile să producă fumonisine, aflatoxine, tricotecene, ochratoxină A, patulină și alte câteva micotoxine, care au un impact negativ grav asupra sănătății umane, productivității animalelor și calității boabelor de porumb în timpul depozitării în Banca de Gene.

Spre deosebire de sol, în mostre de material vegetal a fost absent *F. culmorum* atât în frunze, cât și în boabe, pe parcursul a întregii perioade de vegetație. Cele mai abundente specii de *Fusarium* în frunze au fost *F. verticillioides* și *F. proliferatum*, *F. graminearum* a fost identificat mai rar și în cantități mai mici. Printre patogenii minori cel mai frecvent și abundent a fost *F. equiseti* – producător de zearalenonă, iar frecvența și cantitatea medie ale *F. incarnatum* și *F. sporotrichioides* a fost mai mică (Fig. 4.7). În anul 2022 s-a observat propagarea intensivă a *F. sporotrichioides*, care a fost identificat aproape atât de des cât și *F. graminearum*. Ultimul a fost abundent în anul 2021, apoi cantitatea și frecvența *F. graminearum* au scăzut. În boabe cantitatea *F. graminearum* și *F. verticillioides* au fost similare, iar rata de infestare nu a depășit 35%. Cel mai abundent a fost *F. proliferatum*, care a fost identificat în boabe în cantități mai mari pe parcursul anului 2020, când condițiile au fost nefavorabile. Printre agenții cauzali ai fuzariozei minori cel mai abundent a fost *F. equiseti*, urmat de *F. sporotrichioides*. Însă în anul 2022 se observa rata ridicată a infestării boabelor de porumb cu *F. incarnatum*, cantitățile căruia au atins nivelurile *F. equiseti*.



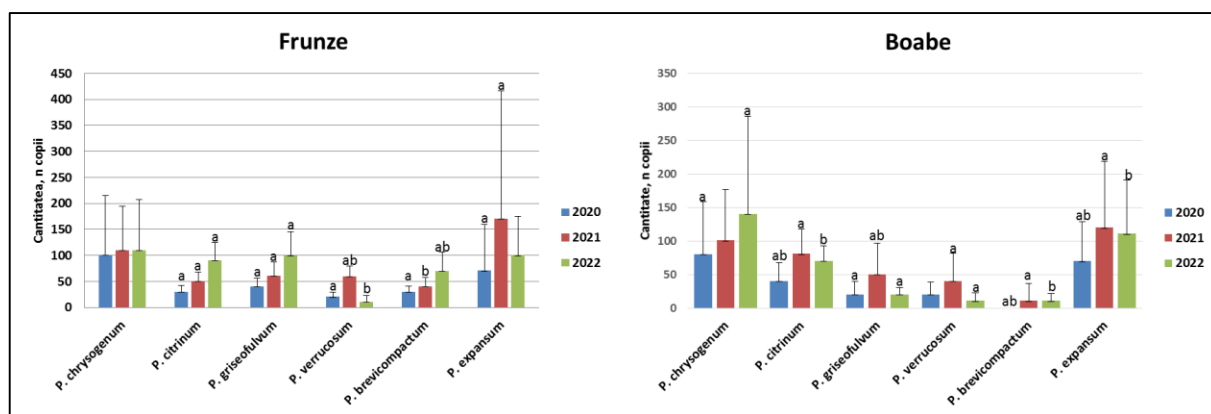
**Fig. 4.7. Cantitățile medii de fungi din genul *Fusarium* în frunze și boabe de porumb (număr de copii pe 100 mg de material vegetal). Perechile de litere cu asterisc reprezintă sezoanele de vegetație dintre care cantitatea fungilor respectivi a variat semnificativ**

Cantitatea de *A. parasiticus* a fost mai mare comparativ cu *A. flavus*, deși această specie este mai caracteristică rizosferei. În 2021 s-a observat scăderea cantității de *A. clavatus* comparativ cu anul 2020, iar valorile medii ale *A. clavatus* și *A. ochraceus* au fost aproape identice (Fig. 4.8). Condițiile climatice au avut un impact mai semnificativ asupra frecvenței *A. clavatus* și *A. ochraceus* ( $p < .0001$ ). În mod similar condițiile de mediu au afectat cantitatea speciilor de *Aspergillus* în frunze de porumb: s-a observat acțiunea moderată asupra cantității de *A. parasiticus* și *A. flavus* și acțiunea puternică asupra cantității *A. clavatus* și *A. ochraceus* în frunze de porumb. În boabe de porumb la fel au predominat speciile *A. flavus* și *A. parasiticus*. Însă cantitățile acestor două specii au fost similare comparativ cu valorile respective în frunze. Rata maximă de infectare a boabelor de porumb cu speciile de *Aspergillus* a fost de 35%. Cantitatea de *A. clavatus* a fost minimă în anul 2020, specia practic a lipsit în boabe, în timp ce în frunze a fost identificată în cantități mai ridicate. Cantitatea de *A. ochraceus* în boabe nu s-au deosebit semnificativ de valoarea respectivă în frunze. S-a constatat impact puternic a condițiilor climatice asupra cantității *A. clavatus* și *A. ochraceus* în boabe. Factorii mediului înconjurător nu au afectat semnificativ acumularea de *A. flavus* și *A. parasiticus* în boabe.



**Fig. 4.8. Cantitățile medii de fungi din genul *Aspergillus* în frunze și boabe de porumb (număr de copii pe 100 mg de material vegetal). Perechile de litere cu asterisc reprezintă sezoanele de vegetație dintre care cantitatea fungilor respectivi a variat semnificativ**

În frunze de porumb cele mai frecvente specii de *Penicillium* au fost *P. chrysogenum* și *P. expansum*, urmate de *P. citrinum* și *P. griseofulvum* (Fig. 4. 9). Toate speciile sunt capabile să sintetizeze micotoxine. Cantitățile de *P. chrysogenum* au fost destul de uniforme pe parcursul anilor 2020-2022 și nu au deviat semnificativ de valoarea medie pentru perioada de observare. În anul 2021 când s-a constatat scăderea frecvenței și cantității fungilor din genul *Penicillium* în frunze de porumb, această specie a arătat cantitățile cele mai ridicate. În anul 2022 se observă înmulțirea intensivă a speciilor *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. citrinum* și *P. chrysogenum*. În contrast, în același an *P. verrucosum* a manifestat cea mai mică cantitate și frecvență în frunze comparativ cu alte specii. Cea mai înaltă rată de infestare a frunzelor cu *Penicillium* sp. de 30% a fost constatată în 2021 pentru specia *P. expansum*. Condițiile de mediu nu au afectat semnificativ cantitatea *P. chrysogenum* în frunze de porumb și au afectat moderat cantitatea *P. expansum*. Efectul factorilor climatici a fost mai pronunțat asupra frecvenței *P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *P. verrucosum* și *P. brevicompactum*. Distribuția speciilor de *Penicillium* în boabe de porumb a fost asemănătoare cu cea din frunze. De asemenea, speciile predominante au fost *P. expansum* și *P. chrysogenum*, dar comparativ cu frunze speciile *P. griseofulvum*, *P. verrucosum* și *P. brevicompactum* au fost identificate mai rar și cantități semnificativ mai mici. În 2020 *P. brevicompactum* a fost absent în boabe, în următorii ani frecvența și cantitatea acestei specii au fost minime și nu se deosebeau semnificativ în perioada 2021-2022. Condițiile au afectat semnificativ cantitatea tuturor speciilor de *Penicillium* în boabe de porumb. Factorii climatici au influențat moderat cantitățile de *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*, *P. verrucosum*, *P. expansum*, puternic – *P. citrinum*, *P. brevicompactum*.



**Fig. 4.9. Cantitățile medii de fungi din genul *Penicillium* în frunze și boabe de porumb (număr de copii pe 100 mg de material vegetal). Perechile de litere cu asterisc reprezintă sezoanele de vegetație dintre care cantitatea fungilor respectivi a variat semnificativ**

Corelația dintre concentrația și frecvența fungilor în organele plantelor de porumb a fost diferită pentru speciile luate în studiu, ceea ce implică acțiunea factorilor adiționali asupra acumularea patogenilor în plantă-gazdă. Pentru *F. culmorum* nu s-a stabilit o corelație distinctă dintre concentrația în sol și plantă – patogenul a fost prezent în cantități mici în sol și absent în planta-gazdă pe durata perioadei de monitorizare (Tab. 4.2). Pentru *F. graminearum* s-a stabilit o corelație pozitivă puternică dintre concentrația patogenului în sol și acumularea fungului în organele plantelor de porumb. Aceasta implică, că sursa primară de infectare a porumbului cu patogenul dat prezintă solul, iar majoritatea genotipurilor cultivate pe loturile experimentale sunt susceptibile la acest fung.

**Tabelul 4.2. Coeficientul de corelație Pearson între cantitatea fungilor patogeni în sol și plante de porumb**

Speciile	Sol/boabe	Sol/frunze	Frunze/boabe
<i>F. graminearum</i>	0.99	0.93	0.92
<i>F. verticillioides</i>	-0.35	-0.28	0.99
<i>F. proliferatum</i>	0.27	0.11	0.98
<i>F. equiseti</i>	0.74	0.13	0.76
<i>F. incarnatum</i>	-0.15	0.99	-0.21
<i>F. sporotrichioides</i>	0.8	0.93	0.96
<i>A. parasiticus</i>	0.95	0.99	0.95
<i>A. flavus</i>	-0.02	0.27	0.96
<i>A. clavatus</i>	0.87	0.52	0.04
<i>A. ochraceus</i>	0.88	0.14	0.56
<i>P. chrysogenum</i>	0.65	0.81	0.86
<i>P. citrinum</i>	0.85	-0.03	0.48
<i>P. griseofulvum</i>	0.31	0.94	-0.05
<i>P. verrucosum</i>	0.11	0.13	0.99
<i>P. brevicompactum</i>	0.85	0.01	0.53
<i>P. expansum</i>	0.98	0.86	0.74



În contrar, pentru *F. verticillioides* s-a stabilit corelație negativă moderată dintre cantitatea patogenului în sol și în boabe, iar pentru cantitatea în frunze corelația a fost slabă negativă. Astfel, relația sol-plantă pentru acest patogen este invers proporțională și slab asociată de concentrația primară a *F. verticillioides* în rizosfera plantei. După infestarea gazdei, concentrația patogenului crește independent de micșorarea cantității acestuia în sol. Probabil, acest fenomen poate fi explicat prin rezistența slabă a plantelor și prezența altor surse de infestare a plantelor cu *F. verticillioides*. Materialul semincer poate prezenta sursa principală de infestare. Pentru *F. proliferatum* nu s-a stabilit o corelație semnificativă dintre cantitatea patogenului în sol și organele plantelor de porumb. Deși fungul este prezent în sol, concentrația lui în rizosfera plantei nu acționează semnificativ asupra acumulării în plante, probabil, datorite rezistenței moderate a plantelor de porumb. Specia *F. equiseti* a manifestat corelație foarte slabă dintre cantitatea în sol și cantitatea fungului în frunze, probabil datorită faptului, că populația acestei specii este reprezentată de tulpini nepatogene și tulpini care nu pot pătrunde prin bariera mecanică a frunzelor. Dar pentru concentrația fungului în boabe s-a stabilit o corelație pozitivă puternică. Se poate presupune, că solul este principală sursă de infestare, iar *F. equiseti* pătrunde în boabe prin răni sau stigmat, ocolind bariera naturală a pănușilor. Pentru *F. incarnatum* s-a stabilit corelația pozitivă foarte puternică dintre concentrația fungului în sol și acumularea acestuia în frunze. Însă pentru boabe corelația a fost negativă și foarte slabă. Ținând cont că cantitatea fungului în plantă a fost mai mică comparativ cu sol, se poate presupune, că acest patogen este mai specific filosferei, iar propagarea în boabe este stagnată fie de condiții suboptime ale mediului extern în perioada de coacere și/sau concurența din partea altor specii din microbiomul boabelor, ce duce la diminuarea cantității *F. incarnatum* în boabe. Ca și în cazul *F. verticillioides*, pentru *F. sporotrichioides* s-a stabilit relație foarte slabă negativă dintre cantitatea fungului în sol și acumularea lui în plantele de porumb. Probabil, această se datorează acțiunii neuniforme asupra plante-gazdă, fie proceduri agrotehnice neadecuate, fie concurența cu alte specii de fungi, ce infestază gazda.

Pentru speciile de *Aspergillus* în majoritatea cazurilor s-a stabilit corelație pozitivă dintre concentrația patogenului în sol și acumularea în plantă-gazdă. Pentru *A. parasiticus* se observă dependență proporțională dintre cantitatea speciei în sol și cantitatea în organele plantelor de porumb. Astfel, solul poate fi considerată sursa primară de infestare sistemică ale plantei și boabelor. Pentru *A. flavus* nu s-a depistat dependență semnificativă dintre cantitatea fungului în sol și plantă-gazdă. Probabil, sursa primară de infecție o prezintă boabele infectate pe parcursul depozitării. Pentru *A. clavatus* se observă corelație moderată dintre concentrația patogenului în sol

și acumularea în frunze, iar pentru boabe corelația a fost puternic pozitivă. Pentru *A. ochraceus* relația sol-frunze este și mai slabă, iar pentru boabe este de asemenea puternic pozitivă. Aceste specii nu sunt considerate patogeni agresivi și nu provoacă boli sistemice. Însă sunt specifice boabelor și, probabil, le infectează prin răni și stigmatate – căile de infestare tipice pentru unele specii de *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*.

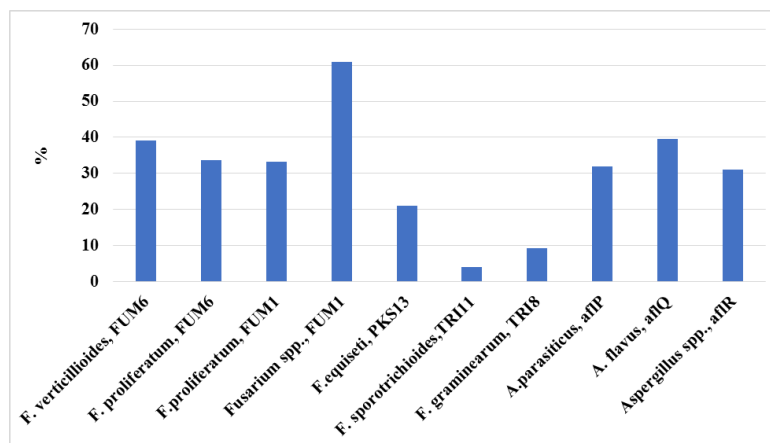
Specia *P. chrysogenum* a manifestat o corelație pozitivă destul de uniformă dintre concentrația fungului în sol și acumularea lui în organele plantelor de porumb. Din aceasta reiese, că populația patogenului din sol este sursa primară din infestare a plantelor și propagarea microorganismelor în filosferă și boabe. Pentru *P. citrinum* s-a observat o corelație pozitivă puternică dintre cantitatea speciei în sol și acumularea în boabe, iar pentru cantitatea în frunze corelația a fost slab negativă. Probabil, fungul este specific microbiomului superficial, dar nu tinde să infesteze planta. Pentru altă specie, *P. griseofulvum*, corelația dintre concentrația patogenului în sol și acumularea în organele plantelor de porumb a fost inversă cu cea pentru *P. citrinum* – se observă o corelație puternică pentru cantitatea fungului în frunze și slabă pentru acumularea în boabe. Probabil, fungul este specific filosferei sau în boabe cantitatea lui este diminuată de concurența cu alte specii. Pentru *P. verrucosum* nu s-a observat corelație semnificativă dintre concentrația patogenului în sol și acumularea în plante. Astfel, densitatea populației fungului în rizosfera porumbului nu joacă un rol important în propagarea acestei specii în plante. Pentru *P. brevicompactum* din nou se observă o corelație pozitivă semnificativă dintre acumularea fungului în boabe de porumb și concentrația lui în sol. Iar pentru acumularea lui în frunze nu s-a observat o corelație semnificativă. Reieșind din cantitățile mici ale fungului, probabil, el nu tinde să infesteze sistemic planta și pătrunde în boabe cu particule de sol sau prin intermediul insectelor, dar în general este înlăturat din microbiomul plantei prin concurența cu alte specii sau datorită factorilor de rezistență constitutivi ale plantelor de porumb. Pentru *P. expansum* s-a observat corelație puternică pentru frecvența și cantitatea fungului în boabe și frunze de porumb și cantitatea lui în sol. Astfel, rizosfera este sursa primară de infectare a plantelor de porumb cu această specie.

Corelația dintre concentrația fungilor din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* în sol și acumularea acestora în organele plantelor de porumb arată, că în perioada de monitorizare asupra propagării fungilor respectivi în planta-gazdă a acționat mai mulți factori externi: susceptibilitatea plantei-gazdă, factorii climatici, concurența între specii în microbiomul plantei, starea fitosanitară a materialului semincer. În cazul speciilor *F. graminearum*, *A. clavatus*, *P. expansum*, *P. chrysogenum* s-a observat o corelație puternică dintre concentrația acestor fungi în sol, infecții sistemice ale plantelor de porumb și acumularea în boabe. Toate speciile sunt

producători activi de micotoxine periculoase: fumonisine, aflatoxine, ocratoxina A, patulină. Astfel, microbiomul rizosferei joacă un rol esențial în propagarea acestor specii în plante. În acest caz, ameliorarea stării fitosanitare a solului poate duce la scăderea ratei de infestare a porumbului cu fungii dați.

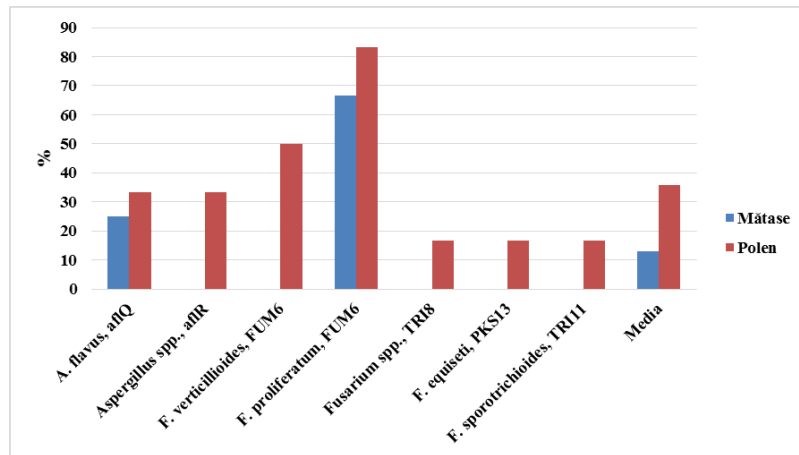
#### **4.1.2. Identificarea fungilor toxigenici în materialului semincer depozitat în Banca de gene a IGFPP**

Unsprezece secvențe ale genomului fungic asociate cu producția de aflatoxine, fumonisine, zearalenonă, T-2 și DON în diferite ciuperci din genurile *Aspergillus* și *Fusarium* au fost identificate și cuantificate în boabele de porumb după depozitarea în Banca de Gene a IGFPP. Știuletele de porumb colectate nu prezentau simptome distincte ale putregaiului fungic. Speciile de *Aspergillus* și *Penicillium* capabile să producă ocratoxină A și patulină nu au fost identificate în materialul semincer. Analiza frecvenței infectării a arătat că 30,4% din boabele de porumb depozitate au fost infectate cu cel puțin o tulpină toxigenă de ciuperci patogeni, în timp ce în doar 4% din probe nu a fost identificată nici una dintre genele fungice asociate cu producția de micotoxine. În plus, una sau două tulpini de ciuperci toxice au fost identificate în aproximativ 4% din probele analizate, în 8% s-a observat infecția mixtă de 3, 5 și 6 tulpini, iar în aproximativ 21% din probe s-a observat infecția mixtă de 4, 7 și 8 tulpini fungice toxigenice. Mai mult de jumătate din probele de boabe analizate au fost infectate cu specii producătoare de fumonisină din genul *Fusarium* care au fost detectate pe secvența genei *FUM1* specifică pentru mai multe specii toxigenice (Fig.4.10). Frecvența *F. verticillioides* a fost puțin mai mare în comparație cu alt agent patogen major al porumbului, *F. proliferatum*, care provoacă putregaiul spicului. Mai puțin frecvente au fost toxigenice *F. sporotrichioides* și *F. graminearum* – rata de infectare cu acești agenți patogeni nu a ajuns nici măcar la 10%. Ciupercile *Aspergillus* producătoare de aflatoxină au fost identificate cu aceeași frecvență ca și ciupercile *Fusarium* producătoare de fumonisină și nu a existat o diferență semnificativă de frecvență între *A. flavus* și *A. parasiticus*, deși acesta din urmă este raportat a fi mai specific pentru rizosfera plantelor. Tulpinile de *F. equiseti* producătoare de zearalenonă au fost a doua specie frecventă de *Fusarium*. În general, s-a observat predominanța tulpinilor toxigenice de *Fusarium spp.* și *Aspergillus spp.* în boabele de porumb, iar apariția concomitentă a lor a fost identificată în 70,8% din boabele analizate.



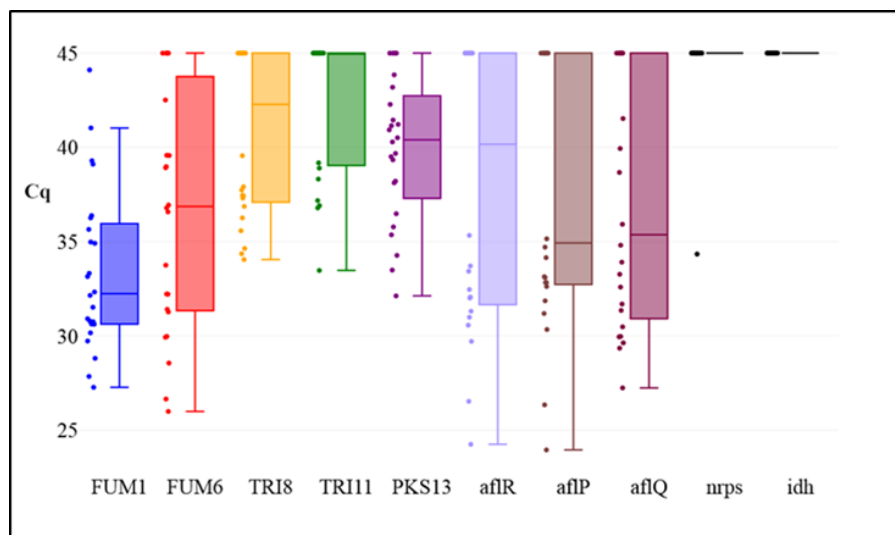
**Fig. 4.10. Frecvența genelor asociate cu dinteza micotoxinelor, identificate în boabele de porumb depozitate în Banca de gene a IGFPP**

Ciupercile toxice au fost de asemenea detectate atât în polen, cât și în mătase. Frecvența agenților patogeni a fost mai mare în probele de polen comparativ cu mătase – 35,7% și respectiv 13,1% (Fig.4.11). Fungul *A. parasiticus* toxigen a fost absent în probele analizate. În plus, în mătase au fost identificate doar *A. flavus* și *F. proliferatum* toxigeni. Dimpotrivă, în probele de polen au fost identificate șapte ciuperci toxigenice, cele mai frecvente fiind *F. proliferatum* producător de fumonisină și *Aspergillus spp.* care au fost prezente în aproximativ 30% din probe. Datorită ȳesuturilor umede și a abundenței de compuși organici, era de așteptat ca frecvența ciupercilor toxigenice să fie mai mare în mătase în comparație cu polenul. Din datele obținute s-ar putea explica faptul că unele dintre ciupercile studiate nu sunt capabile să se înmulțească în mătase sau preferă mătăsuri mai senescente. În favoarea acestui argument vorbesc frecvențele similare ale *F. proliferatum* și *A. flavus*, care au fost ambele identificate în mătase și polen. Alte explicații ar putea include seceta severă în a doua jumătate a verii, iar expunerea la căldură extremă și lipsa precipitațiilor au împiedicat propagarea fungică în mătase. Mai mult, mătasea de porumb poate conține metaboliți care sunt toxici pentru ciuperci. Cu toate acestea, prezența în mătase a producătorilor de fumonisină și aflatoxină reprezintă un risc semnificativ pentru infecția boabelor și contaminarea ulterioară cu micotoxine, deoarece propagarea prin stigmat conferă agentului patogen capacitatea de a ignora bariera naturală a pănușilor de porumb. În plus, polenul însuși poate juca rolul de vector natural pentru diseminarea ciupercilor în lanurile de porumb în condiții de vreme uscată.



**Fig. 4.11. Frecvența genelor asociate cu dinteza micotoxinelor, identificate în organele generative de porumb**

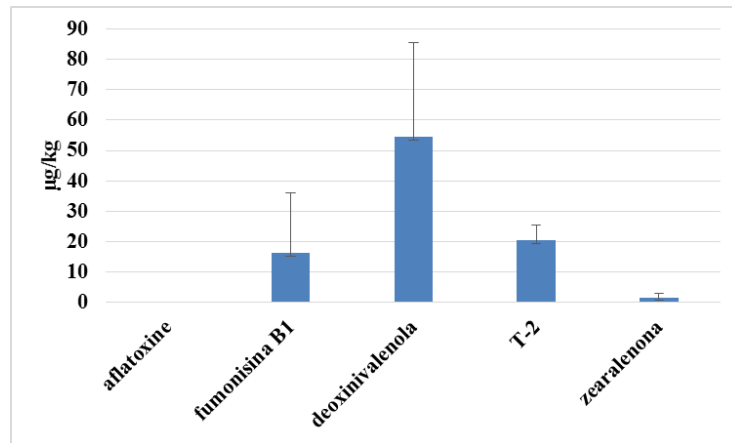
Valorile medii Cq pentru majoritatea secvențelor fungice asociate cu producția de micotoxine au variat între 31 și 36, indicând concentrații medii până la scăzute de ADN țintă (Fig.4.12). Cu toate acestea, dispersia valorilor Cq a diferit semnificativ pentru fiecare genă identificată: 33% dintre probe au prezentat un conținut ridicat (Cq<29) de *FUM6* specific pentru *F. verticillioides* și *FUM1* comun pentru mai multe specii de *Fusarium* toxigeni, în timp ce 20,8% din probele au prezentat un conținut ridicat de *FUM6* specific pentru *F. proliferatum* toxigen și *aflQ* specific pentru tulpinile de *A. flavus* producătoare de aflatoxină. Doar câteva probe au arătat acumularea de secvențe *TRI11* și *TRI8* în concentrații scăzute. Cantitatea relativă de *F. equiseti* capabilă să producă zearalenonă a fost nesemnificativă.



**Fig. 4.12. Diagrama Boxplot a valorilor Cq ale genelor asociate cu producția de micotoxine în ciuperci**

Folosirea secvenței genei *FUM1* comună pentru mai mulți fungi a evidențiat o rată ridicată de infestare a boabelor cu mai multe ciuperci toxigenice din genul *Fusarium*. Speciile de *Fusarium* toxigenice au fost discriminate și cuantificate pe baza a două secvențe de gene - *FUM1* și *FUM6* asociate cu producția de fumonisină. Secvențele *FUM1* și *FUM6* specifice pentru *F. proliferatum* toxigenic au prezentat cele mai mici cantități în probele de boabe. Cu toate acestea, utilizarea genei *FUM1* ca secvență-țintă a arătat o concentrație semnificativ mai mică de *F. proliferatum* toxigenic în probele de boabe în comparație cu secvența *FUM6*. Valorile de Cq diferite ale secvențelor *FUM1* și *FUM6* în clusterelor biosintetice de fumonisină și eterogenitatea populațiilor de *Fusarium* din boabe infectate pot explica această diferență. Cea mai mare concentrație în țesutul vegetal a fost calculată pentru *F. verticillioides*, o altă specie asociată cu FER (*Fusarium ear rot*), folosind aceeași genă *FUM6* ca secvență-țintă. În probele de boabe analizate au fost identificate atât *A. flavus*, cât și *A. parasiticus*, principalele ciuperci producătoare de aflatoxine asociate cu aspergiloza porumbului. Primerii secvenței *aflP* au permis discriminarea eficientă a celor două specii și analiza semicantitativă lor în probele de plante.

În mostrele de boabe de porumb din Banca de gene au fost identificate aflatoxine, fumonisine, zearalenona, toxina T-2, deoxinivalenola, însă concentrațiile acestora nu au depășit normele admisibile (Fig. 4.13). Ocratoxina A și patulina nu au fost identificate. Aflatoxinele au fost găsite în cele mai mici cantități, care au variat între 0.001-0.005 μg/kg. Cea mai abundentă a fost micotoxina DON, produsă de fungii toxigenici *F. graminearum*, care au fost printre cei mai numeroși fungi din genul *Fusarium* în boabe. Cantitățile medii de T-2 și fumonisine nu s-au deosebit semnificativ. Aceste micotoxine de asemenea sunt sintetizate de speciile de *Fusarium*, în principal *F. verticillioides*, *F. proliferatum* și *F. sporotrichioides*, care în abundență au fost găsiți în boabe depozitate.



**Fig. 4.13. Concentrațiile aflatoxinelor, fumonisinelor, deoxinivalenolei, toxinei T-2 și zearalenonei în boabe de porumb după șase luni de depozitare, obținute prin testul ELISA**

S-a stabilit corelație foarte puternică între cantitatea micotoxinelor și cantitatea genelor asociate cu căile biosintetice ale micotoxinelor pentru aflatoxine ( $r=0.98$ ) și zearalenonă ( $r=0.92$ ). Pentru fumonisine s-a stabilit o corelații pozitivă moderată ( $r=0.6$ ), iar pentru DON și T-2 parametru dat a fost negativ ( $r=-0.76$  și  $r=-0.95$  respectiv). Valorile diferite ale coeficientul Pearson pot fi explicate de rolul diferit al micotoxinelor în biologia fungilor. Fumonisinele sunt asociate cu patogeneza și ușurează infectarea plantelor de către unele specii de *Fusarium*, în timp ce aflatoxinele activează în calitate de antioxidanți și mărește capacitatea de supraviețuire a fungilor *Aspergillus* în condiții de stres, iar zearalenonă inhibă propagarea fungilor de medii solide. Ultimul poate avea rol important pentru concurența fungilor în condiții de propagare activă. Astfel, cu cantitatea fungilor toxigenici corelează cantitatea acelor micotoxine, care joacă un rol important în propagarea și rezistența fungilor la factori abiotici și biotici. Micotoxinele DON și T-2 de asemenea joacă un rol important în ecologia fungilor; T-2 conferă avantaje de supraviețuire iar DON facilitează propagarea fungului după zona de infecție inițială. Sinteza acestor micotoxine este dirijată de clusterul biosintetic al tricotecenelor. Se poate presupune, că speciile toxigenice de *Fusarium* identificate în boabe sunt capabile să sintetizeze mai multe micotoxine din această familie, iar populația lor este eterogenă și între specii există o interacțiune ceea ce reiese în cantități diferite de micotoxine și corelația diferită dintre numărul de gene și concentrația metaboliților secundari.

Astfel, boabele obținute din plante de porumb cultivate pe loturile experimentale nu au acumulat niveluri semnificative de micotoxine. Cu toate acestea, toate probele testate au acumulat cantități medii și mari de grupuri de gene *afl* și *FUM*, care indică prezența ciupercilor producătoare de aflatoxină și fumonisină în boabe. Apariția concomitentă a *Aspergillus spp.* și *Fusarium spp.* a fost cea mai răspândită și observată în mai mult de 70% din boabele analizate. Aceasta înseamnă

că boabele de porumb înainte de depozitare sunt infectate cu ciuperci care sunt capabile să producă micotoxine periculoase chiar și în condiții de secetă, care nu sunt favorabile înmulțirii fungice. Cu toate acestea, dacă nu sunt respectate condiții stricte de depozitare, aceste ciuperci sunt capabile să se înmulțească rapid și să contamineze boabele de porumb cu fumonisine și aflatoxine. Prin urmare, boabele de porumb obținute în condițiile lanurilor lanurilor experimentale prezintă un anumit risc toxigen. Testele preliminare de screening efectuate în lucrările curente sugerează că este necesară o monitorizare amănunțită a riscurilor asociate cu expunerea la micotoxine folosind metode mai precise și mai sensibile de detectare în câmpurile de porumb.

#### **4.2. Impactul genotipului de porumb asupra rata infectării plantei cu patogeni fungici**

Calitatea boabelor de porumb este afectată de mai mulți factori, unul dintre ei fiind conținutul de umiditate a bobului. Prin urmare, evaluarea conținutului de umiditate din boabe înainte de recoltare este esențială pentru obținerea unui randament de înaltă calitate. Conținutul de umiditate de recoltare al boabelor de porumb este asociat cu două caracteristici principale: coacerea timpurie și capacitatea de a pierde rapid umiditatea în etapele finale ale ontogenezei. Contribuția fiecăreia dintre aceste caracteristici este determinată de condițiile de vegetație a plantelor și de maturarea boabelor. Capacitatea de eliberare a apei a știuleților este unul dintre parametrii-cheie pe baza cărora poate fi evaluată rezistența constitutivă a porumbului la ciuperci. Deoarece apa capilară și umiditatea ridicată sunt esențiale pentru propagarea ciupercilor, trăsăturile morfofiziologice care asigură acumularea de umiditate în țesutul știuletelui pot servi ca indici ai susceptibilității porumbului la agenții patogeni fungici. În acest sens, au fost selectate mai multe caractere, asociate cu eliberarea apei, pentru a descrie genotipurile de porumb de interes: perioada de înflorire-maturare, acoperirea știuleților cu pănuși, raportul dintre lungimile știuleților și pănușilor, diametrul coceanului, numărul de rânduri de boabe pe știulete (Tab.4.3.).



**Tabelul 4.3. Valorile unor indici morfofiziologici ale genotipurilor de porumb**

	Perioada înflorire-maturare, zile*	Acoperirea știuleților cu pănuși, 1-7 puncte**	Raportul dintre lungimile știuleților și pănușilor***	Diametrul știuletelui, mm	Numărul de rânduri de boabe pe știulete	Diametrul coceanului, mm
MAN2308	53	4	2	47	14	36
MAN2452	56	5	2	50	16	37
MAN2414	56	5	2	36	14	25
MAN2413	56	5	2	39	14	29
MAN2451	56	5	1	37	14	26
MAN2424	53	5	2	39	14	26
MAN2425	53	5	2	36	12	25
MAN2459	53	5	2	34	16	25
MAN2448	65	7	3	40	16	30
MAN2281	49	5	2	35	14	26
MAN2461	53	4	1	33	12	24
MAN2526	56	5	2	46	16	33
CP148	45	5	2	33	16	23
CP137	43	4	2	35	14	24
MK01	46	5	2	40	16	28
KU123	52	5	2	38	12	28
B73	69	5	2	43	14	32
MAN2488	48	4	2	34	12	23
MAN2493	56	5	2	38	14	27
MAN2491	53	5	2	31	14	22
MAN2483	50	5	2	37	12	28
MAN2470	53	5	2	30	14	20
MAN2466	53	5	1	39	12	26
MAN2463	53	4	3	30	12	19

\* perioada de la sfârșitul înfloririi a știuleților până la maturitatea fiziologică a boabelor

\*\* 3 – acoperire nesatisfăcătoare, 5 – intermediară, 7 – bună [232]

\*\*\* 1 – lungimea știuletelui depășește lungimea pănușilor, 2 – lungimea știuletelui și pănușilor sunt egal, 3 – știulete este mai scurt decât pănușii

Perioada de înflorire-maturare arată cât de repede trec plantele de porumb de la apariția mătăsii până la maturitatea completă a bobului, iar cu cât această perioadă este mai scurtă, cu atât este mai mic riscul de infecții fungice. În stadiile intermediare, boabele subdezvoltate sunt cele mai susceptibile la ciuperci, pentru că țesuturile lor umede, bogate în substanțe organice sunt predispuse la mucegai, în timp ce boabele mature și uscate prezintă mediu mai puțin favorabil pentru dezvoltarea patogenului. Pănușile prezintă o barieră mecanică naturală pentru diferiți agenți patogeni. Acoperirea completă, uniformă și groasă a inflorescenței cu pănuși salvează boabele

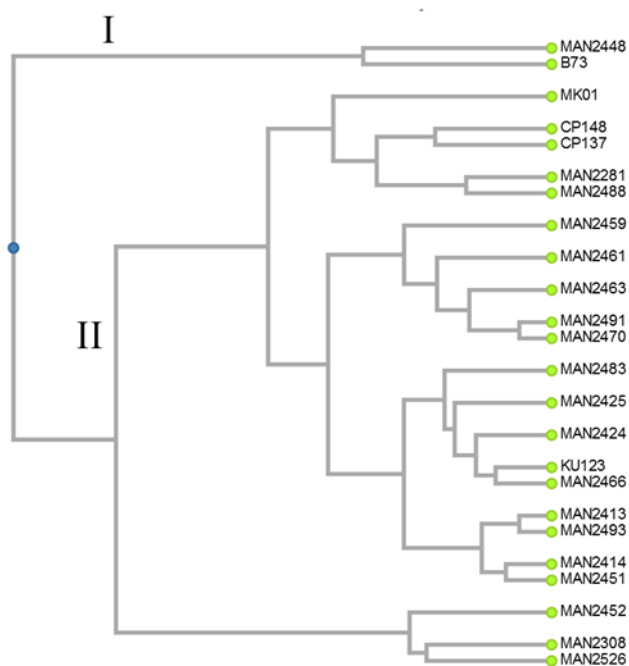
subdezvoltate de infecții fungice, iar acoperirea parțială face știuletele susceptibil la ciuperci. Cu toate acestea, acoperirea prea densă și groasă împiedică uscarea naturală a știuleților în timpul maturării, iar excesul de umiditate creează un mediu favorabil pentru dezvoltarea fungică. În acest sens, parametrul menționat este strâns legat de raportul dintre lungimea știuletelui și a pănușilor – atunci când pănușii sunt mai lungi decât știuleții, acest fapt facilitează o retenție mai mare a umidității sub frunzele de acoperire, ceea ce induce propagarea activă a fungilor. Pe de altă parte, pănușii mai scurte fac urechile lipsite de apărare împotriva fitopatogenilor. În general, raportul optim este de 1:1, când pănușile și știuleții sunt de lungimi egale.

Parenchimul alimentează boabele după terminarea vegetației. Cu cât diametrul coceanului este mai mic, cu atât boabele de porumb și știuletele își pierd mai repede umiditatea. Un știulete mai subțire eliberează apă mai repede în comparație cu unul mai gros, prin urmare, cu cât sunt mai mici valorile parametrului corespunzător, cu atât este mai mic riscul de reținere a umidității de către știulete și de apariție a putregaiului cauzat de ciuperci. Cultivat în condiții uscate ale regiunilor sudice, genotipurile de porumb pot fi selectate cu un știulete mai gros, deoarece temperatura aerului din sud este ridicată, iar uscarea boabelor după recoltare nu duce la costuri suplimentare serioase. În mod corespunzător, știuleții cu o densitate înaltă a boabelor au un randament potențial mai mare, dar rândurile strânse de boabe împiedică eliberarea umidității. Prin urmare, prea multe rânduri de boabe pe un știulete nu sunt de dorit în ceea ce privește randamentul de eliberare de apă.

Genotipurile de porumb studiate s-au caracterizat printr-o perioadă medie de 53 de zile de înflorire-maturare, acoperire intermediară a știuletelui cu un raport de aproximativ 1:1 între lungimea știuletelui și pănușilor, diametrul mediu al știuletelui de 37,5 mm și o medie de 13,9 rânduri de sâmburi per știulete. Porumbul B73, selectat ca genotip de referință pentru susceptibilitatea la agenții patogeni fungici, a manifestat cea mai lungă perioadă de înflorire-maturare – 69 de zile. Acest genotip a avut valori intermediare ale grosimii știuleților și acoperire satisfăcătoare cu pănuși, în timp ce lungimea pănușilor și a știuleților au fost egale. Linia consangvinizată MAN2448 a manifestat, de asemenea, o perioadă relativ lungă între sfârșitul înfloririi știuletelui și maturarea boabelor și a manifestat o acoperire mai bună a inflorescenței cu pănuși în comparație cu linia-martor și a avut un știulete mai subțire. Cu toate acestea, pănușile erau mai lungi decât urechea. Alte linii au fost caracterizate printr-un interval mai scurt al perioadei de înflorire-maturare. Cei mai groși știuleți au fost observate pentru liniile MAN2452, MAN2308 și MAN526. Pentru alte genotipuri, acest parametru a fost  $\leq 40$  mm. Cei mai subțiri știuleți au fost înregistrate pentru genotipurile MAN2470 și MAN2463. Pănuși scurte au fost observate pentru

porumbul MAN2466, MAN2461 și MAN2451. Un alt genotip cu pănuși mai lungi în comparație cu știulete a fost linia MAN2448.

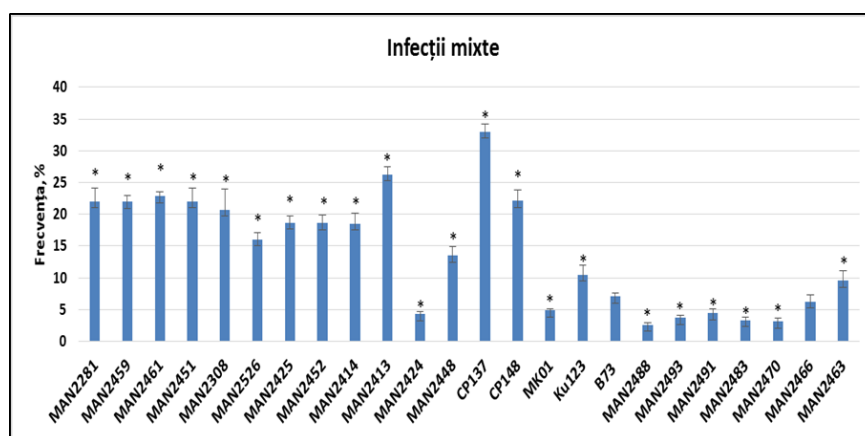
Gruparea ierarhică folosind metoda UPGMA bazată pe coeficientul de distanță euclidian (cel mai mare coeficient cofenetic – 0,87) a fost realizată pentru a grupa genotipurile de porumb studiate (Fig.4.14). S-au format două grupuri, genotipurile B73 și MAN2448 au fost grupate după criteriile celei mai lungi perioade de înflorire-maturare, diametru similar a știuleților și acoperire cu pănuși mai bună în comparație cu alte genotipuri. Al doilea grup cuprindea genotipuri cu valori mai puțin adecvate ale descriptorilor principali. Ku123, MAN2424, MAN2425, MAN2483, MAN2466 au fost identificate printr-o perioadă medie de 52 de zile de înflorire-maturare și acoperire intermediară a știuleților. Un alt grup de interes a cuprins genotipurile cu o perioadă mai scurtă de tranziție de la înflorire la maturarea bobului (media de 46 de zile), un cocean mai subțire și o acoperire intermediară a știuletelui cu pănuși. Un grup caracterizat printr-un știulete mai gros cu acoperire intermediară și cu o perioadă medie de înflorire-maturare de 55 de zile a cuprins trei genotipuri – MAN2526, MAN2308, MAN2452.



**Fig. 4.14. Dendrograma UPGMA a repartizării genotipurilor de porumb în baza indicilor morfofiziologici**

Analiza moleculară a demonstrat, că în boabe de porumb mauture au fost prezente speciile din de fungi patogeni majori și fungi de depozitare din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*, asociate cu bolile fungice și deteriorarea boabelor. Nu toate speciile de ciuperci

identificate în sol și plante de pe câmpurile experimentale au fost identificate în mostrele celor 24 genotipuri luate în studiu. Speciile *F. culmorum*, *A. clavatus*, *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum* și *P. verrucosum* au fost absente în mostrele genotipurilor analizate. Genotipurile au manifestat valorile diferite ale frecvenței boabelor infectate cu fungi, și după acest parametru ele au fost evidențiate trei grupuri [233]: grupul I cu rata infectării <10% (rezistenți), grupul II – 10-25% (toleranți), grupul III – rata infectării mai mare de 25% (susceptibili). Se observă, că genotipul standard s-a clasificat ca rezitent, în timp ce majoritatea liniilor consangnizate au manifestat toleranță la patogenii fungici. Doar două genotipuri CP137 și MAN2413 [234,235] au fost clasificate ca susceptibile (Fig.4.15).



**Fig.4.15. Frecvența boabelor de porumb infectate cu patogeni fungici. Asteriscul indică diferența semnificativă de valorile respective ale genotipului-standard la  $p < .05$**

Evaluarea semicantitativă a acumulării fungilor în boabe a fost efectuată în baza valorilor Cq, iar genotipurile a fost repartizate în grupuri după gradul de susceptibilitate, cum urmează:  $Cq \leq 29$  – susceptibilitate ridicată,  $29 < Cq < 37$  – susceptibilitate medie,  $Cq \geq 37$  – susceptibilitate scăzută (Tab.4.4). În cantități foarte mici au fost identificate *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, *A. ochraceus* și *P. brevicompactum*. Rata infectării a plantei-gazdă cu ceilalți patogeni a fost genotip-dependentă. În boabele genotipului-standard nu au fost identificate cantități semnificative de *F. graminearum* la fel ca și în CP148, MAN2424, MAN2452, MAN2425 și MAN2526. Deși alte genotipuri au manifestat rata infectării cu patogenul dat statistic mai ridicate comparativ cu standardul, însă concentrațiile de ADN în boabe au fost joase sau medii, astfel, nu se poate concluziona despre susceptibilitatea acestor genotipuri reieșind doar din datele prezentate. Boabele genotipului-standard de asemenea au manifestat concentrații înalte de un agent cauzal ai fuzariozei știuleților FER – *F. verticillioides*. Slab susceptibile la patogenul dat s-au constatat genotipurile MK01, Ku123, CP137 și MAN2526. Cantități foarte mici de ADN a fungului dat au fost înregistrate în boabele genotipului CP148. O cantitate mare de ADN patogen a fost găsită în

probele din liniile consangvinizate MAN2281, MAN2459, MAN2461, MAN2308, MAN2425, MAN2414 și MAN2413. Gradul de susceptibilitate a genotipurilor studiate la *F. proliferatum*, un alt agent cauzator al putregaiului FER, a fost mai scăzut în comparație cu speciile numite anterior. Majoritatea probelor au conținut niveluri moderate sau scăzute ale acestui agent patogen. Concentrații mari de ADN au fost găsite doar în mostrele de boabe MAN2459, acest genotip a arătat, de asemenea, o susceptibilitate ridicată la infecția cu *F. verticillioides*. Dimpotrivă, alte genotipuri în care au fost găsite concentrații mari de *F. verticillioides* (MAN2481, MAN2461, MAN2308, MAN2425, MAN2414 și MAN2413) au fost mai puțin sensibile la ciuperca *F. proliferatum*. Liniile consangvinizate s-au dovedit a fi practic imune la infecția cu *F. equiseti* și s-au găsit concentrații foarte scăzute de ADN fungic în boabele CP137, CP148, MK01, KU123 și linia standard B73. ADN-ul ciupercii *F. incarnatum* a fost găsit în cantități semnificative în boabele unui singur genotip, soiul CP148. Un alt agent patogen, *F. sporotrichioides*, a fost găsit doar în boabele CP137 și KU123, dar în cantități mici, această ciupercă nu a fost găsită în mostrele de boabe ale altor genotipuri și standardului. Două specii importante de ciuperci din genul *Aspergillus*, asociate cu alterarea cerealelor și contaminarea cu aflatoxine, au fost găsite în principal în concentrații medii. Genotipurile MAN2459, MAN2461 și CP137 au fost cele mai sensibile la ciuperca *A. flavus*. Boabele liniei consangvinizate MAN2281 s-au dovedit a fi sensibile la ambele specii de ciuperci. De asemenea, cele mai mari concentrații de ADN *A. ochraceus* au fost găsite în boabele soiului CP137, în timp ce genotipul standard s-a dovedit a fi slab susceptibil la infecția cu ciuperci din genul *Aspergillus*. În comparație cu ciupercile *Fusarium* și *Aspergillus*, agenții patogeni din genul *Penicillium* au fost prezenți în boabele genotipurilor studiate în cantități mult mai mici. Genotipul MAN2413 a fost cel mai sensibil la ciupercile *P. citrinum* și *P. expansum*. Cea mai mare cantitate de *P. expansum* a fost găsită în boabele MAN2281 și MAN2452. Astfel, genotipurile de porumb studiate s-au dovedit a fi cele mai susceptibile la infecția cu *F. verticillioides*, care a fost găsit în concentrații mari în șapte linii. Linia MAN2281 s-a dovedit a fi cea mai sensibilă la infecția cu ciuperci patogene - patru tipuri de microorganisme asociate cu infecții sistemice, alterarea boabele în timpul depozitării și contaminarea cu micotoxine au fost găsite în concentrații mari în probele acestui genotip. Linia MAN2459 a prezentat, de asemenea, o sensibilitate ridicată, în probele de boabe din care s-au găsit doi agenți patogeni principali fuzarierei și tiuleților și principalul producător de aflatoxine. Linia standard s-a dovedit a fi slab sensibilă la agenții patogeni studiați în condițiile Republicii Moldova.

Rata de infecție și spectrul patogenilor toxigenici au fost diferite în genotipurile de porumb analizate. În boabele analizate au fost identificate concomitent circa 5 diferite secvențe fungice

asociate cu sinteza diferitelor micotoxine. Cea mai mare diversitate de secvențe ale clusterilor toxigenice a fost identificată în soiurile CP137, CP148 și șase linii consangvinizate MAN2451, MAN2526, MAN2425, MAN2452, MAN2414 și MAN2413 (șase secvențe). Însă valorile medii Cq au variat între 35-40, ceea ce corespunde concentrațiilor scăzute a ADN-lui de interes în probele analizate. Cele mai puțin infectate au fost liniile MK01, Ku123 și linia-standard – în boabele acestor genotipuri au identificate câte trei secvențe asociate cu sinteza micotoxinelor cu valorile medii Cq 42-43. Adică, ADN-ul de interes practic a lipsit în probele analizate.

Boabele de MAN2459, MAN2452 și MAN2414 au fost cele mai infectate cu specii toxigenice de *Fusarium* capabile să producă fumonisine. Boabele CP148, Ku123, B73 și MK01 au fost cel mai puțin predispuse la infecție cu specii producătoare de fumonisine, în timp ce MAN2481 și MAN2459 au prezentat cea mai mare cantitate de secvență *FUM1* specifică pentru *F. proliferatum*. În boabele MAN2459 au fost identificate concomitent cele mai mari cantități de secvențe ale genei *FUM6* specifice pentru *F. verticillioides* și *F. proliferatum* toxigenice și secvența *FUM1* specifică pentru mai multe specii de *Fusarium* producătoare de fumonisine. În mostre de acest genotip nu au fost identificate tulpini de *F. equiseti* toxigene capabile să producă zearalenonă. Secvența genei *PKS13* a manifestat cele mai mari valori Cq în boabele MAN2413, MAN2451 și MAN2414. Cea mai mică cantitate de această secvență a fost identificată în boabele de porumb de Ku123 și B73.

În boabele liniei B73 secvențele clusterului de gene *afl* au fost absente, în timp ce în boabele Ku123 și MK01 a fost identificată doar secvența *aflQ* specifică pentru *A. flavus*. MAN2281 și CP137 au fost cele mai susceptibile la infestarea toxigenă cu *Aspergillus* - cele mai mari valori Cq de gene *aflP*, *aflQ* și *aflR* au fost calculate pentru boabe de aceste linii. CP137 și MAN2281 au fost mai predispuse la infecții cauzate de *Aspergillus* care produce aflatoxină în comparație cu speciile *Fusarium* producătoare de fumonisine. Cantitatea totală de secvențe de gene ale clusterului biosintetic de tricotecene a fost semnificativ mai mică în comparație cu secvențele genomului fungic asociate cu producția de fumonisine și aflatoxine. Cele mai mari valori medii ale secvențelor *TRI* au fost calculate în MAN2461, MAN2414, CP137 și MK01. Cea mai abundentă a fost secvența genei *TRI8*, în timp ce secvența *TRII1* specifică pentru *F. sporotrichioides* toxigenic a fost identificată doar în MAN2414. În MAN2452, MAN2526, MAN2425, MAN2424, Ku123 și CP148 nu au fost identificate secvențe asociate cu producția de T-2 și DON.

**Tabelul 4.4. Cantitățile relative ale fungilor în boabe de porumb, stabilite în baza valorilor Cq\* (anii 2021-2022)**

Fungi Genotip	Fungi patogeni majori										Fungi patogeni minori și fungi de depozitare									
	FG	FV	FP	FE	FIN	FS	AF	AP	AO	AC	PCh	PCt	PG	PV	PB	PE				
MAN2281	37.31	28.88	35.66	45.00	45.00	45.00	28.81	26.34	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	28.92				
MAN2459	39.56	26.38	28.21	45.00	45.00	45.00	28.35	31.86	45.00	45.00	45.00	39.15	45.00	45.00	45.00	36.02				
MAN2461	35.58	27.51	31.34	45.00	45.00	45.00	29.88	30.34	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	31.39				
MAN2451	37.46	33.75	31.36	45.00	45.00	45.00	30.90	32.62	45.00	45.00	45.00	36.45	45.00	45.00	45.00	31.07				
MAN2308	37.44	28.02	32.86	37.84	45.00	45.00	31.94	34.15	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	30.21				
MAN2526	45.00	45.00	32.35	45.00	45.00	45.00	30.65	31.19	45.00	45.00	45.00	34.66	45.00	45.00	45.00	32.01				
MAN2425	45.00	27.63	40.90	45.00	45.00	45.00	32.87	32.83	45.00	45.00	45.00	34.81	45.00	45.00	45.00	31.11				
MAN2452	45.00	30.42	33.17	45.00	45.00	45.00	32.16	33.14	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	28.68				
MAN2414	34.05	25.47	36.41	37.44	45.00	45.00	38.95	35.15	45.00	45.00	45.00	34.63	45.00	45.00	45.00	45.00				
MAN2413	37.75	28.01	30.99	45.00	45.00	45.00	30.24	32.83	45.00	45.00	45.00	29.46	45.00	45.00	45.00	29.85				
MAN2424	45.00	33.71	39.39	45.00	45.00	45.00	40.78	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00				
MAN2448	37.91	35.06	31.19	45.00	45.00	45.00	32.14	34.70	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00				
CPI37	36.87	45.00	31.55	36.09	45.00	36.73	31.28	23.95	23.61	45.00	45.00	34.51	45.00	45.00	35.24	35.01				
CP148	45.00	40.02	45.00	35.01	29.95	45.00	34.38	33.09	31.59	45.00	45.00	37.56	45.00	45.00	35.65	36.31				
MK01	34.36	45.00	45.00	36.26	45.00	45.00	42.69	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00				
Ku123	45.00	45.00	38.37	36.15	45.00	36.84	41.62	45.00	35.55	45.00	45.00	31.68	45.00	45.00	45.00	45.00				
B73	45.00	45.00	37.98	36.15	45.00	45.00	45.00	45.00	44.79	45.00	45.00	30.54	45.00	45.00	45.00	45.00				
MAN2488	45.00	45.00	34.14	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00				
MAN2493	45.00	45.00	45.00	45.00	38.62	45.00	45.00	45.00	35.03	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00				
MAN2491	45.00	32.83	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	38.48	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00				

MAN2483	38.31	34.16	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
MAN2470	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	33.37	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
MAN2466	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
MAN2463	38.19	28.57	45.00	39.76	45.00	45.00	39.73	45.00	32.49	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	39.30

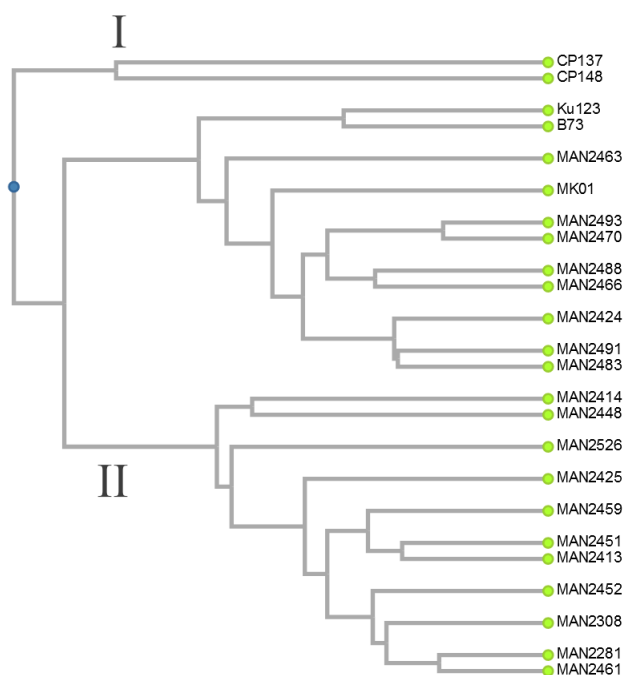
FG – *F. graminearum*; FV – *F. verticillioideus*; FP – *F. proliferatum*; FE – *F. equiseti*; FIN – *F. incarnatum*; FS – *F. sporotrichioides*; AF – *A. flavus*; AP – *A. parasiticus*; AO – *A. ochraceus*; AC – *A. clavatus*; PCh – *P. chrysogenum*; PCt – *P. citrinum*; PG – *P. griseofulvum*; PV – *P. verrucosum*; PB – *P. brevicompactum*; PE – *P. expansum*.

Valorile  $Cq \leq 29$  indică cantitate relativă înaltă de ADN fungic;  $30 < Cq < 37$  – cantitate relativă medie;  $Cq \geq 37$  – cantitate relativă joasă sau absența patogenului

\* pentru speciile de fungi identificați cu mai multe perechi de primeri sunt date valorile medii  $Cq$



Gruparea genotipurilor după valorile Cq pentru unii patogeni fungici în baza coeficientului distanței euclidiene (coeficientul cofenetic – 0.89) prin metoda UPGMA a evidențiat două clustere distincte (Fig.4.16).



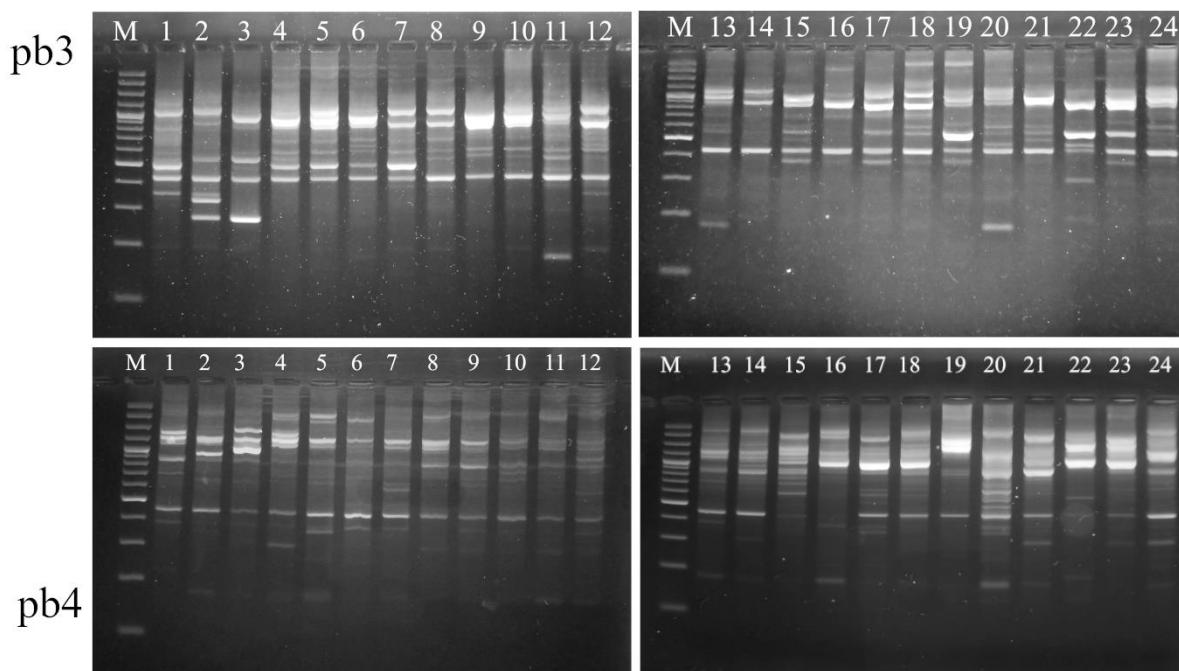
**Fig. 4.16. Clusterizarea UPGMA a genotipurilor de porumb în baza acumulării ADN-lui fungic în boabe**

Clusterul I cuprinde doar două genotipuri: CP137 și CP148. Ele s-au manifestat prin concentrații relative medii ale fungilor asociate cu deteriorarea boabelor pe parcursul depozitării și agenților cauzali majori ai fuzariozelor și concentrațiile înalte pentru *F. incarnatum* (CP148) și *A. parasiticus* și *A. ochraceus* (CP137). Aceste linii s-au caracterizat și prin parametrii morfofiziologici similari. Clusterul II cuprinde două subcluster mari, linia-standard s-a grupat împreună cu Ku123, care au manifestat nivelurile similare de acumulare a *F. equiseti* și *P. citrinum*. Alte genotipuri din acest subcluster s-au manifest prin componența eterogenă a spectrului fungic, însă cu rate joase de acumulare a principalelor patogeni. Din al doilea subgrup au făcut liniile consangvinizate cu arte medii și înalte a acumulării agenților cauzali majori ai fuzariozelor și speciilor producătoare de aflatoxine.

Prin urmare, toate probele de boabe depozitate în Banca de Gene din Moldova au fost infestate cu diferite ciuperci toxigenice capabile să producă în anumite condiții micotoxine periculoase. Speciile producătoare de fumonisină și aflatoxină din genurile *Fusarium* și *Aspergillus* au fost predominante în probele de boabe de porumb. A fost observat impactul genotipului de porumb asupra cantităților de secvențe FUM și afl din boabele de porumb.

### 4.3. Evaluarea impactului caracterelor morfologice și moleculare asupra rata infectării a genotipurilor de porumb cu patogeni fungici

Din 17 primeri utilizați pentru analiza variației genetice ale genotipurilor de porumb reacții pozitive de amplificare au fost înregistrate doar cu șase secvențe oligonucleotidice. Pentru analiză au fost luate în considerare doar benzile clar vizibile (Fig. 4.17).



**Fig. 4.17. Exemplu de profiluri genetice generați în urma amplificării ADN-lui de porumb cu primerul pb3 și pb4:**

1 – CP137, 2 – CP148, 3 – B73, 4 – Ku123, 5 – MK01, 6 – MAN2526, 7 – MAN2448, 8 – MAN2459, 9 – MAN2413, 10 – MAN2466, 11 – MAN2451, 12 – MAN2463, 13 – MAN2452, 14 – MAN2461, 15 – MAN2488, 16 – MAN2308, 17 – MAN2491, 18 – MAN2281, 19 – MAN2424, 20 – MAN2425, 21 – MAN2483, 22 – MAN2493, 23 – MAN2414, 24 – MAN2470, M – marker molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific

Benzile specifice, generați de primerii în baza elementelor mobile, prezintă interes ca sursă de informație genomică pentru elaborarea sistemelor de markeri de caractere de interes ale porumbului (Tab.4.5). Primerii au generat paterne distincte și reproductibile (2-3 repetiții) cu valoarea medie PIC de 0.45 – aproape maximă pentru markerii dominanți (Tab. 4.6). Rata medie de polimorfism de asemenea a fost înaltă și valoarea respectivă a constituit 92,67%. Șase primeri în total au generat 122 de benzi, dintre care 80 au fost polimorfice și 18 – unice. Numărul de benzi generate per genotip a variat între 3,83 și 7.73 cu rata medie de 5.93 per genotip. Valorile minime ale parametrului respectiv au fost înregistrate pentru linia MAN2424 (3,67 de ampliconi), iar cele

maxime – pentru linia MAN2526 (7 benzi distincte). Cea mai bună performanță a fost manifestată de către primerul D2 elaborat în baza secvenței Activator, pentru care s-au înregistrat cele mai înalte niveluri de număr de benzi polimorfe și unice – 32 și 6 benzi respectiv. Pentru primerul dat au fost calculate cele mai joase valori PIC comparativ cu secvențe din clasa iPBS, însă rata înaltă de polimorfism și abilitatea de a genera paterne unice a rezultat în valoare înaltă ale indicelui markerului – 8.21. De asemenea, performanță înaltă a fost manifestată de primerul pb5. Deși această secvență nu a generat ampliconi specifici, dar rata înaltă de polimorfism a permis obținerea paternelor de amplificare individuale, ceea ce a rezultat în eficacitatea înaltă a secvenței utilizate. Cea mai joasă performanță a fost manifestată de primerul pb6. Pentru secvența respectivă au fost calculate cele mai joase valori de polimorfism și indice ale markerului datorită unui număr limitat de benzi, dintre care una a fost monomorfă. Primerul pb20 a fost mai efectiv pentru depistarea diversității genetice comparativ cu pb6 cu valoarea PIC aproape maximă pentru markeri dominanți, însă numărul limitat de benzi nu a făcut posibil generarea mai multor paterne de amplificare specifice cum a fost observat în cazul D2. Ultimii doi primeri pb3 și pb4 au generat un număr egal de ampliconi și au manifestat valori înalte de polimorfism. Primerul pb4 a manifestat cea mai înaltă valoare ale indicelui markerului.

**Tabelul 4.5. Ampliconii specifici generați de unii primeri**

Primer	Genotip	Lungime, pb
Pb3	MAN2308	1330
	CP137	791
	CP148	323
	MAN2493	287
	MAN2451	165
Pb4	MAN2488	743
	MAN2425	538
	MAN2425	507
Pb20	CP137	1101
	MAN2493	432
	MAN2466	277
D2	MAN2424	1341
	MAN2491	423
	MAN2463	495
	MAN2425	334
	MAN2425	205
	MAN2483	265

**Tabelul 4.6. Valorile descriptorilor esențial pentru analiza eficacității primerilor, calculați în urma amplificării experimentale cu ADN de diferite genotipuri de porumb**

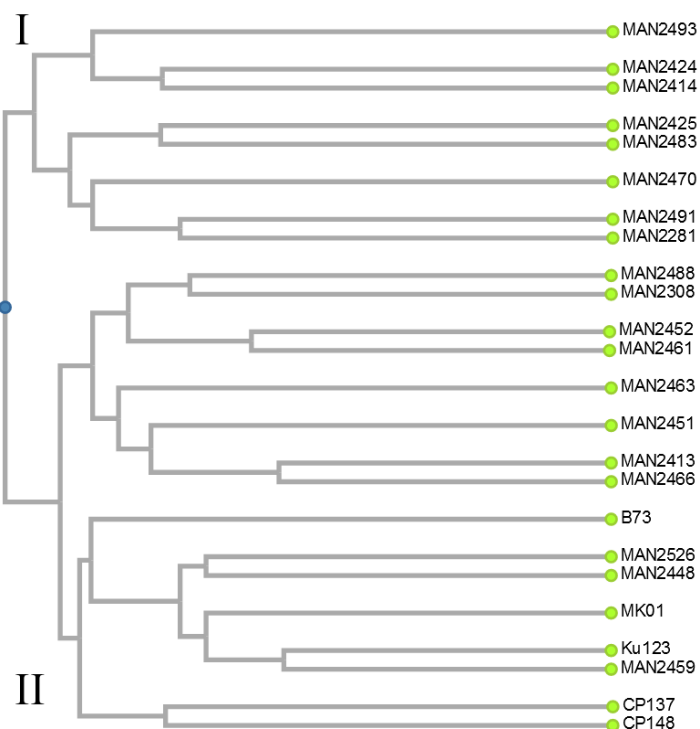
Primer Indice	Pb3	Pb4	Pb5	Pb6	Pb20	D2	Media
Lungimea, pb	3072- 165	2240- 175	1971- 178	1256- 287	2908- 277	3100- 205	2424- 214
N	22	22	17	10	19	32	20.33
NM	1	0	0	1	0	0	0.33
NP	21	22	17	9	19	32	20
NS	5	3	0	0	3	6	2.83
Z	6.04	6.75	6.41	3.83	7.73	4.8	5.93
PP, %	94.45	100	100	90	100	100	97.41
PIC	0.39	0.43	0.47	0.47	0.44	0.26	0.41
R	12.08	13.5	12.83	7.67	12.25	9.67	11.33
E	20.04	22	17	8.1	19	32	17.68
MI	7.98	9.36	7.98	3.83	8.31	8.21	7.61
D	0.32	0.4	0.45	0.36	0.37	0.26	0.36
n <sub>a</sub>	1.95	2	2	1.9	2	2	1.98
n <sub>e</sub>	1.29	1.37	1.48	1.32	1.36	1.18	1.33
h	0.19	0.25	0.29	0.22	0.23	0.14	0.22

*N – număr total de benzi; NM – benzi monomorfe; NP – benzi polimorfe; NS – benzi specifice; Z – număr mediu de benzi per genotip; PP – rata de polimorfism; PIC – conținutul informației polimorfe; R – puterea de rezolvare a primerului; D – puterea de discriminare a primerului; E – rata de multiplexare efectivă; MI – indicele markerului; n<sub>a</sub> – numărul de alele observate; n<sub>e</sub> - numărul de alele efective; h – diversitatea genetică Nei*

Astfel, cele mai multe secvențe specifice au fost detectate în genotipul MAN2425 (patru loci specifici). Pentru genotipurile de porumb studiate s-au constatat valori de alele observate  $n_a=1.98\pm 0.22$ , alele efective  $n_e=1.33\pm 0.28$ . Indicele variației genetice Nei a fost  $h=0.22\pm 0.14$ , iar pentru indicele informațional s-au constatat valori destul de joase de  $D=0.36\pm 0.19$ , ceea ce indică variabilitate ridicată și eficiența primerilor pentru analiza variației intergenotipice.

Ampliconii generați au fost utilizați pentru gruparea genotipurilor de porumb în baza coeficientului Jaccard (coeficientul cogenetic cel mai înalt – 0.76) prin metoda UPGMA (Fig.4.18). Cele mai mici distanțe genetice se observă dintre Ku123 și MAN2459. Dendrograma în baza variației genetice a grupat genotipurile în clusterul II ce conține soiurile CP137 și CP148, iar liniile consangvinizate au fost repartizate în clusterul I, care se împarte în mai multe subcluster eterogene. Aceste soiuri au generat profiluri genetice identice cu primerul pb6, iar ratele de similitudine ale paternelor generați de ceilalți primeri a variat între 72-90%. Genotipul-standard B73 a fost repartizat într-un subcluster împreună cu MK01, Ku123 și soiurile CP137 și CP148. Acești genotipuri au manifestat rate scăzute de acumulare a ADN-lui fungic în boabe. Printre

genotipurile consangvinizate s-a observat similitudine între profilurile genetice de MAN2414-MAN2424, MAN2461-MAN2459, MAN2281-MAN2451, MAN2448-Ku123, ce poate sugera un anumit grad de rudenie în baza progenitorului comun. Linia-martor B73 manifestă o anumită similitudine genetică cu liniile MAN2414 și MAN2424.



**Fig.4.18. Clusterizarea UPGMA a genotipurilor de porumb în baza polimorfismului genetic**

Anumiți ampliconi polimorfici generați cu primerii derivați din secvențele elementelor mobile au fost detectați cu frecvențe înalte (mai mult de 50%) în grupul de genotipuri rezistenți comparativ cu cei toleranți și susceptibili. În acest sens, ca sursă potențială de rezistență prezintă interes următoarele secvențe:

pb3 – 813 pb (56%), 596 pb (67%), 522 pb (67%), 487 pb (56%);

pb4 – 860 pb (63%), 445 pb (87%);

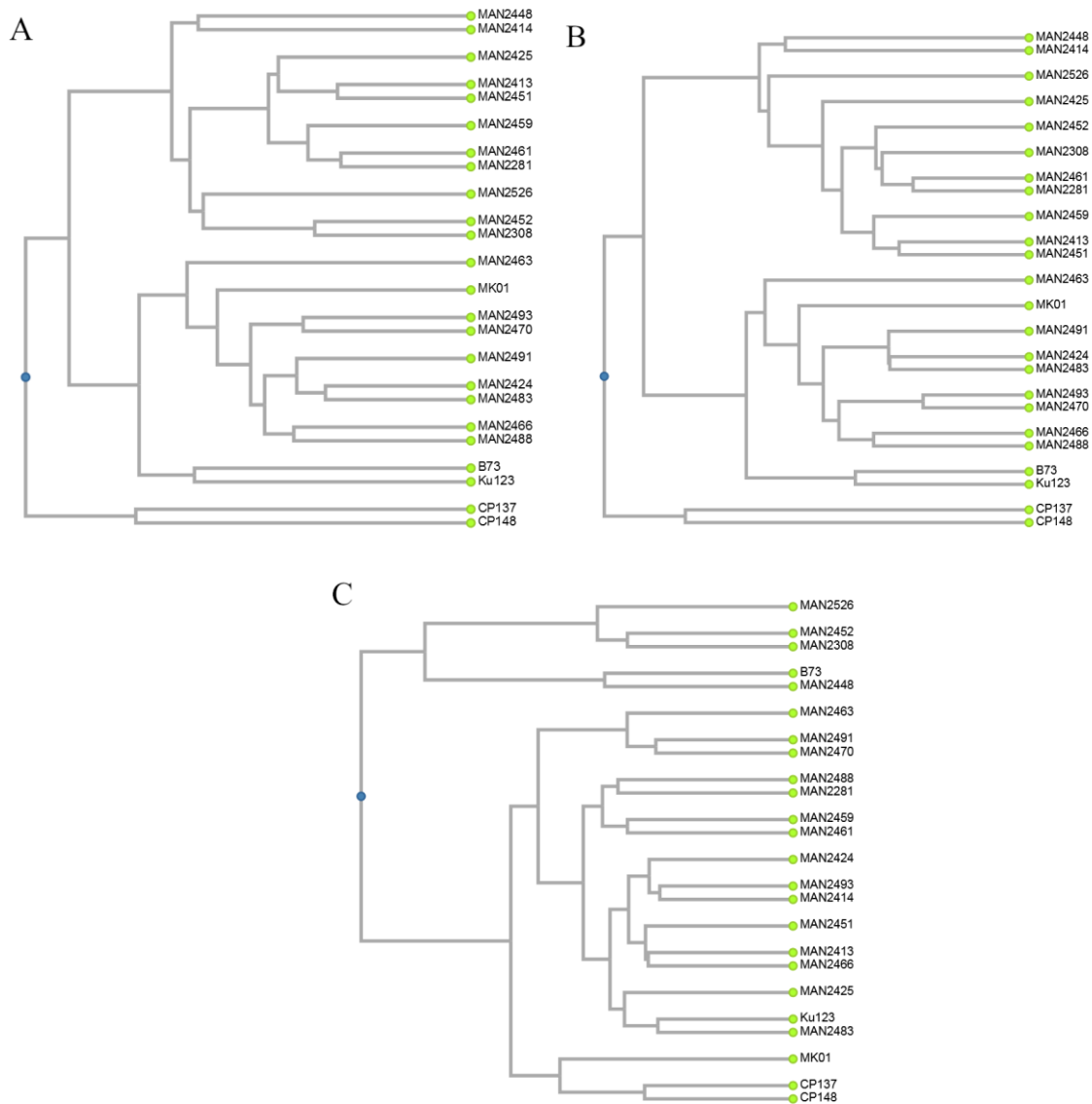
pb20 – 948 pb (87%), 768 pb (63%), 401 pb (63%);

pb5 – 980 pb (87%), 578 pb (75%), 402 pb (63%);

pb6 – 880 pb (63%), 382 pb (75%).

Valorile matricelor de distanță, calculate în baza coeficientului distanțelor euclidiene  $n$  au fost utilizate pentru clusterizarea UPGMA, prin care s-au evidențiat nivelul similitudinii între genotipuri și relația dintre variația genetică și caractere de interes (Fig.4.19). Gruparea

genotipurilor s-a efectuat după caractere de variație genetică, indici morfofiziologici asociați cu rezistență la infecții fungice, rate de infectare cu speciile de patogeni fungici din genurile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. La fel, s-a efectuat clusterizarea după multiple caractere: combinație dintre variație genetică și indici morfofiziologici, variație genetică și rata de infectare a boabelor de porumb cu patogeni fungici, variație genetică suprapusă cu indici morfofiziologici și rata de infectarea boabelor cu patogeni fungici. În fiecare caz s-au observat două clustere neuniforme și repartizarea genotipurilor în subclustere în dependență de parametru ales.



**Fig. 4.19. Dendrogramele asocierii genotipurilor de porumb în baza de genetică suprapusă cu indici morfofiziologici și rata de infectare a boabelor cu patogeni fungici (A), variație genetică și rata de infectare a boabelor de porumb cu patogeni fungici (B), combinație dintre variație genetică și indici morfofiziologici (C)**

Cele mai uniforme distanțe între genotipuri s-a observat pentru clusterizarea în baza caracterelor morfologice și polimorfismul genetic, în timp ce pentru alte criterii de grupare gradul de similitudine dintre plantele de porumb a fost mai eterogen. Se observă formarea subclusterilor similari în baza grupării după mai mulți parametri. Genotipurile CP137 și CP148 au fost repartizați într-un cluster după toate trei parametri de grupare. Genotipurile MAN2448 și MAN2414 de asemenea se grupează împreună după acest parametru, la fel ca și Ku123-B73. Gruparea după trei parametri enumerați și combinația polimorfism genetic-rata de acumulare a patogenilor în boabe se formează un subcluster practic identic, care include genotipurile MK01, MAN2463, MAN2488, MAN2466, MAN2483, MAN2424, MAN2491, MAN2470, MAN2493. Acest cluster nu s-a format în cazul grupării după parametrul variației genetice, indicilor morfofiziologici sau asocierii dintre caractere genetice și cele morfofiziologice. Se poate deduce că genotipul are un impact semnificativ asupra ratei de infectare cu patogenii fungici la porumbul analizat .

Astfel, analiza moleculară a evidențiat un impact neuniform al factorilor abiotici și al genotipului gazdei asupra dinamicii fungice în plantele de porumb și sol. Spectrele calitative și cantitative ale ciupercilor din sol și plantele de porumb au fost diferite, *F. culmorum* a fost absent în frunzele de porumb și boabe, în timp ce aceeași specie a fost găsită în sol. Germoplasma de porumb stocată în Banca de gene a fost infestată cu agenți cauzali majori ai micozelor de porumb și a deteriorării boabelor pe parcursul depozitării, dintre care cea mai mare parte sunt capabile să producă clasele principale de micotoxine. Pentru zearalenonă, aflatoxine și fumonisine s-a stabilit corelație pozitivă dintre valorile Cq ale genelor implicate în sinteza micotoxinelor respective și concentrația actuală ale acestora în boabe de porumb. Astfel, valorile Cq pot fi utilizate ca parametru discriminativ pentru evaluarea riscului sanitar asociat cu acumularea micotoxinelor în material semincer și boabelor destinate consumului uman. Markerii moleculari în baza elementelor mobile ale genomului plantelor au fost efectivi pentru genotiparea plantelor de porumb, s-a stabilit relația dintre caracterele moleculare, acumularea fungilor patogene în boabe de porumb și caracterele morfofiziologice asociate cu cedarea apei. După acest criteriu, cele mai perspective genotipuri pentru utilizarea în programele de ameliorare a rezistenței la boli fungice sunt considerate genotipurile Ku123, B73, MK01, MAN2470 și MAN2424.

## Concluzii și recomandări

În cadrul studiului condus s-au făcut următoarele concluzii generale:

1. Protocolul de analiză în baza metodelor moleculare a fost efectiv pentru monitoringul agenților cauzali ai bolilor fungice la porumb în sol și material vegetal. Primerii elaborați de novo în baza secvențelor din genomul fungilor au permis identificarea precisă a microorganismelor care induc bolile la porumb pe parcursul vegetației și deteriorarea producției în timpul depozitării. Folosind setul de primeri menționat, au fost identificate următoarele specii: *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. clavatus*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *P. verrucosum*, *P. brevicompactum*. Majoritatea primerilor elaborați au fost folosiți cu succes atât pentru analiza PCR convențională, cât și real-time PCR. Cu ajutorul primerilor elaborați în baza secvențelor din genomul fungilor asociate cu sinteza principalelor clase de micotoxine s-au discriminat microorganismele capabile să producă aflatoxine, fumonisine, DON, ZEN, toxina T-2. Procedeele de analiză în baza metodei PCR convențională cu aplicarea distribuției Poisson și diluărilor consecvente au permis efectuarea cuantificării fungilor și evidențierea gradului de susceptibilitate a plantelor de porumb la infecțiile fungice. Astfel, aceste procedee pot fi folosite ca o alternativă a metodei real-time PCR.
2. Din 24 de genotipuri de porumb analizate, 12 au manifestat rezistență la *F. graminearum*: – MAN2526, MAN2425, MAN2452, MAN2424, CP148, Ku123, B73, MAN2488, MAN2493, MAN2491, MAN2470, MAN2466. La infecția de *F. verticillioides* au manifestat rezistență genotipurile MAN2526, CP137, CP148, MK01, Ku123, B73, MAN2488, MAN2493, MAN2470. La infecțiile mixte cauzate de mai mulți agenți cauzali majori și minori ai fuzariozelor s-au manifestat ca rezistente următoarele genotipuri: MAN2526, B73, MAN2488, MAN2493, MAN2470. Unsprezece genotipuri de porumb au manifestat rezistență la *Aspergillus spp.*: MAN2424, MK01, Ku123, B73, MAN2488, MAN2493, MAN2491, MAN2483, MAN2470, MAN2466, MAN2463. Mai mult de o jumătate din genotipurile analizate au manifestat niveluri scăzute de infectare cu *Penicillium spp.*: MAN2414, MAN2424, MAN2448, MK01, Ku123, B73, MAN2488, MAN2493, MAN2491, MAN2483, MAN2470, MAN2466, MAN2463. Zece



genotipuri s-au manifestat ca rezistente la infecțiile mixte de *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*: MAN2424, MK01, B73, MAN2488, MAN2493, MAN2491, MAN2483, MAN2470, MAN2466, MAN2463.

3. Analiza moleculară a relevat starea fitosanitară nesatisfăcătoare a câmpurilor de porumb experimentale și a germoplasmei stocate în Banca de gene a IGFP. Principalii agenți cauzali ai fusariozelor, aspergilozelor și penicilozelor la porumb, precum și contaminanți fungici majori cu aflatoxine, fumonisine și tricotecene au fost identificați în sol, frunze de plante și boabe depozitate. Prin urmare, solul și materialul semincer în sine reprezintă sursa de infecție ulterioară a plantelor de porumb în timpul vegetației. A existat un impact neuniform al factorilor abiotici asupra propagării fungice. În mare parte, speciile de *Aspergillus* și *Penicillium* asociate cu deteriorarea boabelor și unii agenți cauzali minori ai fuzariozelor în plante de porumb au fost mai semnificative afectate de fluctuațiile factorilor mediului extern. Pentru ciuperci care fac parte din microbiota solului nu a fost stabilită o corelație specifică între sensibilitatea lor la temperatura aerului și fluctuațiile umidității și particularitățile sale ecologice.
4. Pentru unele clase de micotoxine s-a stabilit o corelație pozitivă între valorile Cq ale genelor fungice asociate cu biosinteza micotoxinelor și concentrația reală a metabolitului toxic la probele de boabe. Prin urmare, valoarea Cq poate fi utilizată pentru monitorizarea dinamicii potențiale a micotoxinelor în probele de porumb. Deși valorile Cq critice care corespund unei anumite concentrații de micotoxine în probele de boabe nu au fost identificate din cauza numărului de eșantion insuficient, în mare parte valorile Cq circa 33,8 au indicat deja prezența micotoxinei în probă.

Se recomandă:

1. Utilizarea protocolului PCR și primerilor testați pentru monitoringul fitopatogenilor în laboratoarele speciale care activează în domeniile controlului fitosanitar, fitopatologiei și micologiei. Procedeele de diagnostic molecular expuse în teză au fost folosite pentru rezolvarea unor probleme aplicative: evaluarea stării fitosanitare a livezilor de mere din Republica Moldova și a eficacității mai multor condiții de depozitare a fructelor cu scopul reducerii deteriorării acestora cauzate de microorganisme (proiect bilateral STCU-AȘM # 6225; analiza complexă a acumulării micotoxinelor în produse alimentare pe parcursul depozitării (proiect moldo-belarus 19.80013.51.07.10A/BL); identificarea genotipurilor de tomate

rezistente la fitoplasmă (proiect bilateral STCU-AȘM #6378); optimizarea procedeelelor de reducere a contaminării vinului cu microorganisme și metabolii acestora (proiect moldo-turc 23.80013.5107.4TR).

2. Utilizarea procedeelelor de diagnostic molecular expuse în teză pentru pregătirea practică a studenților în cadrul disciplinelor de genetică, biologie moleculară, biotehnologii moderne. Rezultatele investigațiilor științifice realizate în cadrul tezei au fost implementate în cadrul lucrărilor practice la disciplina ”Tehnici de cercetare în biologia moleculară”, ciclul II la Departamentul Biologie și Ecologie, Facultatea Biologie și Geoștiințe a USM (act de implementare nr. 507i din 08.06.2023).
3. Utilizarea genotipurilor MK01, Ku123, MAN2424, MAN2470, B73 în programele de ameliorarea a rezistenței porumbului la boli fungice.

Cercetările actuale se recomandă să avanseze în următoarele direcții:

1. Efectuarea analizei nucleotidice și comparative a ampliconilor specifici pentru genotipurile de porumb cu cea mai scăzută susceptibilitate la infecții fungice pentru screeningul secvențelor genomului asociate cu trăsături de rezistență specifică a porumbului la micoze;
2. Efectuarea analizei nucleotidelor a secvențelor fungice identificate ale genelor de menaj și a grupurilor de gene asociate cu sinteza de micotoxine pentru crearea unei biblioteci de gene a tulpinilor fungice locale din agrocezoze;
3. Efectuarea analizei moleculare a întregii colecții de plante stocate în Banca de gene a IGFPF pentru evaluarea stării fitosanitare a germoplasmei și dezvoltarea celor mai proeminente genotipuri pentru ameliorarea rezistenței la boli infecțioase;
4. Efectuarea genotipării germoplasmei stocate pentru a dezvoltarea secvențe de genom potențial asociate cu trăsăturile plantelor de interes pentru diferite programe de ameliorare.

## Bibliografie

1. Maize research [online]. *International Maize and Wheat Improvement Center* [citat 4.09.2023]. Disponibil: <https://www.cimmyt.org/work/maize-research/>
2. Stine MX corn [online]. *Stine Seed* [citat 4.09.2023]. Disponibil: <https://www.stinseed.com/corn/mx-corn/>
3. IITA research themes [online]. *International Institute of Tropical Agriculture* [citat 4.09.2023]. Disponibil: <https://www.iita.org/research/our-research-themes/>
4. *Institutul de Fitotehnie „Porumbeni”*, © 2022 [citat 4.09.2023]. Disponibil: <https://porumbeni.gov.md/>
5. Laboratorul Resurse Genetice Vegetale [online]. *Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor* [citat 4.09.2023]. Disponibil: <https://igfpp.md/lab-res-gen-veg>
6. JIAO, P. et al. Improvement of cold tolerance in maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation of *ZmSAMDC* gene. In: *GM Crops & Food*. 2022, vol. 13, nr.1, pp. 1–12. ISSN 2164-5701.
7. LILIANE, T.N. et al. Factors affecting yield of crops. In: *Agronomy - Climate Change and Food Security*. IntechOpen, 2020, pp.17. ISBN 978-1-83881-223-2.
8. BRYŁA, M. et al. Recent research on *Fusarium* mycotoxins in maize - a review. In: *Foods*. 2022, vol. 11, nr 21, pp. 1–32. ISSN 2304-8158.
9. BAROŠEVIĆ, T. et al. Assessment of maize hybrids resistance to *Aspergillus* ear rot and aflatoxin production in environmental conditions in Serbia. In: *Toxins*. 2022, vol. 14, nr. 12, pp. 1–19. ISSN 2072-6651.
10. GARDNER, C.M. et al. Evaluation of developing maize microbiomes and associations among nitrogen cyclers and key fungal taxa. In: *Microbiology*. 2022, vol. 168, nr. 3, pp. 1–12. ISSN 1465-2080.
11. ABDALLAH, M.F., Girgin, G., Baydar, T. Mycotoxin detection in maize, commercial feed, and raw dairy milk samples from Assiut city, Egypt. In: *Veterinary sciences*. 2019, vol. 6, nr. 2, pp. 1–9. ISSN 2306-7381
12. GASPERINI, A.M. et al. Fungal diversity and metabolomic profiles in GM and isogenic non-GM maize cultivars from Brazil. In: *Mycotoxin research*. 2021, vol. 37, nr. 1, pp. 39–48. ISSN 1867-1632.
13. NIKOLIĆ, M. et al. Toxigenic species *Aspergillus parasiticus* originating from maize kernels grown in Serbia. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr 12, pp. 1-13. ISSN 2072-6651.

14. PENAGOS-TABARES, F. et al. Fungal species and mycotoxins in mouldy spots of grass and maize silages in Austria. In: *Mycotoxin research*. 2022, vol. 38, nr. 2, pp. 117–136. ISSN 1867-1632.
15. SSERUMAGA, J.P. et al. Aflatoxin-producing fungi associated with pre-harvest maize contamination in Uganda. In: *International journal of food microbiology*. 2020, vol. 313, nr. 108376, pp. 1–8. ISSN 1879-3460.
16. VANDICKE, J. et al. Multi-mycotoxin contamination of maize silages in Flanders, Belgium: monitoring mycotoxin levels from seed to feed. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 3, pp. 1–22. ISSN 2072-6651.
17. VLAJKOV, V. et al. Distribution, genetic diversity and biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in Serbian maize fields. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 10, pp. 1–24. ISSN 2072-6651.
18. EKWOMADU, T.I., GOPANE, R.E., MWANZA, M. Occurrence of filamentous fungi in maize destined for human consumption in South Africa. In: *Food science & nutrition*. 2018, vol. 6, nr. 4, pp. 884–890. ISSN 2048-7177.
19. JEDIDI, I. et al. Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. In: *Saudi journal of biological sciences*. 2018, vol. 25, nr. 5, pp. 868–874. ISSN 1319-562X.
20. TORBATI, M., ARZANLOU, M., DA SILVA SANTOS, A.C. Fungicolous *Fusarium* species: ecology, diversity, isolation, and identification. In: *Current microbiology*. 2021, vol. 78, nr. 8, pp. 2850–2859. ISSN 1432-0991.
21. CROUS, P.W. et al. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. In: *Studies in microbiology*. 2021, vol. 98, pp. 1–184. ISSN 0166-0616.
22. O'DONNELL, K. et al. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: a work in progress. In: *Plant disease*. 2022, vol. 106, nr. 6, pp. 1597–1609. ISSN 1943-7692.
23. QIU, J. et al. *Fusarium fujikuroi* species complex associated with rice, maize, and soybean from Jiangsu province, China: phylogenetic, pathogenic, and toxigenic analysis. In: *Plant disease*. 2020, vol. 104, nr. 8, pp. 2193–2201. ISSN 1943-7692.
24. DEL PONTE, E.M. et al. *Fusarium graminearum* Species Complex: a bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes. In: *Phytopathology*. 2022, vol. 112, nr. 4, pp. 741–751. ISSN 0031-949X.
25. SCHMIDT, R. et al. Deciphering the genome and secondary metabolome of the plant

- pathogen *Fusarium culmorum*. In: *FEMS microbiology ecology*. 2018, vol. 94, nr. 6, pp. 1–12. ISSN 1574-6941.
26. NAG, P. et al. Defence response in plants and animals against a common fungal pathogen, *Fusarium oxysporum*. In: *Current research in microbial sciences*. 2022, vol. 3, pp. 1–9. ISSN 2666-5174.
27. DE MEDEIROS, C. A. et al. Evaluating the antifungal activity of  $\alpha$ -bisabolol in association with NaCl on *Fusarium oxysporum* in maize grains. In: *Current microbiology*. 2021, vol. 78, nr. 2, pp. 604–610. ISSN 1432-0991.
28. WANG, L. et al. The *Arabidopsis thaliana*–*Fusarium oxysporum* strain 5176 pathosystem: an overview. In: *Journal of experimental botany*. 2022, vol. 73, nr. 18, pp. 6052–6067. ISSN 1460-2431.
29. PORTAL GONZÁLEZ, N. et al. Phytotoxic metabolites produce by *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* race 2. In: *Frontiers in microbiology*. 2021, vol. 12, pp. 1–8. ISSN 1664-302X.
30. VÁSQUEZ-BONILLA, J.N. et al. Improvement of beauvericin production by *Fusarium oxysporum* AB2 under solid-state fermentation using an optimised liquid medium and co-cultures. In: *Mycotoxin research*. 2022, vol. 38, nr. 3, pp. 175–183. ISSN 1867-1632.
31. GHERBAWY, Y.A. et al. Phylogeny and pathogenicity of *Fusarium solani* species complex (FSSC) associated with potato tubers. In: *Journal of basic microbiology*. 2021, vol. 61, nr. 12, pp. 1133–1144. ISSN 1521-4028.
32. JAMES, J.E. et al. Morphology, phenotype, and molecular identification of clinical and environmental *Fusarium solani* Species Complex isolates from Malaysia. In: *Journal of fungi*. 2022, vol. 8, nr. 8, pp. 1–21. ISSN 2309-608X.
33. YANG, X. et al. Identification, pathogenicity, and genetic diversity of *Fusarium spp.* associated with maize sheath rot in Heilongjiang province, China. In: *International journal of molecular sciences*. 2022, vol. 23, nr. 18, pp. 1–15. ISSN 1422-0067.
34. STEPIEŃ, Ł. Plant-pathogenic *Fusarium* species. In: *Journal of fungi*. 2023, vol. 9, nr. 1, pp. 1–3. ISSN 2309-608X.
35. COBO-DÍAZ, J.F. et al. Influence of maize residues in shaping soil microbiota and *Fusarium spp.* communities. In: *Microbial ecology*. 2022, vol. 83, nr. 3, pp. 702–713. 1432-184X.
36. Fusarium ear rot of corn [online]. *Crop Protection Network*. Published: 13 March 2019 [citat 20.04.2023]. Disponibil: <https://cropprotectionnetwork.org/encyclopedia/fusarium->

ear-rot-of-corn.

37. DALLA LANA, F., MADDEN, L. V., PAUL, P.A. Natural occurrence of maize Gibberella ear rot and contamination of grain with mycotoxins in association with weather variables. In: *Plant disease*. 2021, vol. 105, nr. 1, pp. 114–126. ISSN 1943-7692.
38. REED, H. et al. Presence and correlation of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol accumulation in silage corn plant parts. In: *Plant disease*. 2022, vol. 106, nr. 1, pp. 87–92. ISSN 1943-7692.
39. YAO, L. et al. Combined genome-wide association study and transcriptome analysis reveal candidate genes for resistance to Fusarium ear rot in maize. In: *Journal of integrative plant biology*. 2020, vol. 62, nr. 10, pp. 1535–1551. ISSN 1744-7909.
40. WEN, J. et al. QTL mapping of Fusarium ear rot resistance in maize. In: *Plant disease*. 2021, vol. 105, nr. 3, pp. 558–565. ISSN 1943-7692.
41. PFORDT, A. et al. Impact of environmental conditions and agronomic practices on the prevalence of *Fusarium* species associated with ear- and stalk rot in maize. In: *Pathogens*. 2020, vol. 9, nr. 3, pp. 1–17. ISSN 2076-0817.
42. SHANG, G. et al. First report of *Fusarium miscanthi* causing ear rot on maize in China. In: *Plant disease*. 2020, vol. 105, nr. 5, pp. 1565. ISSN 1943-7692.
43. JIANG, B. et al. First report of corn ear rot caused by *Fusarium asiaticum* in China. In: *Plant disease*. 2022, advance online publication. ISSN 1943-7692.
44. PERINCHERRY, L., LALAK-KÁNCZUGOWSKA, J., STEPIÉN, L. *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. In: *Toxins*. 2019, vol. 11, nr. 11, pp. 1–22. ISSN 2072-6651.
45. NAGRAJ, D., ACHAR, P.N., SREENIVASA, M.Y. Current perspectives of biocontrol agents for management of *Fusarium verticillioides* and its fumonisin in cereals—a review. In: *Journal of fungi*. 2021, vol. 7, nr. 9, pp. 1–20. ISSN 2309-608X.
46. ATALLAH, O., YASSIN, S. *Aspergillus spp.* eliminate *Sclerotinia sclerotiorum* by imbalancing the ambient oxalic acid concentration and parasitizing its sclerotia. In: *Environmental microbiology*. 2020, vol. 22, nr. 12, pp. 5265–5279. ISSN 1462-2920.
47. RUSHING, B.R., SELIM, M.I. Aflatoxin B1: a review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. In: *Food and chemical toxicology*. 2019, vol. 124, pp. 81–100. ISSN 1873-6351.
48. ANTIGA, L. et al. *Aspergillus flavus* exploits maize kernels using an “orphan” secondary metabolite cluster. In: *International journal of molecular science*. 2020, vol. 21, nr. 21, pp.

- 1–17. ISSN 1422-0067.
49. An overview of ear rots [online]. *Crop Protection Network* [citat 20.04.2023]. Disponibil: <https://cropprotectionnetwork.org/publications/an-overview-of-ear-rots>.
50. FRISVAD, J.C. et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. In: *Studies in mycology*. 2019, vol. 93, pp. 1–63. ISSN 0166-0616.
51. DI CIACCIO, L.S. et al. *In vitro* antifungal activity of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. extracts against *Aspergillus flavus*. In: *Plants*. 2020, vol. 9, nr. 438, pp. 1–11. ISSN 2223-7747.
52. MOORE, G.G. Practical considerations will ensure the continued success of pre-harvest biocontrol using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains. In: *Critical reviews in food science and nutrition*. 2022, vol. 62, nr. 15, pp. 4208–4225. ISSN 1549-7852.
53. GIORNI, P., BERTUZZI, T., BATTILANI, P. Impact of fungi co-occurrence on mycotoxin contamination in maize during the growing season. In: *Frontiers in microbiology*. 2019, vol. 10, nr. 1265, pp. 1–10. ISSN 1664-302X.
54. THOMPSON, M.E., RAIZADA, M.N. Fungal pathogens of maize gaining free passage along the silk road. In: *Pathogens*. 2018, vol. 7, nr. 4, pp. 1–16. ISSN 2076-0817.
55. AMAIKE, S., KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. In: *Annual review of phytopathology*. 2011, vol. 49, pp. 107–133. ISSN 0066-4286.
56. SABER, H., CHEBLOUNE, Y., MOUSSAOUI, A. Molecular characterization of *Aspergillus flavus* strains isolated from animal feeds. In: *Polish journal of microbiology*. 2022, vol. 71, nr. 4, pp. 589–599. ISSN 2544-4646.
57. SHABEER, S. et al. Aflatoxin contamination, its impact and management strategies: an updated review. In: *Toxins*. 2022, vol. 14, nr. 5, pp. 1–24. ISSN 2072-6651.
58. BENITO, N. et al. Influence of a glyphosate-based herbicide on growth parameters and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi* on maize grains. In: *Revista Argentina de microbiologia*. 2021, vol. 53, nr. 2, pp. 162–170. ISSN 0325-7541.
59. JIANG, Y. et al. Aflatoxin in dairy cows: toxicity, occurrence in feedstuffs and milk and dietary mitigation strategies. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 4, pp. 1–23. ISSN 2072-6651.
60. PERRONE, G., SUSCA, A. *Penicillium* species and their associated mycotoxins. In: *Methods in molecular biology*. 2017, vol. 1542, pp. 107–119. ISSN 1940-6029.
61. MANSFIELD, M.A., JONES, A.D., KULDAU, G.A. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. In: *Phytopathology*. 2008, vol. 98, nr. 3, pp.

- 330–336. ISSN 0031-949X.
62. LIU, S. et al. *Talaromyces funiculosus*, a novel causal agent of maize ear rot and its sensitivity to fungicides. In: *Plant disease*. 2021, vol. 105, nr. 12, pp. 1–7. ISSN 0191-2917.
63. ŽEBELJAN, A. et al. Incidence, speciation, and morpho-genetic diversity of *Penicillium spp.* causing blue mold of stored pome fruits in Serbia. In: *Journal of fungi*. 2021, vol. 7, nr. 12, pp. 1–26. ISSN 2309-608X.
64. GARCIA-ACELA, E. et al. Interacting environmental stress factors affect metabolomics profiles in stored naturally contaminated maize. In: *Microorganisms*. 2022, vol. 10, nr. 5, pp. 1–17. ISSN 2076-2607.
65. MOSA, M.A. et al. Antifungal activity of eco-safe nanoemulsions based on *Nigella sativa* oil against *Penicillium verrucosum* infecting maize seeds: biochemical and physiological traits. In: *Frontiers in microbiology*. 2023, vol. 13, pp. 1–11. ISSN 1664-302X.
66. MARIN, S. et al. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium spp.* from maize grain. In: *Journal of applied microbiology*. 1998. vol. 84, nr. 1, p. 25–36. ISSN 1364-5072.
67. LUCIANO-ROSARIO, D., KELLER, N.P., JURICK, W.M. *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. In: *Molecular plant pathology*. 2020, vol. 21, nr. 11, pp. 1391–1404. ISSN 1364-5072.
68. PLEADIN, J., FRECE, J., MARKOV, K. Mycotoxins in food and feed. In: *Advances in food and nutrition reasearch*. 2019, vol. 89, pp. 297–345. ISSN 1043-4526.
69. ÜLGER, T.G. et al. Genotoxic effects of mycotoxins. In: *Toxicon*. 2020, vol. 185, pp. 104–113. ISSN 1879-3150.
70. MARCHESE, S. et al. Aflatoxin B1 and M1: biological properties and their involvement in cancer development. In: *Toxins*. 2018, vol. 10, nr. 6, pp. 1–19. ISSN 2072-6651.
71. PANDEY, M.K. et al. Mitigating aflatoxin contamination in groundnut through a combination of genetic resistance and post-harvest management practices. In: *Toxins*. 2019, vol. 11, nr. 6, pp. 1–21. ISSN 2072-6651.
72. Hotărâre nr. 520 din 22-06-2010 cu privire la aprobarea Regulamentului sanitar privind contaminanții din produsele alimentare [online]. *Registrul de stat al actelor juridice* [citat 04.07.2020]. Disponibil:  
[https://www.legis.md/cautare/getResults?doc\\_id=103321&lang=ro](https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=103321&lang=ro).



73. WANGIA-DIXON, R.N., NISHIMWE, K. Molecular toxicology and carcinogenesis of fumonisins: a review. In: *Journal of environmental science and health, part C*. 2021, vol. 39, nr. 1, pp. 44–67. ISSN 2689-6591.
74. KAMLE, M. et al. Fumonisins: impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. In: *Toxins*. 2019, vol. 11, nr. 6, pp. 1–23. ISSN 2072-6651.
75. YLI-MATTILA, T., SUNDHEIM, L. Fumonisins in African countries. In: *Toxins*. 2022, vol. 14, nr. 6, pp. 1–16. ISSN 2072-6651.
76. YAO, Y., LONG, M. The biological detoxification of deoxynivalenol: a review. In: *Food and chemical toxicology*. 2020, vol. 145, nr. 111649, pp. 1–9. ISSN 1873-6351.
77. THAPA, A. et al. Deoxynivalenol and zearalenone—synergistic or antagonistic agri-food chain co-contaminants? In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 8, pp. 1–20. ISSN 2072-6651.
78. RAI, A., DAS, M., TRIPATHI, A. Occurrence and toxicity of a *Fusarium* mycotoxin, zearalenone. In: *Critical reviews in food science and nutrition*. 2020, vol. 60, nr. 16, pp. 2710–2729. ISSN 1549-7852..
79. ROPEJKO, K., TWARUŹEK, M. Zearalenone and its metabolites—general overview, occurrence, and toxicity. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 1, pp. 1–12. ISSN 2072-6651.
80. ZHONG, L. et al. Patulin in apples and apple-based food products: the burdens and the mitigation strategies. In: *Toxins*. 2018, vol. 10, nr. 11, pp. 1–30. ISSN 2072-6651.
81. SADHASIVAM, S. et al. Rapid detection and quantification of patulin and citrinin contamination in fruits. In: *Molecules*. 2021, vol. 26, nr. 15, pp. 1–8. issn 1420-3049.
82. JANIK, E. et al. T-2 toxin - the most toxic trichothecene mycotoxin: metabolism, toxicity, and decontamination strategies. In: *Molecules*. 2021, vol. 26, nr. 22, p. 1–15. ISSN 1420-3049.
83. KIŠ, M. et al. A two-year occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 toxin in Croatian cereals relative of the regional weather. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 1, pp. 1–12. ISSN 2072-6651.
84. KHOI, C.S. et al. Ochratoxin a-induced nephrotoxicity: up-to-date evidence. In: *International journal of molecular sciences*. 2021, vol. 22, nr. 20, pp. 1–20. ISSN 1422-0067.
85. LV, L., WANG, X. Recent advances in ochratoxin a electrochemical biosensors: recognition elements, sensitization technologies, and their applications. In: *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020, vol. 68, nr. 17, pp. 4769–4787. ISSN 1520-5118.
86. KAMLE, M. et al. Citrinin mycotoxin contamination in food and feed: impact on agriculture, human health, and detection and management strategies. In: *Toxins*. 2022, vol.

- 14, nr. 2, pp. 1–25. ISSN 2072-6651.
87. THE EU COMMISSION. Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. In: *EFSA journal*. 2012, vol. 10, nr. 3, pp. 2013–2014. ISSN 1831-4732.
88. CARBAS, B. et al. Occurrence of *Fusarium spp.* in maize grain harvested in Portugal and accumulation of related mycotoxins during storage. In: *Foods*. 2021, vol. 10, nr. 2, pp. 1–14. ISSN 2304-8158.
89. KENNGOTT, K. et al. *Fusarium* mycotoxins in maize field soils: method validation and implications for sampling strategy. In: *Toxins*. 2022, vol. 14, nr. 2, pp. 1–21. ISSN 2072-6651.
90. BRITO, V.D. et al. Fungal diversity and mycotoxins detected in maize stored in silo-bags: a review. In: *Journal of the science of food and agriculture*. 2022. vol. 102, nr. 7, pp. 2640–2650. ISSN 1097-0010.
91. HANVI, D.M. et al. Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo. In: *Mycotoxin research*. 2019, vol. 35, nr. 4, pp. 321–327. ISSN 1867-1632.
92. NAN, M., XUE, H., BI, Y. Contamination, detection and control of mycotoxins in fruits and vegetables. In: *Toxins*. 2022. vol. 14, nr. 5, pp. 1–30. ISSN 2072-6651.
93. OLIVEIRA, M., VASCONCELOS, V. Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: a review. In: *Toxins*. 2020, vol. 12, nr. 3, pp. 1–25. ISSN 2072-6651.
94. MUNKVOLD, G.P. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: *Mycotoxigenic fungi: methods and protocols, methods in molecular biology*. 2017, vol. 1542, pp. 51–106. ISSN 1064-3745.
95. WEN, Y.Q. et al. Effect of stored humidity and initial moisture content on the qualities and mycotoxin levels of maize germ and its processing products. In: *Toxins*. 2020, vol. 12, nr. 9, pp. 1–13. ISSN 2072-6651.
96. MEYER-WOLFARTH, F. et al. Effects of temperature and soil fauna on the reduction and leaching of deoxynivalenol and zearalenone from *Fusarium graminearum*-infected maize stubbles. In: *Mycotoxin research*. 2021, vol. 37, nr. 3, pp. 249–263. ISSN 1867-1632.
97. EKWOMADU, T.I. et al. Variation of *Fusarium* free, masked, and emerging mycotoxin metabolites in maize from agriculture regions of South Africa. In: *Toxins*. 2020, vol. 12, nr. 3, pp. 1–19. ISSN 2072-6651.
98. TOPI, D. et al. Incidence of *Fusarium* mycotoxins in wheat and maize from Albania. In: *Molecules*. 2020, vol. 26, nr. 1, pp. 1–14. ISSN 1420-3049.

99. YANG, X. et al. Co-occurrence of mycotoxins in maize and maize-derived food in China and estimation of dietary intake. In: *Food additives & contaminants. Part B, surveillance*. 2019, vol. 12, nr. 2, pp. 124–134. ISSN 1939-3229.
100. ZHANG, D. et al. Mycotoxins in maize silage from China in 2019. In: *Toxins*. 2022, vol. 14, nr. 4, pp. 1–14. ISSN 2072-6651.
101. BIRR, T. et al. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their modified forms in forage maize cultivars. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 2, pp. 1–20. ISSN 2072-6651.
102. KAUR, B., BHATIA, D., MAVI, G.S. Eighty years of gene-for-gene relationship and its applications in identification and utilization of *R* genes. In: *Journal of genetics*. 2021, vol. 100, nr. 2, pp. 1–17. ISSN 0973-7731.
103. LIU, Z. et al. Recent progress in rice broad-spectrum disease resistance. In: *International journal of molecular sciences*. 2021, vol. 22, nr. 21, pp. 1–17. ISSN 1422-0067.
104. JI, Z. et al. Plant executor genes. In: *International journal of molecular sciences*. 2022, vol. 23, nr. 3, pp. 1–11. ISSN 0973-7731.
105. MÄRKLE, H., SAUR, I.M., STAM, R. Evolution of resistance (*R*) gene specificity. In: *Essays in biochemistry*. 2022, vol. 66, nr. 5, pp. 551–560. ISSN 1744-1358.
106. GAREWAL, N. et al. Identification of Pseudo-*R* genes in *Vitis vinifera* and characterization of their role as immunomodulators in host-pathogen interactions. In: *Journal of advanced research*. 2022, vol. 42, pp. 17–28. ISSN 2090-1224.
107. NGOU, B.P., DING, P., JONES, J.D. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. In: *Plant cell*. 2022, vol. 34, nr. 5, pp. 1447–1478. ISSN 1532-298X.
108. PARVAIZ, A. et al. Characterization and expression analysis of resistance gene analogues in elite sugarcane genotypes. In: *Protein and peptide letters*. 2021, vol. 28, nr. 8, pp. 929–937. ISSN 1875-5305.
109. ZHOU, Z. et al. Determination of the key resistance gene analogs involved in *Ascochyta rabiei* recognition in chickpea. In: *Frontiers in plant science*. 2019, vol. 10, pp. 1–12. ISSN 1664-462X.
110. SEKHWAL, M.K. et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. In: *International journal of molecular sciences*. 2015, vol. 16, nr. 8, pp. 19248–19290. ISSN 1422-0067.
111. KIM, N. et al. Development of clustered resistance gene analogs-based markers of

- resistance to *Phytophthora capsici* in chili pepper. In: *BioMed research international*. 2019, vol. 2019, pp. 1–12. ISSN 2314-6141.
112. KOURELIS, J., VAN DER HOORN, R.A. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. In: *Plant cell*. 2018, vol. 30, nr. 2, pp. 285–299. ISSN 1532-298X.
113. KIM, S.B. et al. Analysis of the transcriptomic, metabolomic, and gene regulatory responses to *Puccinia sorghi* in maize. In: *Molecular plant pathology*. 2021, vol. 22, nr. 4, pp. 465–479. ISSN 1364-3703.
114. BHADAURIA, V., POPESCU, L. Quantitative genetics of disease resistance in wheat. In: *Current issues in molecular biology*. 2018, vol. 27, pp. 105–107. ISSN 1467-3045.
115. GOU, M. et al. Quantitative disease resistance: multifaceted players in plant defense. In: *Journal of integrative plant biology*. 2023, vol. 65, nr. 2, pp. 594–610. ISSN 1744-7909.
116. DELPLACE, F. et al. Robustness of plant quantitative disease resistance is provided by a decentralized immune network. In: *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 2020, vol. 117, nr. 30, pp. 18099–18109. ISSN 1091-6490.
117. YANG, Q., BALINT-KURTI, P., XU, M. Quantitative disease resistance: dissection and adoption in maize. In: *Molecular plant*. 2017, vol. 10, nr. 3, pp. 402–413. ISSN 1752-9867.
118. MIEDANER, T. et al. Genomics-assisted breeding for quantitative disease resistances in small-grain cereals and maize. In: *International journal of molecular sciences*. 2020, vol. 21, nr. 24, pp. 1–22. ISSN 1422-0067.
119. MA, P. et al. Evaluation and identification of resistance lines and QTLs of maize to seedborne *Fusarium verticillioides*. In: *Plant disease*. 2022, vol. 106, nr. 8, pp. 2066–2073. ISSN 0191-2917.
120. RASHID, Z. et al. Identification and validation of a key genomic region on chromosome 6 for resistance to Fusarium stalk rot in tropical maize. In: *Theoretical and applied genetics*. 2022, vol. 135, nr. 12, pp. 4549–4563. ISSN 1432-2242.
121. AFOLABI, C.G. et al. Evaluation of maize inbred lines for resistance to Fusarium ear rot and fumonisin accumulation in grain in tropical Africa. In: *Plant disease*. 2007, vol. 91, nr. 3, pp. 279–286. ISSN 0191-2917.

122. CHEN, J. et al. Genome-wide association study and QTL mapping reveal genomic loci associated with Fusarium ear rot resistance in tropical maize germplasm. In: *G3*. 2016, vol. 6, nr. 12, pp. 3803–3815. ISSN 2160-1836.
123. SANTIAGO, R. et al. Genomics of maize resistance to Fusarium ear rot and fumonisin contamination. In: *Toxins*. 2020, vol. 12, nr. 7, pp. 1–16. ISSN 2072-6651.
124. MORALES, L. et al. Diverse components of resistance to Fusarium verticillioides infection and fumonisin contamination in four maize recombinant inbred families. In: *Toxins*. 2019, vol. 11, nr. 2, pp. 1–17. ISSN 2072-6651.
125. KEBEDE, A.Z. et al. Transcriptome profiling of two maize inbreds with distinct responses to Gibberella ear rot disease to identify candidate resistance genes. In: *BMC Genomics*. 2018, vol. 19, nr. 1, pp. 1–12. ISSN 1471-2164.
126. KAZAN, K., GARDINER, D.M. Transcriptomics of cereal-*Fusarium graminearum* interactions: what we have learned so far. In: *Molecular plant pathology*. 2018, vol. 19, nr. 3, pp. 764–778. ISSN 1364-3703.
127. SEPTIANI, P. et al. Unravelling the genetic basis of *Fusarium* seedling rot resistance in the MAGIC maize population: novel targets for breeding. In: *Scientific reports*. 2019, vol. 9, nr. 1, pp. 1–10. ISSN 2045-2322.
128. GAIKPA, D.S. et al. Exploiting genetic diversity in two European maize landraces for improving Gibberella ear rot resistance using genomic tools. In: *Theoretical and applied genetics*. 2021, vol. 134, nr. 3, pp. 793–805. ISSN 1432-2242.
129. YE, J. et al. The auxin-regulated protein ZmAuxRP1 coordinates the balance between root growth and stalk rot disease resistance in maize. In: *Molecular plant*. 2019, vol. 12, nr. 3, pp. 360–373. ISSN 1752-9867.
130. SUN, Y. et al. Integrated gene co-expression analysis and metabolites profiling highlight the important role of *ZmHIR3* in maize resistance to Gibberella stalk rot. In: *Frontiers in plant science*. 2021, vol. 12, pp. 1–21. ISSN 1664-462X.
131. WU, Y. et al. Linkage mapping and genome-wide association study reveals conservative QTL and candidate genes for Fusarium rot resistance in maize. In: *BMC Genomics*. 2020, vol. 21, nr. 1, pp. 1–11. ISSN 1471-2164.
132. STAGNATI, L. et al. A genome wide association study reveals markers and genes associated with resistance to *Fusarium verticillioides* infection of seedlings in a maize diversity panel. In: *G3: genes, genomes, genetics*. 2019, vol. 9, nr. 2, pp. 571–579. ISSN 2160-1836.

133. SOBIECH, A. et al. Associative and physical mapping of markers related to *Fusarium* in maize resistance, obtained by next-generation sequencing (NGS). In: *International journal of molecular sciences*. 2022, vol. 23, nr. 11, pp. 1–15. ISSN 1422-0067.
134. DE JONG, G. et al. Genome-wide association analysis of ear rot resistance caused by *Fusarium verticillioides* in maize. In: *Genomics*. 2018, vol. 110, nr. 5, pp. 291–303. ISSN 1471-2164.
135. CAO, A. et al. Genomics and pathways involved in maize resistance to *Fusarium* ear rot and kernel contamination with fumonisins. In: *Frontiers in plant science*. 2022, vol. 13, pp. 1–15. ISSN 1664-462X.
136. TRAN, T.M. et al. Molecular insights into defense responses of vietnamese maize varieties to *Fusarium verticillioides* isolates. In: *Journal of fungi*. 2021, vol. 7, nr. 9, pp. 1–13. ISSN 2309-608X.
137. LI, J. et al. Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding. In: *Plant signaling & behavior*. 2019, vol. 14, nr. 8, pp. 1–10. ISSN 1559-2324.
138. WANI, S.H. et al. WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. In: *Plant cell reports*. 2021, vol. 40, nr. 7, pp. 1071–1085. ISSN 1432-203X.
139. BAILLO, E.H. et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. In: *Genes*. 2019, vol. 10, nr. 10, pp. 1–23. ISSN 2073-4425.
140. LI, P. et al. Trihelix transcription factor ZmThx20 is required for kernel development in maize. In: *International journal of molecular sciences*. 2021, vol. 22, nr. 22, pp. 1–21. ISSN 1422-0067.
141. LIU, X. et al. The trihelix transcription factor OsGT $\gamma$ -2 is involved adaption to salt stress in rice. In: *Plant molecular biology*. 2020, vol. 103, nr. 4–5, pp. 545–560. ISSN 1573-5028.
142. VÖLZ, R. et al. The Trihelix transcription factor GT2-like 1 (GTL1) promotes salicylic acid metabolism, and regulates bacterial-triggered immunity. In: *PLoS genetics*. 2018, vol. 14, nr. 10, pp. 1–22. ISSN 1553-7404.
143. ZHANG, Q. et al. GT factor ZmGT-3b is associated with regulation of photosynthesis and defense response to *Fusarium graminearum* infection in maize

- seedling. In: *Frontiers in plant science*. 2021, vol. 12, pp. 1–20. ISSN 1664-462X.
144. BANSAL, R. et al. Evolutionary understanding of metacaspase genes in cultivated and wild *Oryza* species and its role in disease resistance mechanism in rice. In: *Genes*. 2020, vol. 11, nr. 12, pp. 1–22. ISSN 2073-4425.
145. GONG, P. et al. Transcriptional profiling of resistant and susceptible cultivars of grapevine (*Vitis* L.) reveals hypersensitive responses to *Plasmopara viticola*. In: *Frontiers in microbiology*. 2022, vol. 13, pp. 1–17. ISSN 1664-302X.
146. LUAN, Q.L. et al. Maize metacaspases modulate the defense response mediated by the NLR protein Rp1-D21 likely by affecting its subcellular localization. In: *Plant journal*. 2021, vol. 105, nr. 1, pp. 151–166. ISSN 1365-313X.
147. KLEMENČIČ, M., FUNK, C. Evolution and structural diversity of metacaspases. In: *Journal of experimental botany*. 2019, vol. 70, nr. 7, pp. 2039–2047. ISSN 1460-2431.
148. MA, S., SHI, H., WANG, G.F. The potential roles of different metacaspases in maize defense response. In: *Plant signaling & behaviour*. 2021, vol. 16, nr. 6, pp. 1–7. ISSN 1559-2324.
149. CAMEJO, D. et al. Oxidative post-translational modifications controlling plant-pathogen interaction. In: *Plant physiology and biochemistry*. 2019, vol. 144, pp. 110–117. ISSN 1873-2690.
150. DEBOEVER, E. et al. Plant-pathogen interactions: underestimated roles of phyto-oxylipins. In: *Trends in plant science*. 2020, vol. 25, nr. 1, pp. 22–34. ISSN 1878-4372.
151. KANG, Y. et al. Evolution and functional diversity of lipoxygenase (LOX) genes in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). In: *International journal of biological macromolecules*. 2021, vol. 188, pp. 844–854. ISSN 1879-0003.
152. MAYNARD, D. et al. Biochemical characterization of 13-lipoxygenases of *Arabidopsis thaliana*. In: *International journal of molecular science*. 2021, vol. 22, nr. 19, pp. 1–23. ISSN 1422-0067.
153. LANUBILE, A. et al. Loss of Zm-lipoxygenase 4 decreases *Fusarium verticillioides* resistance in maize seedlings. In: *Genes*. 2021, vol. 12, nr. 3, pp. 1–15. ISSN 2160-1836.
154. BAI, H. et al. Comparative proteomic analysis of the defense response to Gibberella stalk rot in maize and reveals that ZmWRKY83 is involved in plant disease resistance. In: *Frontiers in plant science*. 2021, vol. 12, pp. 1–13. ISSN 1664-462X.
155. SHARMA, A. et al. Response of phenylpropanoid pathway and the role of

- polyphenols in plants under abiotic stress. In: *Molecules*. 2019, vol. 24, nr. 13, pp. 1–22. ISSN 1420-3049.
156. BARROS, J., DIXON, R.A. Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. In: *Trends in plant science*. 2020, vol. 25, nr. 1, pp. 66–79. ISSN 1878-4372.
157. GUO, H. et al. FERONIA receptor kinase contributes to plant immunity by suppressing jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. In: *Current biology*. 2018, vol. 28, nr. 20, pp. 1–16. ISSN 1879-0445.
158. GUPTA, A., BHARDWAJ, M., TRAN, L.S. Jasmonic acid at the crossroads of plant immunity and *Pseudomonas syringae* virulence. In: *International journal of molecular sciences*. 2020, vol. 21, nr. 20, pp. 1–19. ISSN 1422-0067.
159. TANG, B. et al. Multi-omics analysis reveals a regulatory network of *ZmCCT* during maize resistance to *Gibberella* stalk rot at the early stage. In: *Frontiers in plant science*. 2022, vol. 13, pp. 1–14. ISSN 1664-462X.
160. WANG, Q. et al. Transcriptome and oxylipin profiling joint analysis reveals opposite roles of 9-oxylipins and jasmonic acid in maize resistance to *Gibberella* stalk rot. In: *Frontiers in plant science*. 2021, vol. 12, pp. 1–12. ISSN 1664-462X.
161. LIU, H. et al. Comparative transcriptome profiling and co-expression network analysis uncover the key genes associated with early-stage resistance to *Aspergillus flavus* in maize. In: *BMC plant biology*. 2021, vol. 21, nr. 1, pp. 1–18. ISSN 1471-2229.
162. MUSUNGU, B. et al. Use of dual RNA-seq for systems biology analysis of *Zea mays* and *Aspergillus flavus* interaction. In: *Frontiers in microbiology*. 2020, vol. 11, pp. 1–19. ISSN 1664-302X.
163. OMOLEHIN, O. et al. Resistance to aflatoxin accumulation in maize mediated by host-induced silencing of the *Aspergillus flavus* alkaline protease (*alk*) gene. In: *Journal of fungi*. 2021, vol. 7, nr. 11, pp. 1–21. ISSN 2309-608X.
164. SAMAYOA, L.F. et al. Genome-wide association analysis for fumonisin content in maize kernels. In: *BMC plant biology*. 2019, vol. 19, nr. 1, pp. 1–11. ISSN 1471-2229.
165. GESTEIRO, N. et al. Genomics of maize resistance to kernel contamination with fumonisins using a multiparental advanced generation InterCross maize population (MAGIC). In: *BMC plant biology*. 2021, vol. 21, nr. 1, pp. 1–9. ISSN 1471-2229.
166. WOMACK, E.D. et al. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to aflatoxin accumulation in maize inbred Mp719. In: *Frontiers in microbiology*. 2020, vol. 11, pp. 1–8. ISSN 1664-302X.



167. HAWKINS, L.K. et al. Survey of candidate genes for maize resistance to infection by *Aspergillus flavus* and/or aflatoxin contamination. In: *Toxins*. 2018, vol. 10, nr. 2, pp. 1–10. ISSN 2072-6651.
168. PARISH, F. et al. Differential expression of signaling pathway genes associated with aflatoxin reduction quantitative trait loci in maize (*Zea mays* L.). In: *Frontiers in microbiology*. 2019, vol. 10, pp. 1–10. ISSN 1664-302X.
169. MALARCZYK, D., PANEK, J., FRAC, M. Alternative molecular-based diagnostic methods of plant pathogenic fungi affecting berry crops—a review. In: *Molecules*. 2019, vol. 24, nr. 7, pp. 1–25. ISSN 1420-3049.
170. ALSOHAILI, S.A., BANI-HASAN, B.M. Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the northern eastern Desert of Jordan. In: *Jordan journal of biological sciences*. 2018, vol. 11, nr. 3, pp. 329–337. ISSN 2307-7166.
171. KUZDRALIŃSKI, A. et al. A review of conventional PCR assays for the detection of selected phytopathogens of wheat. In: *Microbial physiology*. 2017, vol. 27, nr. 3, pp. 175–189. ISSN 2673-1665.
172. WEI, Z. et al. Phylogeny and taxonomy on cryptic species of forked ferns of Asia. In: *Frontiers in plant science*. 2021, vol. 12, pp. 1–12. ISSN 1664-462X.
173. LÜCKING, R. et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? In: *IMA Fungus*. 2020, vol. 11, nr. 1, pp. 1–32. ISSN 2210-6359.
174. INDERBITZIN, P., ROBBERTSE, B., SCHOCH, C.L. Species identification in plant-associated prokaryotes and fungi using DNA. In: *Phytobiomes journal*. 2020, vol. 4, nr. 2, p. 103–114. ISSN 2471-2906.
175. MAZA-MÁRQUEZ, P. et al. Evaluation of the abundance of fungi in wastewater treatment plants using quantitative PCR (qPCR). In: *Methods in molecular biology*. 2020, vol. 2065, pp. 79–94. ISSN 1940-6029.
176. GREEN, M.R., SAMBROOK, J. The basic polymerase chain reaction (PCR). In: *Cold Spring Harbor protocols*. 2018, vol. 2018, nr. 5, pp. 338–345. ISSN 1559-6095.
177. MAHANAMA, A., WILSON-DAVIES, E. Insight into PCR testing for surgeons. In: // Surg. (Oxford, Oxfordshire). Surgery (Oxf), 2021. Vol. 39, nr. 11. P. 759–768.
178. VU, D. et al. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and

- higher taxon delimitation. In: *Studies in mycology*. 2019, vol. 92, pp. 135–154. ISSN 0166-0616.
179. SCHÄFFER, A.A. et al. Ribovore: ribosomal RNA sequence analysis for GenBank submissions and database curation. In: *BMC bioinformatics*. 2021, vol. 22, nr. 1, pp. 1–29. ISSN 1471-2105.
180. MENOLLI, N., SÁNCHEZ-GARCÍA, M. Brazilian fungal diversity represented by DNA markers generated over 20 years. In: *Brazilian journal of microbiology*. 2020, vol. 51, nr. 2, pp. 729–749. ISSN 1678-4405.
181. MONTERO-VARGAS, M. et al. Step-by-step pipeline for the ecological analysis of endophytic fungi using ITS nrDNA data. In: *Current protocols in microbiology*. 2020, vol. 56, nr. 1, pp. 1–14. ISSN 1934-8533.
182. WEIGAND, H. et al. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. In: *The science of the total environment*. 2019, vol. 678, pp. 499–524. ISSN 1879-1026.
183. EKANAYAKA, A.H. et al. A review of the fungi that degrade plastic. In: *Journal of fungi*. 2022, vol. 8, nr. 8, pp. 1–27. ISSN 2309-608X.
184. TRIPATHI, A. et al. DNA barcode, multiplex PCR and qPCR assay for diagnosis of pathogens infecting pulse crops to facilitate safe exchange and healthy conservation of germplasm. In: *Archives of microbiology*. 2021, vol. 203, nr. 5, pp. 2575–2589. ISSN 1432-072X.
185. PÉREZ-IZQUIERDO, L. et al. A new promising phylogenetic marker to study the diversity of fungal communities: The Glycoside Hydrolase 63 gene. In: *Molecular ecology resources*. 2017, vol. 17, nr. 6, pp. 1–11. ISSN 1755-0998.
186. MOTA-GUTIERREZ, J. et al. Metataxonomic comparison between internal transcribed spacer and 26S ribosomal large subunit (LSU) rDNA gene. In: *International journal of food microbiology*. 2019, vol. 290, pp. 132–140. ISSN 1879-3460.
187. SUNDARESAN, N. et al. Internal transcribed spacer 2 (*ITS2*) molecular morphometric analysis based species delimitation of foliar endophytic fungi from *Aglaia elaeagnoidea*, *Flacourtia inermis* and *Premna serratifolia*. In: *PLoS One*. 2019, vol. 14, nr. 4, pp. 1–11. ISSN 1932-6203.
188. YANG, R.H. et al. Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (*ITS*), specifically *ITS1* and *ITS2*, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. In: *PLoS One*. 2018, vol. 13, nr. 10, pp. 1–17. ISSN 1932-6203.

189. SUN, W. et al. Unveiling the hidden diversity of rock-inhabiting fungi: *Chaetothyriales* from China. In: *Journal of fungi*. 2020, vol. 6, nr. 4, pp. 1–37. ISSN 1932-6203.
190. WANG, M.M. et al. *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. In: *Persoonia*. 2019, vol. 43, pp. 70–89. ISSN 0031-5850.
191. CAMPOS, A.C. *Characterization of Aspergillus section Flavi : molecular markers as tools to unmask cryptic species*. Teza de doctor în patologie, toxicologie, genetică și nutriție. Franța, 2019. pp. 1–213.
192. OLLINGER, N. et al. DNA barcoding for the identification of mold species in bakery plants and products. In: *Food chemistry*. 2020, vol. 318, pp.1-8. ISSN 1873-7072.
193. LEE, S. et al. Fungal diversity and enzyme activity associated with the macroalgae, *Agarum clathratum*. In: *Mycobiology*. 2019, vol. 47, nr. 1, pp. 1–10. ISSN 1229-8093.
194. VISAGIE, C.M., HOUBRAKEN, J. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. In: *Studies in mycology*. 2020, vol. 95, pp. 253–292. ISSN 0166-0616.
195. GUEVARA-SUAREZ, M. et al. Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of *Penicillium*-like fungi in *Aspergillaceae*. In: *Fungal systematics and evolution*. 2020, vol. 5, pp. 39–75. ISSN 2589-3831.
196. LI, Y. et al. A genome-scale phylogeny of the kingdom *Fungi*. In: *Current biology : CB*. 2021, vol. 31, nr. 8, pp. 1653–1665. ISSN 1879-0445.
197. HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. In: *Studies in mycology*. 2020, vol. 95, pp. 5–169. ISSN 0166-0616.
198. NARGESI, S. et al. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae* targeting the *cyp51A* gene. In: *Pathogens*. 2021, vol. 10, nr. 10, pp. 1–9. ISSN 2076-0817.
199. LORI, G. et al. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. In: *Phytopathology*. 2004, vol. 94, nr. 6, pp. 661–668. ISSN 0031-949X.
200. OLIVEIRA, M., AZEVEDO, L. Molecular markers: an overview of data published for fungi over the last ten years. In: *Journal of fungi*. 2022, vol. 8, nr. 8, p. 1–12. ISSN 2309-608X.
201. CHENG, Y. et al. Molecular diagnostics and pathogenesis of fungal pathogens on bast fiber crops. In: *Pathogens*. 2020, vol. 9, nr. 3, pp. 1–19. ISSN 2076-0817.

202. ALHASHEL, A.F. et al. Genetic mapping of host resistance to the *Pyrenophora teres f. maculata* isolate 13IM8.3. In: *G3*. 2021, vol. 11, nr. 12, pp. 1–8. ISSN 2160-1836.
203. ŻELECHOWSKI, M. et al. Patterns of diversity of *Fusarium* fungi contaminating soybean grains. In: *Toxins*. 2021, vol. 13, nr. 12, pp. 1–11. ISSN 2072-6651.
204. VILLAFANA, R.T., RAMDASS, A.C., RAMPERSAD, S.N. Selection of *Fusarium* trichothecene toxin genes for molecular detection depends on TRI gene cluster organization and gene function. In: *Toxins*. 2019, vol. 11, nr. 1, pp. 1–25. ISSN 2072-6651.
205. PROCTOR, R.H. et al. A Novel trichothecene toxin phenotype associated with horizontal gene transfer and a change in gene function in *Fusarium*. In: *Toxins*. 2022, vol. 15, nr. 1, pp. 1–18. ISSN 2072-6651.
206. CACERES, I. et al. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: a review. In: *Toxins*. 2020, vol. 12, nr. 3, pp. 1–28. ISSN 2072-6651.
207. CASQUETE, R. et al. Gene expression of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system to control aflatoxin production. In: *Journal of dairy science*. 2019, vol. 102, nr. 9, pp. 7765–7772. ISSN 1525-3198.
208. MAHMOODZADEH, H. et al. The effect of Propolis on inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth, aflatoxin production and expression of aflatoxin biosynthesis pathway genes. In: *Journal of environmental health science & engineering*. 2020, vol. 18, nr. 1, pp. 297–302. ISSN 2052-336X.
209. ALGAMMAL, A.M. et al. Molecular and HPLC-based approaches for detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A released from toxigenic *Aspergillus* species in processed meat. In: *BMC microbiology*. 2021, vol. 21, nr. 1, pp. 1–10. ISSN 1471-2180.
210. REIS, T.A. et al. Early expression of the aflatoxin gene cluster in *Aspergillus nomiae* isolated from Brazil nut. In: *Toxicon*. 2022, vol. 209, pp. 36–42. ISSN 1879-3150.
211. WU, Y. et al. Effects of different carbon sources on fumonisin production and *FUM* gene expression by *Fusarium proliferatum*. In: *Toxins*. 2019, vol. 11, nr. 5, pp. 1–16. ISSN 2072-6651.
212. SULTANA, S. et al. A natural variation of fumonisin gene cluster associated with fumonisin production difference in *Fusarium fujikuroi*. In: *Toxins*. 2019, vol. 11, nr. 4, pp. 1–14. ISSN 2072-6651.
213. BECCARI, G. et al. *In vitro* fumonisin biosynthesis and genetic structure of *Fusarium verticillioides* strains from five mediterranean countries. In: *Microorganisms*.

- 2020, vol. 8, nr. 2, pp. 1–17. ISSN 2076-2607.
214. FUMERO, M.V. et al. Fumonisin and beauvericin chemotypes and genotypes of the sister species *Fusarium subglutinans* and *Fusarium temperatum*. In: *Applied and environmental microbiology*. 2020, vol. 86, nr. 13, p. 1–15. ISSN 1098-5336.
215. ZETINA-SERRANO, C. et al. The *brlA* gene deletion reveals that patulin biosynthesis is not related to conidiation in *Penicillium expansum*. In: *International journal of molecular sciences*. 2020, vol. 21, nr. 18, pp. 1–32. ISSN 1422-0067.
216. ZHANG, J. et al. Deletion and overexpression of the *AnOTAbzip* Gene, a positive regulator of ochratoxin a biosynthesis in *Aspergillus niger*. In: *Journal of agricultural and food chemistry*. 2022, vol. 70, nr. 7, pp. 2169–2178. ISSN 1520-5118.
217. WEN, T., OTT, A. Dellaporta DNA Extraction. In: *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983, vol. 1, nr. 4, pp. 19–21. ISSN 2618-7354.
218. ABOUL-MAATY, N.A.-F., ORABY, H.A.-S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. In: *Bulletin of the National Research Centre*. 2019, vol. 43, nr. 1, pp. 1–10. ISSN 2522-8307.
219. RUIZ-VILLALBA, A., RUIJTER, J., VAN DEN HOFF, M. Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. In: *Life*. 2021, vol. 11, nr.429, pp. 1-22. ISSN: 2075-1729.
220. *ISO 21571:2005. Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*. International Organization for Standardization, 2015. 50 p. ISBN 2831886376.
221. KALENDAR, R., MUTERKO, A., BORONNIKOVA, S. Retrotransposable elements: DNA fingerprinting and the assessment of genetic diversity. In: *Methods in molecular biology*. 2021, vol. 2222, pp. 263–286. ISSN 1940-6029.
222. Food safety kits [online]. *Elabscience* [citat 23.08.2023]. Disponibil: [https://www.elabscience.com/search-category=food safety kits&p=1.html](https://www.elabscience.com/search-category=food%20safety%20kits&p=1.html).
223. Cophenetic correlation coefficient [online]. *MATLAB* [citat 23.08.2023]. Disponibil: <https://www.mathworks.com/help/stats/cophenet.html>.
224. DILLON, J.A.R., RAHMAN, M., YEUNG, K.H. Discriminatory power of typing schemes based on Simpson's index of diversity for *Neisseria gonorrhoeae*. In: *Journal of clinical microbiology*. 1993, vol. 31, nr. 10, pp. 2831-2833. ISSN 0095-1137.
225. **GRAJDIERU, C.** Molecular identification of fumonisin-producing fungi in maize. În: *Materialele conferinței științifice a doctoranzilor "Tendințe contemporane ale*

- dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători (ediția a IX-a)*, 15 iunie 2020, Chișinău. Chișinău: "Biotehdesign", 2020, vol. 1, pp. 199-204. ISBN 978- 9975-108-66-9.
226. **GRAJDIERU, C., TUMANOVA, L., MITINA, I., MITIN, V.** Comparative analysis of accumulation of some toxigenic fungi in maize seed material during storage using real-time PCR In: *Materialele conferinței naționale cu participare internațională "Știința în nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective" (ediția a V-a)*, 29-30 iunie 2021, Bălți. Bălți: Tipografia Centrală, 2021, pp. 54-57. ISBN 978-9975-62-432-9.
227. **GRAJDIERU, C., TUMANOVA, L.** Quantitation of toxigenic *Aspergillus flavus* strains in maize seed material via conventional PCR. In: *Materialele conferinței internaționale " Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего"(ediția a III-a)*, 14-15 septembrie 2021, Sankt-Petersburg. Sankt-Petersburg: ARI, 2021, pp.255-258. ISBN 978-5-905200-46-5.
228. **JUANOLA-FALGARONA, M. et al.** Ct values as a diagnostic tool for monitoring SARS-CoV-2 viral load using the QIAstat-Dx® Respiratory SARS-CoV-2 Panel. In: *International Journal of Infectious Diseases*. 2022, vol. 122, pp. 930–935. ISSN 1878-3511.
229. **PLATTEN, M. et al.** SARS-CoV-2, Ct-values, and infectivity—conclusions to be drawn from side observations. In: *Viruses*. 2021, vol. 13, nr. 8, pp. 1–6. ISSN 1999-4915.
230. **GRĂJDIERU, C.** Poisson distribution-based conventional PCR protocol for quantification of pathogenic fungi in maize. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2021, nr. 2(344), pp. 92-97. ISSN 1857-064X.
231. **TUMANOVA, L., GRĂJDIERU, C., MITIN, V., MITINA, I.** Evaluarea rezistenței a plantelor de porumb la speciile de *Fusarium* prin metoda PCR. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*. 2023, nr. 1 (171), pp. 133-138. ISSN 1814-3237.
232. **GRAJDIERU, C., BILICI, E.** Dynamics of maize pathogens from *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera in soil under weather conditions of Republic of Moldova. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*. 2023, nr.1 (171), pp. 106-112. ISSN 1814-3237.
233. Key access and utilization descriptors for maize genetic resources [Online]. *International Maize Improvement Center* [citat 1.11.2023]. Disponibil:

[https://qendraeresursevegjenetike.files.wordpress.com/2015/03/key\\_descriptors\\_maize](https://qendraeresursevegjenetike.files.wordpress.com/2015/03/key_descriptors_maize)

234. MUIS, A. et al. The response of some genotypes of maize to downy mildew, maydis leaf blight, leaf rust, and stalk rot. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2022, p. 1–13. ISBN: 178-168-81-92.
235. **GRĂJDIERU, C.**, BÎLICI, E. Evaluarea liniilor consangvinizate de porumb în baza rezistenței la fungi toxigenici din genurile *Fusarium* și *Aspergillus*. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*. 2022, nr.1 (151), pp. 35-41. ISSN 1814-3237.
236. BÎLICI, E., **GRĂJDIERU, C.** Immunologic evaluation of maize collection samples. In: *Materialele simpozionului științific internațional „Protecția plantelor – realizări și perspective”*, 2-3 octombrie 2023, Chisinau. Chișinău:”Print-Caro”, 2023, pp. 284-289, ISBN 978-9975-62-563-0.

Tabelul 1. Soluții și reactivi

Soluția-stock	Concentrația finală	Cantitatea la 100 ml*
Tampon de extragere 5% SDS		
SDS (solid)	5% (m/V)	5 g
1 M tris-HCl (pH 8.0)	0.2 M	20 ml
0.5 M EDTA	0.025 M	5 ml
4 M NaCl	0.025 M	6.25 ml
PVP (solid)	1%	1 g
Tampon 2x CTAB		
CTAB (solid)	2% (m/V)	2 g
1 M tris-HCl (pH 8.0)	100 mM Tris-HCl	10 ml
0.5 M EDTA	20 mM EDTA	4 ml
4 M NaCl	1.4 M NaCl	22.4 ml
Tampon TE		
1 M tris-HCl (pH 8.0)	10 mM Tris	1 ml
0.5 M EDTA	1 mM EDTA	200 $\mu$ l
Tampon 0,5% CTAB		
CTAB (solid)	0.5% (m/V)	500 mg
4 M NaCl	40 mM	1 ml
Tampon 1x TBE		
Tris (solid)	90 mM	1.08 g
Acid boric (solid)	90 mM	550 mg
0.5 M EDTA	2 mM	400 $\mu$ l

\*volumul final se ajustează cu dH<sub>2</sub>O



**Tabelul 1. Parametrii primerilor utilizați pentru nested-PCR și qPCR**

Primer	L, pb	T <sub>m</sub> , °C	T <sub>a</sub> , °C	CG,%	A	A <sub>I</sub>	FASTA	
aoch1	371	59.29	52	44.00	5.00	3.00	EU021662.1 Aspergillus ochraceus strain NRRL 419 beta tubulin gene	
aoch4		60.15		63.16	4.00	1.00		
aqoch2	181	60.56	52	41.67	5.00	0.00		
aqoch3		61.02		44.00	8.00	2.00		
acl1	317	59.29	60	44.00	5.00	3.00	EU021662.1 Aspergillus ochraceus strain NRRL 419 beta tubulin gene	
acl4		60.15		63.16	4.00	1.00		
aqcl2	152	60.50	60	45.83	5.00	2.00		
aqcl3		60.14		41.67	5.00	1.00		
fcbt1	988	61.17	54	55.00	8.00	1.00	MH521296.1 Fusarium equiseti strain UP-PA002 beta-tubulin gene, partial cds	
fcbt4		60.62		50.00	5.00	2.00		
fcbt2	204	61.78	56	57.14	4.00	2.00		
fcbt3		61.73		63.16	4.00	2.00		
fqcbt1	161	61.35	56	60.00	4.00	2.00	MH521296.1 Fusarium equiseti strain UP-PA002 beta-tubulin gene, partial cds	
fqcbt2		61.37		60.00	2.00	1.00		
feqin1	348	62.55	56	63.16	3.00	1.00		MH521296.1 Fusarium equiseti strain UP-PA002 beta-tubulin gene, partial cds
feqin4		62.65		55.00	4.00	0.00		
fqqin2	104	60.18	53	47.83	3.00	1.00		
fqqin3		61.26		47.83	4.00	1.00		
fqin1	122	60.03	53	50.00	4.00	2.00	KJ194168.1 Fusarium incarnatum strain 11 translation elongation factor 1 $\alpha$ (EF1a) gene	
fqin2		60.98		45.83	5.00	3.00		
fspte1	565	60.94	54	57.14	3.00	0.00		AJ420819.2 Fusarium sporotrichioides partial tef1 gene for translation elongation factor 1 alpha, exons 1-4, isolate VI01319
fspte4		60.11		55.00	4.00	0.00		
fqspte2	135	60.54	53	52.17	5.00	3.00		
fqspte3		61.40		55.00	2.00	2.00		
fcute1	336	61.81	56	63.16	3.00	2.00	KY205746.1 Fusarium culmorum strain IRO.004 translation elongation factor 1-alpha (TEF1) gene, partial cds	
fcute4		61.71		60.00	6.00	0.00		
fcute2	263	60.20	54	52.38	4.00	0.00		
fcute3		61.65		45.83	4.00	2.00		
pcit1	320	60.11	54	55.00	4.00	3.00	MF686433.1 Penicillium citrinum strain LTL353 beta-tubulin (btub) gene, partial cds	
pcit4		60.95		55.00	4.00	0.00		
pcit2	228	60.22	54	54.55	5.00	3.00		
pcit3		60.25		50.00	4.00	1.00		
pqcit15	107	60.11	54	55.00	4.00	3.00		
pqcit6		61.53		54.55	5.00	3.00		
pex1	354	61.46	60	55.00	4.00	1.00	FJ012871.1 Penicillium expansum isolate Exp1895 beta-tubulin gene, parti	
pex4		61.88		63.16	4.00	3.00		
pex2	344	59.39	60	55.00	4.00	2.00		
pex3		59.64		57.89	7.00	3.00		
pqex5	193	60.90	55	57.89	3.00	1.00		
pqex6		60.95		60.00	2.00	2.00		
pgr1	240	59.49	52	43.48	6.00	3.00	KR709178.1 Penicillium griseofulvum culture MUT<ITA>:1172 beta-tubulin (Tub) gene, partial cds	
pgr4		59.03		45.45	7.00	3.00		
pqgr2	112	60.13	54	52.38	5.00	2.00		
pqgr3		60.97		55.00	4.00	2.00		
pqgr5	106	60.13	54	52.38	5.00	2.00		

pqgr6		60.06		52.38	4.00	0.00	
pver1	218	60.26	52	41.67	5.00	1.00	FJ004438.1 <i>Penicillium verrucosum</i> strain ATHUM 5079 beta-tubulin (BenA) gene, partial cds
pver4		60.88		45.45	4.00	0.00	
pqver2	149	61.14	54	50.00	4.00	3.00	
pqver3		61.05		47.83	5.00	2.00	
pqver5	116	60.75	52	40.00	5.00	1.00	
pqver6		60.88		52.38	5.00	0.00	
pbrbt1	267	60.00	54	52.38	4.00	2.00	MH560351.1 <i>Penicillium brevicompactum</i> beta-tubulin gene, partial cds
pbrbt4		60.97		52.38	4.00	3.00	
pbrbt2	204	61.01	53	45.45	3.00	0.00	
pbrbt3		60.36		45.45	5.00	1.00	
pqbrbt5	200	60.75	53	41.67	3.00	0.00	
pqbrbt6		60.69		43.48	5.00	2.00	
pchbt1	248	60.85	60	44.00	5.00	2.00	GQ498281.1 <i>Penicillium chrysogenum</i> strain NRRL_1950 beta-tubulin (benA) gene, partial cds
pchbt4		60.81		60.00	4.00	1.00	
pqchbt2	172	60.90	60	50.00	4.00	2.00	
pchbt3(1)		60.68		52.38	5.00	3.00	
moch1	442	61.24	55	55.00	5.00	1.00	JN097805.1 <i>Penicillium viridicatum</i> strain CECT 2320 ochratoxin A non-ribosomal peptide synthetase gene, partial cds
moch4		61.14		60.00	4.00	2.00	
moch2	285	60.25	53	55.00	2.00	0.00	
moch3		60.20		47.62	5.00	1.00	
mqoch7	154	61.62	54	45.83	4.00	0.00	
mqoch8		61.70		54.55	3.00	0.00	
mpat1	505	60.95	55	55.00	4.00	2.00	
mpat4		60.62		55.00	5.00	1.00	
mpat2	364	60.86	55	45.83	3.00	3.00	DQ343639.1 <i>Penicillium expansum</i> strain NRRL 32289 isoeopoxidon dehydrogenase gene, partial cds
mpat3		60.77		52.38	5.00	3.00	
mqpat1	166	60.44	52	41.67	4.00	3.00	
mqpat2		60.88		52.38	4.00	2.00	
mze1	285	62.14	56	55.00	5.00	2.00	
mze4		61.85		57.14	7.00	3.00	
mze2	182	61.42	56	60.00	7.00	5.00	
mze3		61.73		57.14	4.00	0.00	
mqze1	93	61.81	55	60.00	4.00	2.00	
mqze2		60.67		55.00	7.00	2.00	
mafl1	661	60.30	52	63.16	5.00	2.00	AY611180.1 <i>Aspergillus flavus</i> isolate CA5 AFLR (aflR) gene, complete cds
mafl4		60.84		44.00	6.00	2.00	
mafl2	291	60.96	55	55.00	6.00	2.00	
mafl3		61.15		52.38	2.00	1.00	
mqafl1	198	62.00	55	52.38	3.00	0.00	
mqafl2		62.23		57.14	5.00	2.00	
ftri8gr1	405	60.85	53	45.83	4.00	1.00	MH514940.1 <i>Fusarium graminearum</i> isolate 23-4 Tri core gene cluster, complete sequence
ftri8gr4		60.95		52.38	3.00	3.00	
fqtri8gr2	147	60.55	53	47.83	4.00	3.00	
fqtri8gr3		60.75		63.16	4.00	1.00	
fufum6ve1	447	61.48	59	55.00	4.00	2.00	KF889190.1 <i>Fusarium verticillioides</i> isolate 17L oxygenase (fum6) gene, partial cds
fufum6ve4		61.21		57.14	4.00	0.00	
fqfum6ve2	179	61.52	59	55.00	4.00	1.00	
fqfum6ve3		61.80		55.00	3.00	0.00	
fprfum61	436	60.25	60	50.00	3.00	0.00	KF889207.1 <i>Fusarium proliferatum</i> isolate 85L oxygenase (fum6) gene, partial cds
fprfum64		60.11		55.00	3.00	3.00	
fqprfum62	123	60.82	58	55.00	4.00	0.00	

fqprfum63		60.47		55.00	5.00	3.00	
afaq1	245	60.54	60	55.00	3.00	0.00	U81806.1 <i>Aspergillus flavus</i> OMST-oxidoreductase (ord1) gene, promoter region and complete cds <i>Aspergillus flavus</i> isolate AF36 aflatoxin biosynthesis gene cluster, complete sequence
afaq4		61.26		55.00	4.00	2.00	
aqfaq3	144	61.14	60	47.83	4.00	2.00	
aqfaq4		60.82		52.38	3.00	0.00	
aqfaq5	177	60.13	60	52.38	3.00	2.00	
aqfaq6		60.82		52.38	3.00	0.00	
apap1	269	59.96	60	50.00	4.00	0.00	DQ390914.1 <i>Aspergillus parasiticus</i> strain IC73 O-methyltransferase A (aflP) gene, partial cds; and aflP-aflQ intergenic region, genomic sequence
apap4		59.17		40.00	4.00	2.00	
aqpap2	120	59.14	60	47.62	4.00	0.00	
aqpap3		59.51		34.62	4.00	0.00	
afap1	267	61.33	60	45.83	3.00	2.00	FJ877830.1 <i>Aspergillus flavus</i> strain IC289 O-methyltransferase A (aflP) gene, partial cds; and aflP-aflQ intergenic spacer, partial sequence
afap4		60.75		45.83	4.00	0.00	
aqfap2	152	61.72	55	52.17	4.00	0.00	
aqfap3		61.21		52.38	5.00	0.00	
aqfap5	114	60.34	53	57.14	4.00	2.00	
aqfap6		60.75		45.83	4.00	0.00	
mtri11cu1	623	60.73	60	55.00	3.00	1.00	KU572427.1 <i>Fusarium culmorum</i> strain CBS 173.31 trichothecene biosynthetic gene cluster, complete sequence GenBank: KU572427.1
mtri11cu4		60.87		57.14	4.00	2.00	
mtri11cu2	279	59.24	60	47.62	4.00	2.00	
mtri11cu3		60.03		50.00	4.00	2.00	
mqtri11cu7	122	60.99	60	44.00	8.00	2.00	
mqtri11cu8		61.25		55.00	6.00	2.00	
mtri11sp1	549	60.51	60	41.67	4.00	2.00	KT597870.1 <i>Fusarium sporotrichioides</i> culture-collection NRRL:29978 cytochrome P450 monooxygenase (Tri11) gene, partial cds
mtri11sp4		60.79		44.00	4.00	0.00	
mtri11sp2	154	61.00	60	57.14	2.00	0.00	
mtri11sp3		60.56		45.83	4.00	2.00	
mtri8cu1	842	59.93	60	47.83	8.00	2.00	KU572427.1 <i>Fusarium culmorum</i> strain CBS 173.31 trichothecene biosynthetic gene cluster, complete sequence GenBank: KU572427.1
mtri8cu4		60.36		50.00	6.00	3.00	
mtri8cu2	377	60.88	60	47.62	4.00	1.00	
mtri8cu3		61.15		52.38	4.00	3.00	
mqtri8cu7	167	60.40	60	52.38	4.00	1.00	
mqtri8cu3-8		61.15		52.38	4.00	3.00	
mtri8sp1	515	60.56	60	41.67	5.00	1.00	KT597812.1 <i>Fusarium sporotrichioides</i> culture-collection NRRL:29978 trichothecene C-3 esterase (TRI8) gene, partial cds
mtri8sp4		60.06		47.83	4.00	1.00	
mtri8sp2	287	60.62	60	45.83	7.00	0.00	
mtri8sp3		60.06		47.83	4.00	1.00	

*L* – lungimea ampliconului, *T<sub>m</sub>* – temperatura de topire, *T<sub>a</sub>* – temperatura de aliniere optimă, stabilită experimental pentru *Taq* polimerază în tampon standard comercial (*Thermo Fisher Scientific*) cu concentrația primerilor 200 mM, *CG* – procentul bazelor azotate C și G, *A* – autocomplementaritate, *A<sub>1</sub>* – autocomplementaritate 3', *FASTA* – cifrul secvenței în baza de date GenBank

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Numele, prenumele

Grăjdieru Cristina

Semnătura



Data

31.08.2023

## CURRICULUM VITAE

### Date personale:

**Nume:** Grăjdieru

**Prenume:** Cristina

**Data nașterii:** 01.02.1990

**Cetățenia:** MD

**tel:** 060241122

**email:** [kgrejdieru@mail.ru](mailto:kgrejdieru@mail.ru)



### Studii superioare:

2009-2012 – Licență în Științe ale naturii, USM

2012-2014 – Master în Genetică moleculară

**Domenii de cercetare:** genetică generală, genetică vegetală, biologie moleculară

### Participare în proiecte de cercetare

#### **Proiecte instituționale:**

- Proiect național 15.817.05.10F. Tehnologii de diagnostic molecular al fitopatogenilor, 2015-2019 (executor);
- Proiect național în Programelor de stat 20.80009.5107.11 ”Conservarea *ex situ* de lungă durată a resurselor genetice vegetale în banca de gene cu utilizarea metodelor biologiei moleculare în testarea stării de sănătate a germoplasmei vegetale”, 2020-2023 (executor).

#### **Proiecte bilaterale:**

- Proiectul bilateral moldo-belarus cu cifrul 19.80013.51.07.10A/BL “Analiza complexă a acumulării micotoxinelor în produse alimentare pe parcursul depozitării”, 2019-2020, (executor);
- Proiect bilateral STCU-AȘM # 6225 (2017-2019) Monitoringul molecular al celor mai importante boli fungice și bacteriene în livezile de meri din Moldova (executor);
- Proiect bilateral STCU-AȘM #6378 (2018-2020) Elaborarea tehnicii noi de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă (executor);
- Proiect de cercetare comun AȘM-ASȘIIU (2017-2018) Diagnosticul maladiilor rădăcinii grâului (executor).

### Participări la manifestări științifice naționale și internaționale

1. Raport oral cu tema ”Identificarea agenților cauzali ai fuzariozelor în agroceenozele de porumb” la conferința națională cu participare internațională ”Știința în nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective” (ediția a șaptea), Bălți, 19-20 mai, 2023.
2. Raport oral cu tema ”Assessment of collection maize lines’ resistance to drought and diseases” la simpozionul internațional ”Advanced Biotechnologies - Achievements and Prospects” (VI<sup>th</sup> Edition), Chișinău, 3-4 octombrie 2022.

3. Raport oral cu tema "Molecular assessment of *F. graminearum* in several Moldavian maize genotypes" la conferința științifică națională cu participare internațională „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community”, Chișinău, 29-30 septembrie 2022.
4. Raport oral cu tema "Сравнительная оценка образцов коллекции кукурузы по устойчивости к болезням" la conferința științifică națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective” (ediția a șasea ), Bălți, 20-21 mai 2022.
5. Raport oral cu tema "Comparative analysis of accumulation of some toxigenic fungi in maize seed material during storage using real-time PCR" la conferința științifică națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: Probleme, Realizări, Perspective”, ediția V, 2021.
6. Raport oral cu tema "Quantitation of toxigenic *Aspergillus flavus* strains in maize seed material via conventional PCR" la a III-a Conferință Științifică Internațională „Tendințe în dezvoltarea agrofizicii: de la problemele actuale ale agriculturii și producției vegetale la tehnologiile viitorului”, SPb, Rusia, 2021.
7. Raport oral cu tema "Evaluation of toxigenic fungi content in maize seed material using real-time PCR" XI-lea Congres Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Chișinău, 2021.
8. Raport oral cu tema „Molecular identification of fumonisin-producing fungi in maize” la conferința științifică a Doctoranzilor "Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni Ale Tinerilor Cercetători, Chișinău, 2020.
9. Raport oral cu tema „Identification of mycotoxin-producing fungi from several fungal genera associated with maize” la Conferința științifică națională cu participare internațională „Știința În Nordul Republicii Moldova: Probleme, Realizări, Perspective”, 2020.

## **Publicații**

### **A. Publicații în reviste științifice**

#### **Publicații în reviste din Registrul Național al revistelor de profil**

1. TUMANOVA, L., GRĂJDIERU, C., MITIN, V., MITINA, I. Evaluarea rezistenței a plantelor de porumb la speciile de *Fusarium* prin metoda PCR. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*. 2023, nr. 1 (171), pp. 133-138. ISSN 1814-3237.
2. GRAJDIERU C., BILICI, E. Dynamics of maize pathogens from *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera in soil under weather conditions of Republic of Moldova. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*. 2023, nr. 1 (171), pp. 106-112. ISSN 1814-3237.
3. GRĂJDIERU C., BÎLICI, E. Evaluarea liniilor consangvinizate de porumb în baza rezistenței la fungi toxigenici din genurile *Fusarium* și *Aspergillus*. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*. 2022, nr. 1(151), pp. 35-41. ISSN 1814-3237.
4. GRĂJDIERU, C. Poisson distribution-based conventional PCR protocol for quantification of pathogenic fungi in maize. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2021, nr. 2(344), pp. 92-97. ISSN 1857-064X.

## B. Publicații în culegeri ale manifestărilor științifice

### Publicații în culegeri ale manifestărilor științifice internaționale

1. TUMANOVA, L., **GRAJDIERU, C.**, MITINA, I., MITIN, V. Evaluation of toxigenic fungi content in maize seed material using real-time PCR. In: *XI<sup>th</sup> International congress of geneticists and breeders from the Republic of Moldova*, Chisinau, Republic of Moldova, June 15-16, 2021: abstr. book. Chisinau, 2021, p. 119. ISBN 978-9975-152-13-6.
2. MITINA, I, TUMANOVA, L, MITIN, V, **GRAJDIERU, C.** The dynamics of potential mycotoxin producing fungi in corn samples during storage. In: *Modern technologies in the food industry : materialele conf. șt. intern.*, Chișinău, 20-22 oct. 2022. Chișinău, 2022, p. 60. ISBN 978-9975-45-851-1.
3. BALICI, E, **GRAJDIERU, C.** Assessment of collection maize lines' resistance to drought and diseases. In: *Advanced biotechnologies – achievements and prospects : scientific international sympos.*, Chișinău, Republic of Moldova, 3-4 October, 2022 : abstr. book. 6th edition. Chișinău: Editura USM, 2022, pp. 256-258. ISBN 978-9975-159-81-4
4. **GRAJDIERU, C.** Molecular identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains in maize seed-material. In: *Protecția plantelor – realizări și perspective : simpoz. șt. internațional*, Chișinău, 27-28 oct. 2020. Chișinău: S. n., 2020 (Tipogr. "Căpățână Print"), pp. 268-271. ISBN 978-9975-3472-0-4.
5. **GRAJDIERU, C**, TUMANOVA L. Quantitation of toxigenic *Aspergillus flavus* strains in maize seed material via conventional PCR. В: *Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего: материалы 3-й междунар. науч. конф.*, Санкт-Петербург, Россия, 14-15 сент. 2021 г. Санкт-Петербург, 2021, с. 255-258. ISBN 978-5-905200-46-5.

### Publicații în culegeri ale manifestărilor științifice naționale

1. **GRAJDIERU, C.** Molecular identification of fumonisin-producing fungi in maize. În: *Tendențe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători : materialele conf. șt. a doctoranzilor*, Chișinău, 15 iun. 2020. Ed. a 9-a. Chișinău, 2020, vol. 1, pp. 199-204. ISBN 978- 9975-108-66-9.
2. **GRAJDIERU, C.** Molecular assessment of *F. graminearum* in several moldavian maize genotypes. In: *Life Sciences in the dialogue of generations : National conf. with international participation*, Chisinau, 29-30 Sept. 2022 : abstr. book. Chisinau, 2022, p. 44. ISBN 978-9975-159-80-7.
3. BALICI, E., **GRAJDIERU, C.** Evaluation of resistance to toxigenic fungi in several maize inbred lines. In: *Life sciences in the dialogue of generations : national conf. with international participation*, Chisinau, 29-30 Sept. 2022. Chisinau, 2022, p. 24. ISBN 978-9975-159-80-7
4. **GRAJDIERU, C.**, TUMANOVA L., MITINA, I., MITIN V. Comparative analysis of accumulation of some toxigenic fungi in maize seed material during storage using real-time PCR In: *Știința în nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective: materialele conf. șt. naț. cu participare intern.*, Bălți, 29-30 iun. 2021. Ed. a 5-a. Bălți, 2021, pp. 54-57. ISBN 978-9975-62-432-9.
5. TUMANOVA, L., **GRAJDIERU, C.**, MITIN, V., MITINA, I. Identification of mycotoxin- producing fungi from several fungal genera associated with maize. În: *Știința*

*în nordul Republicii Moldova: probleme, realizări, perspective: materialele conf. șt. naț. cu participare intern., Bălți, 26-27 iun. 2020. Ed. a 4-a. Bălți, 2020, pp. 114-117. ISBN 978-9975-3382-6-4.*