

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 (*ZEА MAYS L.*)
REZISTENTE LA UNII PATOGENI FUNGICI**

162. 01. Genetica vegetală

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Chișinău, 2024

Teza a fost elaborată în cadrul laboratorului Genetică moleculară Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor Universității de Stat din Moldova.

Conducător științific –

TUMANOVA Lidia doctor în științe chimice, conferențiar-cercetător, Universitatea de Stat din Moldova

Componenta Comisiei de Doctorat:

DUCA Maria academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, Universitatea de Stat din Moldova – *președinte*

TUMANOVA Lidia doctor în științe chimice, conferențiar cercetător, Universitatea de Stat din Moldova – *conducător de doctorat*

LUPAȘCU Galina doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, Universitatea de Stat din Moldova – *referent*

COMAROVA Galina doctor în științe biologice, conferențiar universitar, Universitatea Tehnică a Moldovei – *referent*

CEPOI Liliana doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, Universitatea Tehnică a Moldovei – *referent*

Susținerea va avea loc la 30.04.2024, ora 10⁰⁰ în cadrul Ședinței Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat din cadrul Școlii Doctorale Științe ale Naturii, USM. Sediul – Universitatea de Stat din Moldova (<http://www.usm.md>), str. M. Kogălniceanu 65 A, blocul 3, sala 332, MD-2009, Chișinău, Moldova.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate în Biblioteca Națională a Republicii Moldova, Biblioteca Științifică Centrală "Andrei Lupan" (Institut), Biblioteca Centrală a Universității de Stat din Moldova (MD 2009, mun. Chișinău, str. Alexei Mateevici 60), pe pagina web a ANACEC (<http://www.cnaa.md>) și pe pagina web a USM (<http://www.usm.md>).

Rezumatul a fost expediat la data 26.03.2024.

Președintele Comisiei de Doctorat

academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

DUCA Maria

Conducător științific

doctor în științe chimice, conferențiar cercetător

TUMANOVA Lidia

Autor:

GRĂJDIERU Cristina

CUPRINS

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	3
CONȚINUTUL TEZEI	7
Introducere	7
Capitolul I. PRINCIPALELE BOLI FUNGICE LA PORUMB: AGENȚI CAUZALI, PATOGENEZA ȘI BAZELE MOLECULARE ALE REZISTENȚEI PLANTELOR.....	7
Capitolul II. MATERIALE ȘI METODE.....	7
Capitolul III. TESTAREA PRIMERILOR ȘI OPTIMIZAREA PROTOCOALELOR PCR PENTRU ANALIZA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A FUNGILOR PATOGENICI ÎN MOSTRE DE MATERIAL VEGETAL ȘI SOL.....	8
Capitolul IV. IMPACTUL FACTORILOR DE MEDIU ȘI A GENOTIPULUI ASUPRA RATEI DE ACUMULARE A PATOGENILOR FUNGICI ÎN PLANTE DE PORUMB.....	11
Concluzii și recomandări.....	25
Bibliografie.....	27
Lista publicațiilor autorului la tema tezei.....	28
Adnotare (în română).....	29
Adnorate (în engleză).....	30
Adnotare (în rusă)	31

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. Porumbul este una dintre cele trei culturi cerealiere care satisfac nevoile alimentare ale omului pe plan mondial. Ținând cont de proprietățile sale nutritive valoroase și domeniul versatil de utilizare, rămâne subiectul multor programe de ameliorare care se concentrează în principal pe obținerea de genotipuri care cuprind productivitate ridicată și rezistență la stresul biotic și abiotic [1-3]. Cultivarea porumbului se confruntă cu mai multe obstacole care reduc randamentul și calitatea recoltei. Printre ele sunt menționate afecțiunile fungice, îndeosebi cele provocate de fungii din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*. Aceste trei genuri includ atât specii înalt patogene și agresive (*F. graminearum*, *F. verticillioides*), care provoacă bolile sistemice la plante pe parcursul vegetației, cât și așa numiți patogeni minori – fungi, care de sine stătător rar induc infecții sistemice și sunt asociate cu deteriorarea boabelor pe parcursul depozitării [4-6]. Aceste trei genuri includ majoritatea speciilor producătoare 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, neurotoxicitate [7-9]. 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 fungilor patogeni asupra acestei culturi, printre care rotația culturilor, aplicarea pesticidelor eficiente, compozițiilor fiziologic active, agenți de control biologic și multe altele. Cu toate acestea nu există indicii despre diminuarea zonelor de invazie cu *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*, în timp ce micotoxinele rămân un pericol emergent la nivel mondial. Astfel, există necesitatea de a elabora procedee de reducere a riscurilor asociate cu infectarea porumbului cu fungii din genurile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* și contaminarea cu micotoxine.

Realizări actuale în domeniul cercetării. Din punctul de vedere al conservării biodiversității, reducerii contaminării mediului cu pesticide, precum și al obținerii de produse alimentare ecologice, este rezonabil să se cultive genotipuri de porumb rezistente la fungi, inclusiv la cei toxigenici. Însă până în prezent, genele *R* care determină rezistența absolută a porumbului la fungii *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* nu au fost descoperite, și piața agricolă nu dispune de genotipuri de porumb cu rezistență absolută la acești patogeni [10]. Ratele diferite de infectare a porumbului cu fungii numiți și sunt asociate cu un număr mare de QTL. Fiecare dintre acești loci are o contribuție nesemnificativă la formarea rezistenței, ei sunt diseminați neuniform între populațiile geografice de porumb, activează în ansamblu, sunt puternic influențați de factorii de mediu și au moștenire complexă [11,12]. Toate acestea

împiedică identificarea genotipurilor rezistente doar în baza screening-ului molecular. Ca urmare, alegerea plantelor de interes se poate efectua prin testări în câmp cu ajutorul metodelor veridice și robuste de evaluare a gradului de rezistență a gazdei la fungi. Reieșind din faptul, că mecanismele de rezistență la fitopatogeni (induse sau constitutive) au ca scop prevenirea pătrunderii acestora în planta gazdă sau suprimarea creșterii și dezvoltării lor, se poate concluziona despre gradul de sensibilitate a genotipurilor de porumb la infecțiile fungice utilizând ca indice ratele de infectare și/sau cantitatea agenților patogeni în țesuturile vegetale. Acest procedeu presupune identificarea precisă a speciei dăunătoare și conținutului de agenți patogeni în organele plantelor. Realizarea lui este efectuată 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 limitată de unele dificultăți: mulți fitopatogeni provoacă simptome similare, iar manifestarea acestora poate să difere în dependență de factorii de mediu, faza de vegetație și starea fiziologică a plantei; la etapele inițiale ale procesului infecțios boala 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 contaminării, iar unele specii de fitopatogeni au caractere morfologice și biochimice similare și nu sporulează pe medii nutritive. Mai mult, tulpinile de fungi producătoare de micotoxine nu pot fi discriminate de tulpinile netoxigenice numai după trăsăturile morfologice. Dificultățile menționate mai sus sunt depășite prin utilizarea metodelor moleculare. Metoda PCR se bazează pe utilizarea secvențelor genomice ca markeri moleculari pentru identificarea fungilor. În prezent, baza de date GenBank oferă o cantitate semnificativă de secvențe genomice, care permit identificarea fungilor 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, și în mai multe cazuri nu necesită cultivarea fungilor pe medii artificiale. La rândul său, evoluția rapidă a fungilor necesită permanent analiza secvențelor genomice, identificarea markerilor, elaborarea primerilor și optimizarea protocoalelor PCR pentru diagnosticul molecular al fungilor patogene și estimarea gradului de susceptibilitate a porumbului la agenții cauzali ai bolilor infecțioase și acumularea micotoxinelor în țesuturi.

Scopul lucrării: elaborarea metodelor 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 fungi din genurile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Obiective de bază:

- 1) testarea primerilor elaborați *de novo* în baza secvențelor genelor de menaj și a clusterilor de gene din genomul fungic care codifică enzime implicate în căile de biosinteză ale diferitelor clase de micotoxine;
- 2) elaborarea și optimizarea protocoalelor end-point PCR și real-time PCR pentru analiza calitativă, semicantitativă și cantitativă a fungilor în organele plantelor de porumb; analiza stării fitosanitare a câmpurilor și germoplasmei de porumb stocate în Banca de gene a IGFPP;
- 3) identificarea genotipurilor de interes din colecția activă a IGFPP în scopul utilizării acestora în programe naționale de ameliorare a rezistenței porumbului la boli fungice.

Metodologia. Analizele calitative și cantitative a fungilor în materialul biologic s-au efectuat cu ajutorul metodelor nested-PCR, real-time PCR. Analizele calitative și cantitative a principalelor clase de micotoxine s-au efectuat cu ajutorul kit-urilor comerciale ELISA (Elabscience).

Ipoteza de cercetare. Combaterea bolilor sistemice la plante se bazează pe acțiunea factorilor 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 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 agricole 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 fungi din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* utilizând teste pe bază de PCR. Obiectivele atinse au contribuit la lărgirea cunoștințelor științifice și tehnologice privind diseminarea și evaluarea fungilor 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 fungi patogene și toxigene, precum și subdiviziuni științifice specializate în domeniile de microbiologie, ecologie și fitopatologie a plantelor.

Structura și volumul tezei. Teza constă din 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 proprie răspundere, CV-ul candidatului.

Diseminarea rezultatelor. Rezultatele cercetărilor au fost expuse în 20 lucrări științifice, dintre care 3 au fost publicate în reviste indexate în baze de date acceptate de ANACEC: 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; 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; 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. Două articole au fost publicate reviste din Registrul Național al revistelor de profil (categoria B): Monitoring of *Penicillium* infection during eggplant ontogenesis. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2022, nr.3 (343), pp. 48-53; 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. Două articole au fost publicate în culegerile conferințelor internaționale: Identificarea moleculară a fitopatogenilor a porumbului la faza generativă de dezvoltare a plantelor. În: materiale conferinței internaționale ”Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего” (ediția a IV-a), 13-15 septembrie 2023, Sankt-Petersburg. Sankt-Petersburg: ARI, 2023, pp. 39-44; 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. Datele experimentale au fost prezentate în comunicări orale la manifestări științifice, dintre care 5 au fost internaționale: Simpozionul științific internațional „Protecția plantelor – realizări și perspective”, 2-3 octombrie 2023, Chișinău; Conferința internațională ”Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего” (ediția IV), 13-15 septembrie 2023, Sankt-Petersburg; Simpozionul internațional ”Advanced Biotechnologies – Achievements and Prospects” (VIth Edition), 3-4 octombrie 2022, Chișinău; Conferința internațională ”Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего”, (ediția III), 14-15 septembrie 2021, Sankt-Petersburg; Simpozionul internațional ”Protecția plantelor – realizări și perspective”, 27-28 octombrie 2020, Chișinău.

Implementarea rezultatelor științifice. 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 procedeeleor de reducere a contaminării vinului cu microorganisme și metabolizării acestora (proiect moldo-turc 23.80013.5107.4TR). 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).

CONȚINUTUL TEZEI

Introducerea reflectă importanța temei abordate, scopul și obiectivele, relevanța teoretică și practică a rezultatelor obținute, sinteza capitolelor și diseminarea rezultatelor.

Capitolul I. PRINCIPALELE BOLI FUNGICE LA PORUMB: AGENȚI CAUZALI, PATOGENEZA ȘI BAZELE MOLECULARE ALE REZISTENȚEI PLANTELOR

Generalizează informația despre ecologia și impactul economic al fungilor din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium* asupra culturii de porumb. Sunt descriși principalii patogeni care induc bolile sistemice la porumb pe parcursul vegetației și cele mai răspândite specii de fungi care provoacă deteriorarea boabelor pe parcursul depozitării. Sunt numite principalele clase de micotoxine produse de unele specii de fungi filamentoși ce aparțin genurilor numite, efectul lor fiziologic, bazele legislative ce reglementează concentrațiile admisibile de micotoxine în produsele alimentare. Se descriu bazele moleculare ale rezistenței porumbului la principalii agenți cauzali ai bolilor fungice și acumularea unor clase de micotoxine.

Capitolul II. MATERIALE ȘI METODE

În studiul au fost folosite genotipurile de porumb din colecția activă IGFP: 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 IGFP în perioada 2019-2022 cu respectarea procedeeleor agrotehnice pentru cultura dată. Solul a fost colectat de pe loturile experimentale plantate cu porumb la sfârșitul sezonului de vegetație. Extragerea ADN-lui s-a efectuat prin metoda elaborată în baza unor protocoale validate de extragere a acizilor nucleici cu utilizarea soluțiilor-tampon SDS și CTAB [13-15]. Identificarea fungilor s-a efectuat prin metoda multiplex-PCR,

nested-PCR, real-time PCR cu set de primeri specifici elaborați *de novo* în cadrul laboratorului Genetică moleculară. Identificarea și cuantificarea micotoxinelor (aflatoxine, fumonisine, zearalona, deoxinivalenola, toxina T-2) s-a efectuat cu ajutorul metodei ELISA cu kituri comerciale (Elabscience). Analiza polimorfismului genetic ai genotipurilor de porumb s-a efectuat cu primerii derivați din secvențele elementelor mobile ale genomului vegetal, eficacitatea acestora a fost evaluată cu ajutorul principalelor descriptori: PIC, puterea de rezoluție R, rata de multiplexare efectivă E, indicele markerului MI, puterea de discriminare D. Analiza statistică a datelor obținute s-a efectuat în baza testelor Levene, Shapiro-Wilk, ANOVA, coeficientul Pearson. Clusterizarea s-a efectuat prin algoritmul UPGMA, coeficientul optim a fost ales în baza evaluării matricelor cofenetice. Pentru efectuarea analizelor statistice și organizarea datelor s-au utilizat aplicațiile SOFT GelAnalyzer, Microsoft Office 2013, POPGENE ver. 1.32, GIMP ver. 2.10.24, Primer3 ver. 4.1.0.

Capitolul III. TESTAREA PRIMERILOR ȘI OPTIMIZAREA PROTOCOALELOR PCR PENTRU ANALIZA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A FUNGILOR PATOGENICI ÎN MOSTRE DE MATERIAL VEGETAL ȘI SOL

Metoda de extragere a ADN-lui propusă în cadrul studiului dat a permis obținerea ADN-lui total cu un randament de cca 80-100 ng/μl și puritate destul de înaltă pentru efectuarea analizelor nested-PCR și qPCR (Fig.3.1). În același timp, în procesul de extragere nu se folosesc reagenți cu toxicitate înaltă (fenol) și enzime costisitoare (proteinaza K), iar separarea proteinelor se face prin coagularea cu ajutorul soluției de CH₃COONH₄ 7.5 M la temperaturi scăzute.

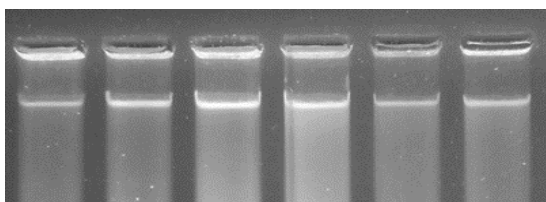


Fig.3.1. Electroforegrama mostrelor de ADN total extras din boabe de porumb prin metoda combinată SDS-CTAB

Evaluarea specificității primerilor s-a efectuat prin analiza BLAST și amplificări experimentale cu optimizarea parametrilor de aliniere, elongare, numărului de cicluri și cantității ADN-lui matrice. Obținerea ampliconului de mărime prognozată și lipsa sintezei de produși nespecifici definesc reacția nested-PCR reușită (Fig.3.2). Primerii au demonstrat specificitate înaltă în diapazonul de aliniere 57-60°C, protocolul nested-PCR a inclus 30 de cicluri în fiecare rundă și cca 10 ng de ADN-matrice.

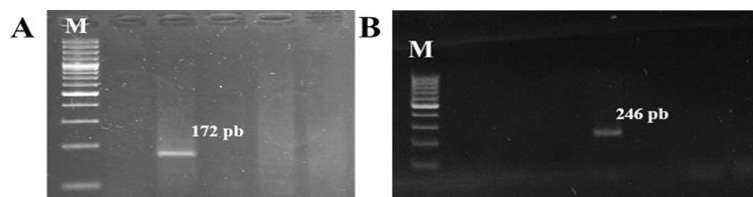


Fig. 3.2. Electroforegrama ampliconilor obținuți în urma PCR cu primerii pchbt1-pchbt4 și pchbt2-pchbt3 (A), pch2-pch3 (B). M – marker molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific

Optimizarea protocolului qPCR s-a efectuat în baza analizei curbelor de amplificare și disociere (Fig.3.3). Curba de amplificare prezintă dependența valorilor fluorescenței relative (RFU) de numărul de cicluri PCR. Acumularea signalului fluorescent determină reacția pozitivă. Lipsa ADN-ului de interes în mixul 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 cantității, lungimii și structurii ampliconului obținut. Se observă, că curbele de amplificare pentru perechea de primeri mqtri11sp7- mqtri11sp8 specifici genei *TR111* (*Fusarium spp.*) asociată cu sinteza DON și T-2 în 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.

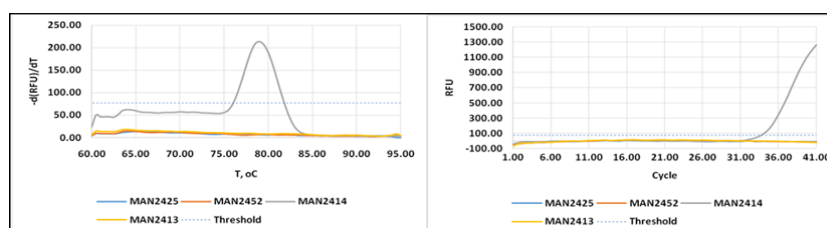


Fig.3.3. Curbele de disociere (stânga) și amplificare (dreapta) ale fragmentelor obținute în PCR în timp real folosind perechea de primeri mqtri11sp7-mqtri11sp8 la gena *TR111* (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței)

Eficacitatea reacției qPCR a fost evaluată pe baza unei singure reacții. Analiza presupune evaluarea dinamicii schimbării valorilor RFU în timpul amplificării folosind diferite abordări matematice. În lucrarea curentă, se utilizează următorul procedeu:

- Sunt derivați logaritmi valorilor RFU într-o reacție la baza 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.

- 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.

Eficacitatea a variat între 96-108% și, prin urmare, se potrivește intervalului de amplificare dorit de 90-110%. Datele obținute demonstrează că polimeraza Taq funcționează la capacitate aproape maximă, iar interferența factorilor secundari la acumularea produsului final este nesemnificativă.

S-a demonstrat veridicitatea de utilizare a valorilor C_q , C_q normalizate și nested-PCR în baza diluțiilor seriale pentru analiza semicantitativă a agenților patogeni în probă și estimarea gradului de susceptibilitate a genotipurilor de porumb la infecțiile fungice [16]. A fost elaborat și testat procedeul de cuantificare a fungilor patogene în baza reacției PCR convențională, care abordează principiul metodei digital-droplet-PCR. 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 ale secvenței-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:

$$m = -n * \ln(E)$$

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

Pentru analiză au fost utilizate mostre de ADN total extras din boabele genotipurilor CP137 și CP148 și primerii pentru identificarea fungilor *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 secvenței de interes. Rezultatele obținute au fost comparate cu valorile C_q obținute prin qPCR calculate pentru aceleași mostre cu aceleași primeri și reprezentate grafic pe diagrama Bland-Altman (Fig.3.4).

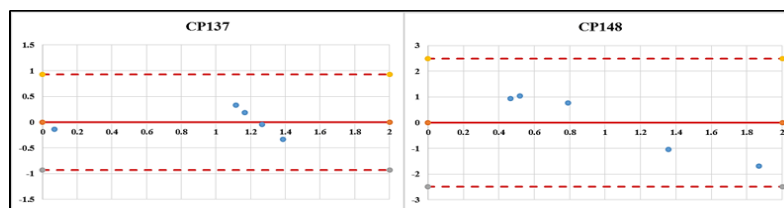


Fig.3.4. Diagrama Bland-Altman a numărului de copii de gene implicate în sinteza aflatoxinelor în *Aspergillus spp.* pentru genotipurile CP137 și CP148 obținute în urma end-point PCR cu aplicarea distribuției Poisson și valorilor Cq normalizate la secvența 18S

Astfel, PCR convențională cu aplicarea distribuției Poisson poate fi utilizată în anumite cazuri ca alternativă a reacției qPCR. Avantajele acestui procedeu constă 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.

Capitolul IV. IMPACTUL FACTORILOR DE MEDIU ȘI A GENOTIPULUI ASUPRA RATEI DE ACUMULARE A PATOGENILOR FUNGICI ÎN PLANTELE DE PORUMB

Starea fitosanitară a câmpurilor de porumb. Monitoringul stării fitosanitare a câmpurilor de porumb este necesar pentru prognozarea diseminării infecției fungice și luarea măsurilor preventive înainte de semănat și depozitare. Propagarea fungilor este influențată în mod semnificativ de factorii abiotici ai mediului înconjurător, dintre care temperatura aerului și cantitatea de precipitații 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 parametrul respectiv. 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. Cele mai mici cantități de precipitații au fost înregistrate în lunile aprilie și august 2020, mai și iunie 2022.

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*[19]. Astfel, în sol au fost prezente speciile asociate cu bolile infecțioase și deteriorarea roadei la porumb. Majoritatea microorganismelor detectate au fost reprezentate de fungi toxigenici, identificați în baza secvențelor genomice implicate în căile

biosintetice a principalelor clase de micotoxine. Cantitatea fungilor în mostrele analizate a variat în dependență de specie și anul colectării. Analiza cantitativă a demonstrat, că cele mai abundente microorganisme au aparținut genului *Aspergillus*, urmate de *Penicillium spp.* Speciile de *Fusarium* au fost prezente în cantități mai mici (Fig.4.1). Condițiile anului au afectat neuniform dinamica cantității fungilor în sol, nu s-a stabilit o concordanță între patogenitatea fungilor și acumularea în sol a acestora.

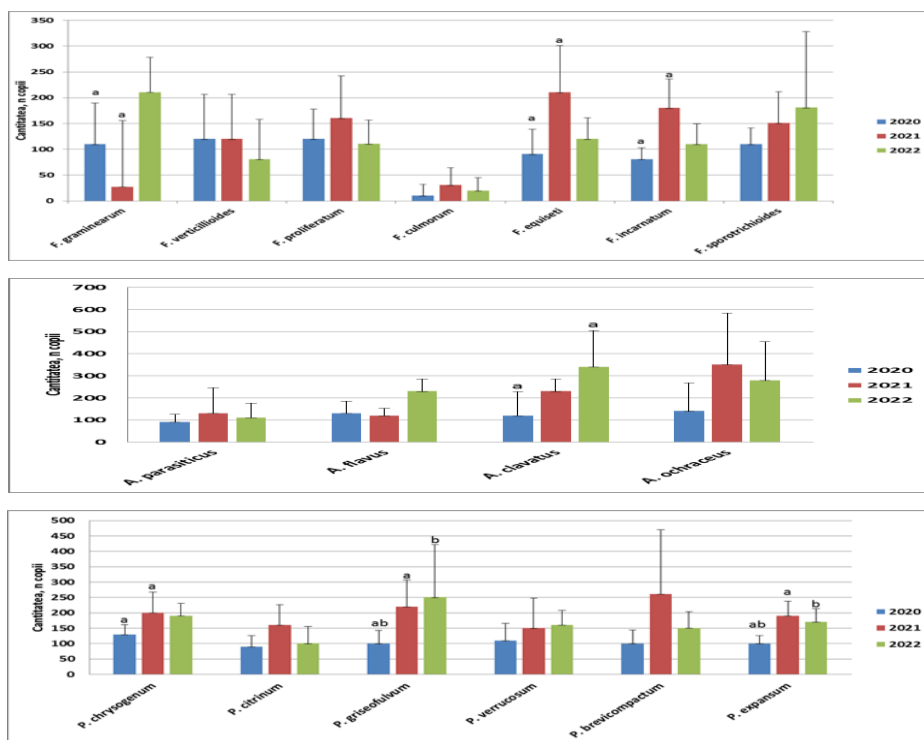


Fig.4.1. Cantitățile medii de fungi în sol (număr de copii pe 100 mg de sol). Literele indică valorile care au variat semnificativ la $p < 0.05$

Spre deosebire de sol, *F. culmorum* a fost absent atât în mostrele de material vegetal pe parcursul întregii perioade de vegetație. Factorii de mediu au influențat mai semnificativ cantitatea fungilor în organele vegetale, îndeosebi în frunze care sunt mai puternic expuse factorilor mediului înconjurător comparativ cu boabele. 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 pentru *F. incarnatum* și *F. sporotrichioides* a fost mai mică (Fig.4.2). În boabele cantitățile de *F. graminearum* și *F. verticillioides* au fost similare, iar rata de infestare nu a depășit 35%. Cel mai abundent a fost *F. proliferatum*, identificat în boabe în cantități mai mari pe parcursul anului 2020, când condițiile au fost nefavorabile. Printre agenții cauzali minori ai fuzariozei cel mai abundent a fost *F. equiseti*, urmat de *F. sporotrichioides*. Însă în anul 2022 se observa o rată ridicată a infestării

boabelor de porumb cu *F. incarnatum*, cantitățile căruia au atins nivelurile specifice pentru *F. equiseti*. 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. Factorii mediului înconjurător nu au afectat semnificativ acumularea de *A. flavus* și *A. parasiticus* în boabe. În frunze de porumb cele mai frecvente specii de *Penicillium* au fost *P. chrysogenum* și *P. expansum*, urmate de *P. citrinum* și *P. griseofulvum*. 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.

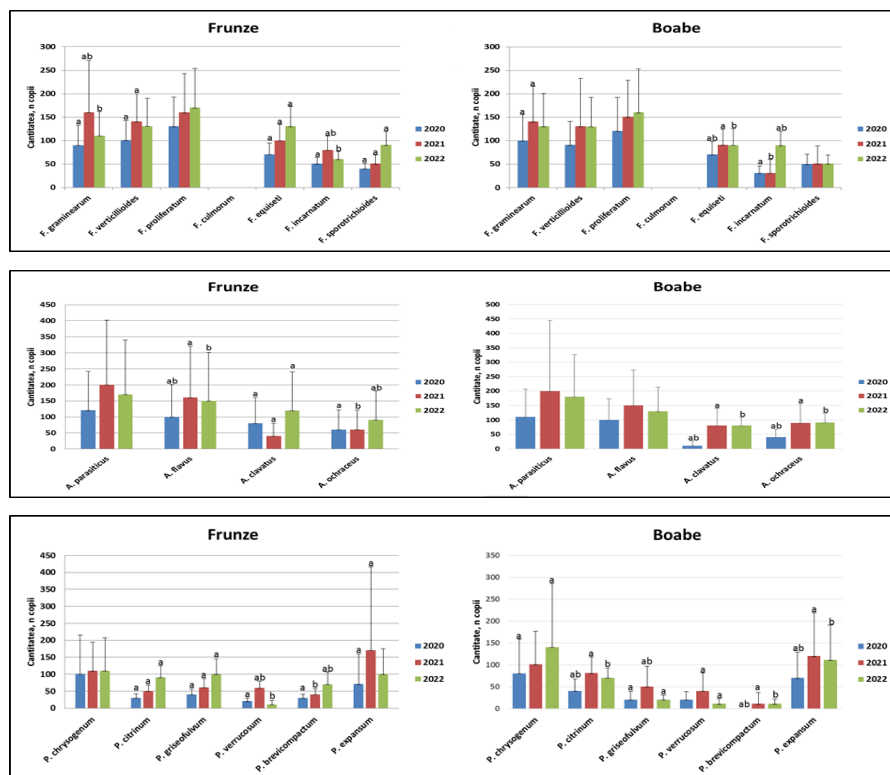


Fig.4.2. Cantitățile medii de fungi în frunze și boabe de porumb (număr de copii pe 100 mg de material vegetal). Literele indică valorile care au variat semnificativ la $p < .05$

Doar pentru *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *P. expansum* și *A. flavus* s-a stabilit o corelație puternică pozitivă dintre cantitatea fungilor în sol cu cea din boabe și frunze, ceea ce indică că solul este sursa primară de infectare a porumbului cu aceste specii. Pentru alte specii corelația dintre cantitatea fungilor în sol și organele plantelor a fost neuniformă. 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, infecțiile 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.

Identificarea fungilor toxigenici în materialului semincer depozitat în Banca de gene a IGFP. Unsprezece secvențe ale genomului fungic asociate cu producția de aflatoxine, fumonisine, zearalenonă, T-2 și DON din genurile *Aspergillus* și *Fusarium* au fost identificate și cuantificate în boabele de porumb depozitate în Banca de Gene a IGFP. Speciile de *Aspergillus* și *Penicillium* capabile să producă ocratoxina 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 toxigenică de fungi 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 fungi toxice au fost identificați în aproximativ 4% din probele analizate, în 8% s-a observat infecția mixtă cu 3, 5 și 6 tulpini, iar în aproximativ 21% din probe s-a observat infecția mixtă cu 4, 7 și 8 tulpini fungice toxigenice. 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. Fungii toxigenici 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%. Prezența în mătase a producătorilor de fumonisină și aflatoxină reprezintă un risc semnificativ pentru infecția boabelor și contaminarea ulterioară cu micotoxine, deoarece propagarea prin stigmată conferă agentului patogen capacitatea de a ignora bariera naturală a pănușilor de porumb. În plus, polenul în sine poate juca rolul de vector natural pentru diseminarea fungilor în lanurile de porumb în condiții de vreme uscată. 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.4.3). Cu toate acestea, dispersia valorilor Cq diferă 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* toxigenici, în timp ce 20,8% din probe au prezentat un conținut ridicat de *FUM6* specific pentru *F. proliferatum* toxigenic și *aflQ* specific pentru tulpinile de *A. flavus*

producătoare de aflatoxină. Doar câteva probe au arătat acumularea de secvențe *TR111* și *TR18* în concentrații scăzute. Cantitatea relativă de *F. equiseti* capabilă să producă zearalenonă a fost ne semnificativă.

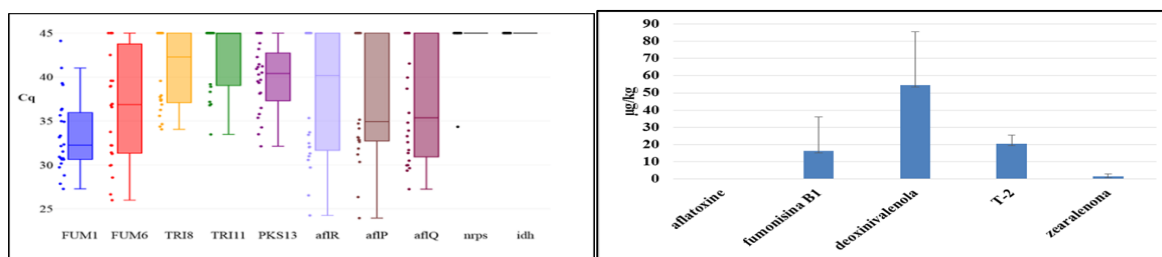


Fig. 4.3. Diagrama Boxplot a valorilor Cq medii ale genelor asociate cu producția de micotoxine în fungi (stânga). Concentrațiile medii ale aflatoxinelor, fumonisinelor, deoxinivalenolei, toxinei T-2 și zearalenonei în boabele de porumb după șase luni de depozitare, obținute prin testul ELISA (dreapta)

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 prin 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 măresc 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 fungilor producători 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 fungi care sunt capabile să producă micotoxine periculoase chiar și în condiții de secetă, care nu sunt favorabile înmulțirii fungilor. Cu toate acestea, dacă nu sunt respectate condiții stricte de depozitare, aceste fungi 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 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.

Impactul genotipului de porumb asupra propagării fungilor patogeni în organele vegetale. Umiditatea și apa liberă sunt critice pentru dezvoltarea fungilor. Astfel, parametrii morfofiziologici ai plantei asociate cu eliberarea rapidă a apei de către știuleți pot servi ca indici de rezistență constitutivă la fungi. 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.4.1). Perioada de înflorire-maturare arată cât timp trece de la apariția mățăsii până la maturitatea completă a bobului, iar cu cât această perioadă este mai scurtă, cu atât este mai mic riscul de infectare. Acoperirea completă, uniformă și groasă a inflorescenței cu pănuși salvează boabele subdezvoltate de infecții fungice, iar acoperirea parțială face știuletele susceptibil la fungi. 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 fungilor. În acest sens, parametrul menționat este strâns legat de raportul dintre lungimea știuletelui și a pănușilor – atunci când pănușile 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 scurți fac știuleții lipsite de apărare împotriva fitopatogenilor. În general, raportul optim este de 1:1, când pănușile și știuleții sunt de lungimi egale. 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 fungi.

Tabelul 4.1. Valorile unor indici morfofiziologici ale genotipurilor de porumb

	Perioada înflorire-maturare, zile*	Acoperirea știuleților cu pănuși**	Raportul dintre lungimile știuleților și pănușilor***	Diametrul știuletelui, mm	Rânduri de boabe pe știulete, n	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 știuleților până la maturitatea fiziologică a boabelor

** 1-7 puncte: 3 – acoperire nesatisfăcătoare, 5 – intermediară, 7 – bună

*** 1 – lungimea știuletelui depășește lungimea pănușilor, 2 – lungimea știuletelui și pănușilor sunt egale, 3 – știuletele este mai scurt decât pănușile

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 știuleților și pănușilor, diametrul mediu al știuletelui de 37,5 mm și o medie de 13,9 rânduri de boabe 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 știuleții. Alte linii au fost caracterizate printr-un interval mai scurt al perioadei de înflorire-maturare. Cei mai groși știuleți au fost observați la liniile MAN2452, MAN2308 și MAN526. Pentru alte genotipuri, acest parametru a fost ≤ 40 mm. Cei mai subțiri știuleți au fost înregistrate la 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.

Analiza moleculară a demonstrat, că în boabele de porumb mature au fost prezente speciile de fungi patogeni majori și fungi de depozitare din genurile *Fusarium*, *Aspergillus* și *Penicillium*, asociate cu bolile fungice și deteriorarea boabelor (Fig.4.4). Genotipurile studiate au

manifestat valori diferite ale frecvenței boabelor infectate cu fungi, și după acest parametru au fost evidențiate trei grupuri [21]: grupul I cu rata infectării <10% (rezistenți), grupul II –10-25% (toleranți), grupul III – rata infectării mai mare de 25% (susceptibili) [22,23].

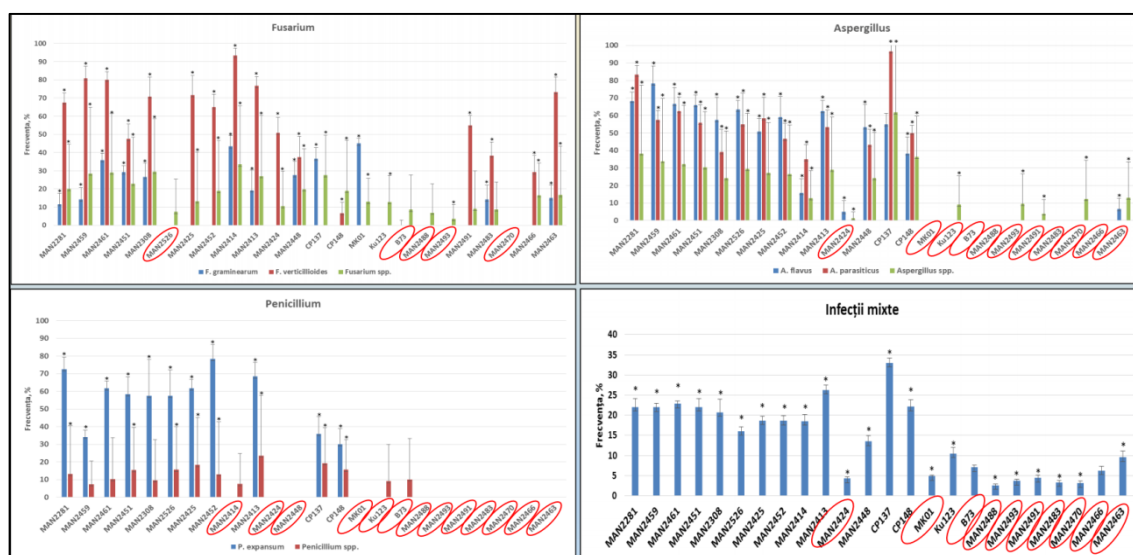


Fig.4.4. Frecvența boabelor de porumb infectate cu patogeni fungici. Asteriscul indică diferența semnificativă de valorile respective ale genotipului-standard la $p < .05$

Nu toate speciile de fungi identificate în sol și plante de pe câmpurile experimentale au fost identificate în mostrele celor 24 genotipuri luate în studiu. Cinci genotipuri au fost clasificate ca rezistenți la fuzarioze cauzate de mai multe specii de *Fusarium*, 9 s-au manifestat ca rezistenți la *F. verticillioides*, 12 – la *F. graminearum*. Din 24 de genotipuri, 11 au manifestat acumularea scăzută de *A. flavus* și *A. parasiticus*. Majoritatea genotipurilor a manifestat acumularea scăzută de fungii din *Penicillium*. După rata infecțiilor mixte, 10 genotipuri au manifestat rezistență la acumularea fungilor. Speciile *F. culmorum*, *A. clavatus*, *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum* și *P. verrucosum* au fost absente în mostrele genotipurilor analizate. Se observă, că genotipul standard s-a clasificat ca rezistent, în timp ce majoritatea liniilor consangvinizate au manifestat toleranță la patogenii fungici.

Evaluarea semicantitativă a acumulării fungilor în boabe a fost efectuată în baza valorilor Cq, iar genotipurile a fost repartizate în grupuri conform gradul de susceptibilitate, după cum urmează: $Cq \leq 29$ – susceptibilitate ridicată, $29 < Cq < 37$ – susceptibilitate medie, $Cq \geq 37$ – susceptibilitate scăzută (Tab.4.2). În cantități foarte mici au fost identificate *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, *A. ochraceus* și *P. brevicompactum*. Rata infectării plantei-gază 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 rate ale infectării cu patogenul dat statistic mai ridicate comparativ cu standardul, 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 ale unui agent cauzal al fuzariozei știuleților FER – *F. verticillioides*. Slab susceptibile la patogenul dat s-au dovedit a fi 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 fungii *F. incarnatum* a fost găsit în cantități semnificative în boabele unui singur genotip, soiul CP148.

Tabelul 4.2. Cantitatea relativă a agenților cauzali majori ai fuzariozelor și unor fungi asociați cu deteriorarea boabelor de porumb pe parcursul depozitării (date selective)

Fung	FG	FV	FP	AF	AP	Pct	PE
Genotip							
MAN2281	37.31	28.88	35.66	28.81	26.34	45.00	28.92
MAN2459	39.56	26.38	28.21	28.35	31.86	39.15	36.02
MAN2461	35.58	27.51	31.34	29.88	30.34	45.00	31.39
MAN2451	37.46	33.75	31.36	30.90	32.62	36.45	31.07
MAN2308	37.44	28.02	32.86	31.94	34.15	45.00	30.21
MAN2526	45.00	45.00	32.35	30.65	31.19	34.66	32.01
MAN2425	45.00	27.63	40.90	32.87	32.83	34.81	31.11
MAN2452	45.00	30.42	33.17	32.16	33.14	45.00	28.68
MAN2414	34.05	25.47	36.41	38.95	35.15	34.63	45.00
MAN2413	37.75	28.01	30.99	30.24	32.83	29.46	29.85
MAN2424	45.00	33.71	39.39	40.78	45.00	45.00	45.00
MAN2448	37.91	35.06	31.19	32.14	34.70	45.00	45.00
CP137	36.87	45.00	31.55	31.28	23.95	34.51	35.01
CP148	45.00	40.02	45.00	34.38	33.09	37.56	36.31
MK01	34.36	45.00	45.00	42.69	45.00	45.00	45.00
Ku123	45.00	45.00	38.37	41.62	45.00	31.68	45.00
B73	45.00	45.00	37.98	45.00	45.00	30.54	45.00
MAN2488	45.00	45.00	34.14	45.00	45.00	45.00	45.00
MAN2493	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
MAN2483	38.31	34.16	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
MAN2466	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
MAN2463	38.19	28.57	45.00	39.73	45.00	45.00	39.30

FG – *F. graminearum*; FV – *F. verticillioides*; FP – *F. proliferatum*; AF – *A. flavus*; AP – *A. parasiticus*; Pct – *P. citrinum*; PE – *P. expansum*

Valorile $Cq \leq 29$ indică cantitate relativă înaltă de ADN (roșu); $30 < Cq < 37$ – cantitate relativă medie (galben); $Cq \geq 37$ – cantitate relativă joasă sau absența patogenului (verde)

Pentru speciile de fungi identificați cu mai multe perechi de primeri sunt date valorile medii Cq

Un alt agent patogen, *F. sporotrichioides*, a fost găsit doar în boabele CP137 și Ku123, dar în cantități mici, lipsind în mostrele de boabe ale altor genotipuri și liniei-standard B73. Două specii importante de fungi din genul *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*), 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 fungi. 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 fungi din genul *Aspergillus*. În comparație cu fungii din genurile *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 fungii *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 cel 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 fungi patogeni - 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 cauzali principali ai fuzarierei știuleților 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 a fost diferită în genotipurile de porumb analizate. În boabele analizate au fost identificate concomitent circa 5 secvențe fungice diferite asociate cu sinteza diferitelor micotoxine. Cea mai mare diversitate de secvențe ale clusterilor toxigenici 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 fost 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 cu *Aspergillus* toxigenic - 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 Cq ale secvențelor *TRI* au fost calculate pentru MAN2461, MAN2414, CP137 și MK01. Cea mai abundentă a fost secvența genei *TRI8*, în timp ce secvența *TR11* 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. Prin urmare, toate probele de boabe depozitate în Banca de Gene a IGFPP au fost infestate cu diferiți fungi toxigenici capabili 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.

Analiza polimorfismului genetic ale genotipurilor studiate s-a efectuat cu ajutorul primerilor la markerii genomici din clasa elementelor mobile (Fig.4.5).

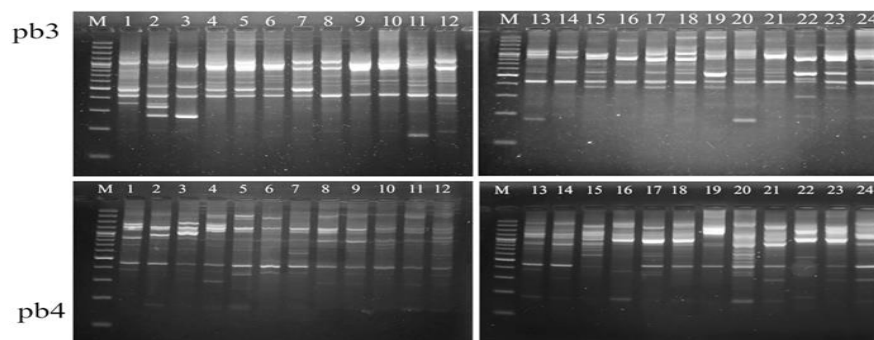


Fig.4.5. Exemplu de profiluri genetice generate în urma amplificării ADN-lui de porumb cu primerul pb3 și pb4: 1 – CP137, 2 – CP148, 3 – B73, 4 – Ku123, 5 – MK01, 6 – MAN2526, 7 – MAN2448, 8 – MAN2459, 9 – MAN2413, 10 – MAN2466, 11 – MAN2451, 12 – MAN2463, 13 – MAN2452, 14 – MAN2461, 15 – MAN2488, 16 – 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

Acești markeri sunt dominanți, universali și se deosebesc prin reproductibilitate înaltă. Din primerii 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. Benzile specifice, generate de primerii în baza elementelor mobile, prezintă interes ca sursă de informație genomică pentru elaborarea sistemelor de markeri de caractere de interes ale porumbului. Primerii au generat paterne distincte și reproductibile (2-3 repetiții) cu valoarea medie PIC de 0.45 – aproape maximă pentru markerii dominanți (Tab. 4.3). 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 a indicelui markerului – 8.21. De asemenea, performanță înaltă a fost manifestată de primerul pb5. Deși această secvență nu a generat ampliconi specifici, rata înaltă de polimorfism a permis obținerea patternilor 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 posibilă generarea mai multor patterni de amplificare specifici 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 a indicelui markerului MI.

Tabelul 4.3. Valorile descriptorilor esențiali 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 _a	1.95	2	2	1.9	2	2	1.98
n _e	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 – numărul total de benzi; *NM* – benzi monomorfe; *NP* – benzi polimorfe; *NS* – benzi specifice; *Z* – numărul 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_a* – numărul de alele observate; *n_e* – 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 cofenetic cel mai înalt – 0.76) prin metoda UPGMA (Fig.4.6). 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 patternilor 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. Aceste genotipuri au manifestat rate scăzute de acumulare ale ADN-ului 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.

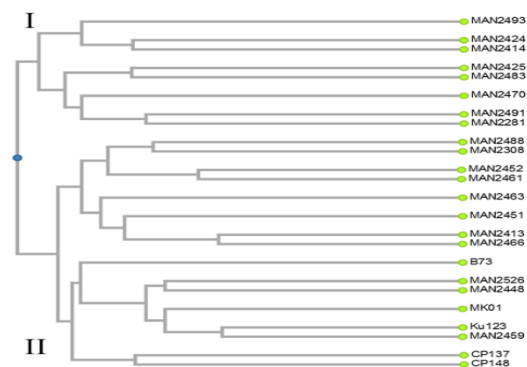


Fig.4.6. Clusterizarea UPGMA a genotipurilor de porumb în baza polimorfismului genetic

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 cele tolerante și susceptibile. 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 caracterele de interes (Fig.4.7). Gruparea genotipurilor s-a efectuat după caracterele de variație genetică, indicii morfofiziologici asociați cu rezistență la infecții fungice, ratele de infectare cu speciile de patogeni fungici din genurile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. La fel, s-a efectuat clusterizarea după multiple caractere: combinația dintre variația genetică și indicii morfofiziologici, variația genetică și rata de infectare a boabelor de porumb cu patogeni fungici, variația genetică suprapusă cu indicii morfofiziologici și rata de infectarea a boabelor cu patogeni fungici. În fiecare caz s-au observat două clustere neuniforme și repartizarea genotipurilor în subclustere în dependență de parametru ales.

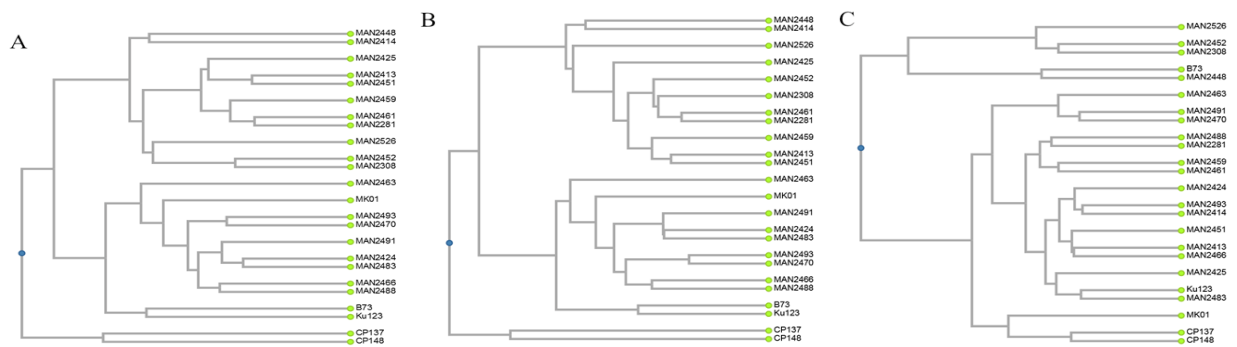


Fig. 4.7. Dendrogramele asocierii genotipurilor de porumb în baza de genetică suprapusă cu indici morfofiziologici și rata de infectare a boabelor cu patogeni fungici (A), variație genetică și rata de infectare a boabelor de porumb cu patogeni fungici (B), combinație dintre variație genetică și indici 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 repartizate într-un cluster după toți trei parametri de grupare. Genotipurile MAN2448 și MAN2414 de asemenea se grupează împreună după acești parametri, la fel ca și Ku123-B73. Gruparea după trei parametri enumerați și combinația polimorfism genetic-rata de acumulare a patogenilor în boabe evidențiază 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 liniile de porumb analizate.

Concluzii și recomandări

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

1. Protocolul de analiză în baza metodelor moleculare a fost eficient 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 boabelor 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 diluțiilor consecutive au permis cuantificarea 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 *Fusariums pp.*, *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 IGFPP. Principalii agenți cauzali ai fuzariozelor, 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 la plante de porumb au fost mai semnificativ afectate de fluctuațiile factorilor mediului extern. Pentru fungi care fac parte din microbiota solului nu a fost stabilită o corelație specifică între sensibilitatea lor la temperatura aerului și fluctuațiile umidității și particularitățile lor 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 în 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 unui 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 specializate care activează în domeniile controlului fitosanitar, fitopatologiei și micologiei.

2. Utilizarea procedeele de diagnostic molecular expuse în teză pentru pregătirea practică a studenților în cadrul disciplinelor de genetică, biologie moleculară, biotehnologii moderne.

3. Utilizarea genotipurilor MK01, Ku123, MAN2424, MAN2470, B73 în programele de ameliorarea a rezistenței porumbului la bolile fungice.

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. 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
5. 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.
6. 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.
7. PANDEY, M.K. et al. Mitigating aflatoxin contamination in ground nut through a combination of genetic resistance and post-harvest management practices. In: Toxins. 2019, vol. 11, nr. 6, pp. 1–21. ISSN 2072-6651.
8. KAMLE, M. et al. Fumonisin: impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. In: Toxins. 2019, vol. 11, nr. 6, pp. 1–23. ISSN 2072-6651.
9. THAPA, A. et al. Deoxynivalenol and zearalenone—synergistic or antagonisticagri-foodchainco-contaminants? In: Toxins. 2021, vol. 13, nr. 8, pp. 1–20. ISSN 2072-6651.
10. 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.
11. GOU, M. et al. Quantitative disease resistance: multifaceted players in plant defense. In: Journal of integrative plantbiology. 2023, vol. 65, nr. 2, pp. 594–610. ISSN 1744-7909.
12. 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
13. WEN, T., OTT, A. Dellaporta DNA Extraction. In: Plant Molecular Biology Reporter. 1983, vol. 1, nr. 4, pp. 19–21. ISSN 2618-7354.
14. 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.
15. 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.
16. GRAJDIERU, C., TUMANOVA, L., MITINA, I., MITIN, V. Comparative analysis of accumulation of sometoxigenic 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.

Lista publicațiilor autorului la tema tezei

2.2. în reviste din alte baze de date acceptate de către ANACEC

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. **DOAJ, OAJI, IBN**

DOI: [https://doi.org/10.59295/sum1\(171\)2023_17](https://doi.org/10.59295/sum1(171)2023_17)

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/185811

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. **DOAJ, OAJI, IBN**

DOI: [https://doi.org/10.59295/sum1\(171\)2023_14](https://doi.org/10.59295/sum1(171)2023_14)

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/185808

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. **DOAJ, OAJI, IBN**

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6694870>

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/159498

2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil

4. DEAGHILEVA, A., TUMANOVA, L., MITIN, V., FOKSHA, N., GRAJDIERU, C. Monitoring of Penicillium infection during eggplant ontogenesis. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2022, nr.3 (343), pp. 48-53. ISSN 1857-064X. **Categoria B**

DOI: <https://doi.org/10.52388/1857-064X.2022.3.05>

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/176473

5. 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. **Categoria B**

DOI: <https://doi.org/10.52388/1857-064X.2021.2.07>

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/152773

3.2. în lucrările manifestărilor științifice incluse în alte baze de date acceptate de către ANACEC

6. ZGARDAN, D., MITINA, I., STURZA, R., MITIN, V., RUBTOV, S., GRAJDIERU, C., BEHTA, E., INCI, F., HACIOSMANOGLU, N. A Survey on acetic acid bacteria levels and volatile acidity in several wines of the Republic of Moldova. In: *Biology and Life Sciences Forum*. 2023, v.26, nr.1, pp.1-10. eISSN 2673-9976. **EBSCO**

<https://www.mdpi.com/2673-9976/26/1/79>

3.3. în lucrările manifestărilor științifice incluse în Registrul materialelor publicate în baza manifestărilor științifice organizate din Republica Moldova

7. BÎLICI, E., GRĂJDIERU, C. Immunologic evaluation of maize collection samples. In: *Materialele simpozionului științific internațional „Protecția plantelor – realizări și perspective”*, 2-3 octombrie 2023, Chișinău. Chișinău: ”Print-Caro”, 2023, pp. 284-289, ISBN 978-9975-62-563-0. **IBN**

DOI: <https://doi.org/10.53040/ppap2023.41>

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/188631

8. GRAJDIERU, C. Molecular identification of aflatoxin-producing Aspergillus strains in maize seed-material. In: *Materialele simpozionului științific internațional ”Protecția plantelor – realizări și perspective”, 27-28 octombrie 2020, Chișinău. Chișinău: ”Print-Caro”, 2020, pp. 268-271. ISBN 978-9975-3472-0-4. **IBN***

DOI: <https://doi.org/10.53040/9789975347204.66>

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/112482

9. GRĂJDIERU, C., BÎLICI, E. Identificarea agenților cauzali ai fuzariozelor în agrocenozele de porumb. În: *Materialele conferinței naționale cu participare internațională ”Știința în nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective” (ediția a VII-a)*, 19-20 mai 2023, Bălți. Bălți: Bons Offices, 2023, pp. 63-67. ISBN 978-9975-81-128-6. **IBN**

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/182503

10. 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. **IBN**

https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/142236

Adnotare

La teza cu titlul, ”**Identificarea genético-moleculară a genotipurilor de porumb (*Zea mays* L.) rezistente la unii patogeni fungici**”, înaintată de către candidatϕ GRĂJDIERU **Cristina**, pentru conferirea titlului științific de doctor în științe biologice la specialitatea **162.01. Genetica vegetală.**

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 proprie răspundere, CV. Rezultatele obținute sunt publicate în 20 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 fungi din genurile *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Obiective: testarea unui set de primeri proiectați *de novo* pentru identificarea fungilor 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 genotiparea 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 fungi 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; a fost realizată analiza calitativă și cantitativă a principalelor producători de micotoxine din boabele de porumb; a fost stabilită corelația dintre acumularea de micotoxine și numărul de grupuri de gene asociate producției de micotoxine, a fost studiat polimorfismul ADN-ului de porumb.

Valoarea aplicativă: a fost propusă aplicarea markerilor moleculari și protocoalelor PCR pentru monitorizarea fungilor patogenici și toxigenici în culturi agricole și produse alimentare. A fost testată germoplasma de porumb din Banca de gene a IGFPP și au fost selectate genotipuri de perspectivă pentru programele de ameliorare.

Implementarea rezultatelor: rezultatele au fost prezentate la conferințe științifice naționale și internaționale, publicate în reviste științifice. 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 microorganismele; analiza complexă a acumulării micotoxinelor în produse alimentare pe parcursul depozitării; identificarea genotipurilor de tomate rezistente la fitoplasmă.

Annotation

Of the thesis entitled , “**Molecular identification of maize (*Zea mays* L.) genotypes resistant to fungal pathogens**”, presented by the candidate **GRAJDIERU Cristina**, for obtaining the degree of Doctor in Biological Sciences with specialty **162.01. Plant genetics. 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 breeding 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. Maize germoplasm from Gene bank of IGPPP was tested and perspective genotypes were selected for breeding programs of resistance.

Implementation of the results: the results were presented at national and international scientific conferences and published in scientific journals. The presented methods were applied to assess the phytosanitary status of apple orchards and determine the most effective storage parameters to reduce pathogen damage to apples; comprehensive assessment of mycotoxin accumulation in foods during storage; identification of tomato genotypes resistant to phytoplasma.

Аннотация

Диссертация «Молекулярно-генетическая идентификация генотипов кукурузы (*Zea mays* L.) устойчивых к грибковым патогенам», представленная ГРЭЖДИЕРУ Кристиной на соискание степени доктора биологических наук по специальности 162.01.

Генетика растений

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 20 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. Была протестирована зародышевая плазма кукурузы из коллекции Банка генов ИГФЗР и выбраны перспективные для селекции устойчивости генотипы.

Внедрение результатов: результаты представлены на национальных и международных научных конференциях, опубликованы в научных журналах. Изложенные методы были применены для оценки фитосанитарного состояния яблоневых садов и определения наиболее эффективных параметров хранения для снижения поражения яблок патогенами; комплексная оценки аккумуляции микотоксинов в пищевых продуктах во время хранения; выявления генотипов томатов, устойчивых к фитоплазме.

GRĂJDIERU Cristina

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

162.01. Genetica vegetală

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 22.03.2024

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj 35 ex.

Coli de tipar: 2,0

Comanda nr. 38/24

Centrul Editorial-Poligrafic al USM
Str. Al. Mateevici, 60, Chișinău, MD-2009