

Proiectul 15.817.05.10F Tehnologii de diagnostic molecular al fitopatogenilor

Direcția strategică Biotehnologie

Directorul proiectului: TUMANOVA Lidia, dr., conf.cercet.

A fost analizată baza de date *GenBank* a secvențelor genomice a *TYLCV*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Fusarium spp.*, *F.graminearum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria spp.*, *A. alternata*, *A. solani* și selectate secvențele genomice conservative ale acestora. A fost efectuat design-ul al 12 seturi de primeri specifici și descriși parametrii acestora. Un set de primeri pentru identificarea *TYLCV2*, a fost creat în baza secvențelor *complete genome* a *TYLCV2*. Două seturi de primeri pentru *Candidatus Phytoplasma solani*, au fost create în baza regiunilor genei ribosomale și genei *chaperonin*. Câte un set pentru *Fusarium spp.* și *F.graminearum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, au fost create în baza secvențelor *Translation Elengation Factor 1-alpha*. Un set de primeri pentru identificarea *Alternaria spp.* a fost creat în baza secvențelor *polymerase gene*. Câte un set, pentru *A. alternata* și *A. solani* au fost create în baza secvențelor *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene*. Au fost testate diferite metode de izolare a ADN-ului din materialul vegetal infectat fiind ajustați parametrii unui protocol nou și optimizate parametrii *PCR*. Analiza moleculară a eşantioanelor de grâu, tomate, porumb, colectate în dinamica, la diferite faze de dezvoltare a culturilor, a permis stabilirea etapelor de infectare a acestora cu *Candidatus Phytoplasma solani*, g. *Fusarium*, *F.graminearum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, g. *Alternaria*, *A. alternata*, *A. solani*.

S-a stabilit că *Candidatus Phytoplasma solani* începe să fie identificat la tomate la etapă de maturare a fructelor, iar infecția abundentă se manifestă, în funcție de genotip și de modul de plantare, la etapa fructelor coapte, la nivelul ramificațiilor II-IV. Infectarea tomatelor cu *Alternaria sp.* începe în sere și se răspândește la etapele cultivării în câmp, deseori, neavând simptome vizibile și fiind cauzată predominând de *A. alternata*, mai rar de *A. solani*. Spicele de grâu sunt infectate cu *A.alternata* și *F.avenaceum* la etapa de înflorire/polenizare, persistând până la coacerea definitivă, atât în spicele vizual sănătoase, cât și în cele cu simptome de diverse afecțiuni micotice. Speciile de *F. oxysporum* și *F.verticillioides* au fost identificate în rădăcinile și frunzele de porumb la etapa de 4-6 frunze, n-au fost depistate în inflorescențe, iar în grăunțe se identifică la etapa de lapte- Ceară și coacere definitivă. S-a arătat, că pentru izolarea eficientă a

ADN-ului din sol, este necesară combinarea mai multor metode de izolare a ADN-ului, care conțin concentrații ridicate de săruri. În solul câmpurilor IGFPP au fost identificate *A.alternata*, *F.oxysporum* și *F.verticillioides*. Analiza mostrelor de ADN a grâului soiurilor Moldova-11, Moldova-79 la diferite faze de dezvoltare a demonstrat că în infecțiile mixte între fungii din g. *Alternaria* și *Fusarium* există o concurență. La fazele tardive începe să predomină *Alternaria spp.* Multiplex-PCR analiza mostrelor de ADN izolat din partea bazală a axului știuletelui la faza înfloririi poate fi propusă pentru analiza rezistenței liniilor de porumb la agenții cauzali a infecțiilor din g. *Fusarium* și *Alternaria*. PCR-analiza a mostrelor de ADN izolat din tomate a demonstrat că componența florei micotice diferă în dependență de organele și țesuturile plantei. Pețiolul frunzei poate fi propus pentru analiza rezistenței soiurilor de tomate Cerasus, Elvira, la infecțiile provocate de *Alternaria spp.* și *Fusarium spp.* Probele ADN-ului din sol au fost analizate pentru detectarea agenților fitopatogeni, care produc micotoxine, cantitatea cărora este reglementată de Uniunea Europeană pentru produse alimentare. Au fost obținute rezultate pozitive pentru *F.oxysporum*, *F. avenaceum*, *A. alternata*, *Myrothecium verrucaria*. Rata distribuției infecției fitoplasmice la tomate a soiurile Elvira și Cerasus a fost diferită, la soiul Elvira fiind comparativ mai mare decât la soiul Cerasus. Infecția fitoplasmică *Ca. P. solani* a fost identificată la șapte specii de cicade inclusiv *Hyaletthus obsoletus* și *Reptalus panzeri* care sunt confirmate în Europa ca insecte-vector ale fitoplasmei. La sfârșitul perioadei de vegetație au fost analizate fructe de tomate pentru prezența a unor specii de fungi-producenți de micotoxine. Din spectrul de producenți de micotoxine au fost evidențiate *A. alternata*, *Aspergillus flavus* și *P. chrysogenum*. A fost efectuată analiza PCR a probelor de ADN extras din plantele de grâu a soiului Moldova-79 și forma L-18. Cea mai frecvent întâlnită specie identificată la toate stadiile de vegetație a plantelor de grâu a fost *Fusarium verticilloides*, iar cea mai rară specie - *Fusarium avenaceum*. Analiza cantitativă a *Fusarium spp* a fost efectuată pentru liniile MK01 și KY 123. Principiul de bază a fost în estimarea concentrației ADN-lui de patogen în țesuturile plantelor. După valorile concentrației de ADN a patogenului s-a demonstrat că linia MK01 este mai rezistentă decât KY123. Această abordare poate fi o metodă eficientă de apreciere a rezistenței plantelor la un anumit patogen. La fel, a fost efectuată analiza cantitativă pentru unii fitopatogeni (*Fusarium spp.*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*) în mostrele de sol de diferită proveniență. Concentrația finală a ADN, care dă signal pozitiv după amplificare, este 10^{11} . Aceasta înseamnă, că concentrația ADN-lui de *Fusarium spp.* depășește un trilion (10^{12}) de molecule per 1 g de sol.