

RECEPȚIONAT

Ministerul Educației, Culturii și Cercetării

AVIZAT

Secția AȘM _____

**RAPORT ȘTIINȚIFIC ANUAL
privind executarea proiectului de cercetări științifice
fundamentale (instituțional)**

Proiectul: **Tehnologii de diagnostic molecular al fitopatogenilor**

Cifra proiectului: 15.817.05.10F

Direcția strategică: 16.05 Biotehnologie

Termen de executare: 31 decembrie 2019

Directorul proiectului TUMANOVA Lidia _____

Directorul institutului ANDRONIC Larisa _____

Chișinău, 2019

CUPRINS

1.	Lista executorilor (Anexa nr. 1).....	3
2.	Obiectivele și sarcinile proiectului.....	4
3.	Rezultatele științifice ale cercetărilor efectuate în cadrul proiectului.....	4
4.	Rezumat.....	7
5.	Concluzii.....	8
6.	Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, SCOPES, JOP, IRSIS, NATO, etc.), inclusiv propunerile prezentate/câștigate în cadrul concursurilor naționale și internaționale cu tangență la tematica cercetării proiectului realizat.....	9
7.	Anexe.....	10

LISTA EXECUTORILOR

Nr	Numele, prenumele	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului	Semnătura
1.	Tumanova Lidia	Doctor	Șef de laborator, directorul proiectului	
2.	Barbacar Nicolae	Doctor habilitat	consultant științific	
3.	Zamorzaeva- Orleanscaia Irina	Doctor	cercet.șt.coord.	
4.	Belousova Galina	Doctor	cercet.șt.sup.	
5.	Deaghileva Angela	Doctor	cercet.șt.sup.	
6.	Mitina Irina	Doctor	cercet.șt.sup.	
7.	Bivol Ina	Doctor	cercet.șt.sup.	
8.	Mitin Valentin		cercet.șt.	
9.	Cuznețova Irina		cercet.șt.	
10.	Ignatova Zoia		cercet.șt.	
11.	Bahșiev Aighiuni		cercet.șt.stag.	
12.	Grăjdieru Cristina		cercet.șt.stag.	

2. OBIECTIVELE ȘI SARCINILE PROIECTULUI

1. Analiza speciilor de fitopatogeni fungici la unele soiuri de tomate, grâu, și porumb, care manifestă un grad diferit de rezistență la agenții studiați.
2. Analiza comparativă a gradului de infectare a unor plante de cultură prin metoda semicantitativă.
3. Analiza moleculară a prezenței *Candidatus Phytoplasma solani* la unele soiuri de tomate cu grad diferit de rezistență și la cicade (colectate în anii 2018 și 2019).
4. Identificarea patogenilor care cauzează diferite maladii la plantele de cultură și duc la diminuarea calității producției agricole în solul din loturile experimentale.
5. Identificarea în sol și în material vegetal patogenilor-producenți de micotoxine, care afectează calitatea producției agricole și prezintă un risc semnificativ pentru sănătatea umană.

3. REZULTATELE ȘTIINȚIFICE ALE CERCETĂRILOR EFECTUATE ÎN CADRUL PROIECTULUI

Design-ul primerilor noi pentru PCR-identificarea patogeni fungici

Primerii noi prezintă avantaje din punct de vedere că aceștia sunt selectați în baza unui număr mai mare de succesiuni, inclusiv gene, ale căror secvențe nu au fost cunoscute anterior. Mai mult ca atât, crearea seturilor de primeri pentru un număr mai mare de patogeni permite unificarea parametrilor (temperatura de aliniere identică), pentru realizarea multiplex-PCR.

A fost analizată baza de date GenBank a secvențelor genomice a *Fusarium equiseti* (polyketide synthase gene, beta-tubulin gene și translation elongation factor 1-alpha gene), *Fusarium sporotrichioides* (cytochrome P450 monooxygenase gene, genes translation elongation factor 1-alpha), *Fusarium incarnatum* (translation elongation factor 1-alpha gene). Design-ul primerilor a fost efectuat utilizând aplicația Soft Primer3. Secvențele primerilor, generați de Primer3, au fost analizate cu ajutorul aplicației BLAST pentru verificarea specificității primerilor creați. În procesul de elaborare a primerilor s-a ținut cont de: corespunderea numărului maximal de secvențe a genei respective prezentate în GenBank; temperatura de aliniere a primerilor H 60 °C; lungimea ampliconilor de ≤ 500 p. b.

Analiza speciilor de fitopatogeni fungici la unele soiuri de grâu, tomate și porumb, care manifestă un grad diferit de rezistență la agenții studiați

Au fost analizate boabe de grâu, neprelucrate și prelucrate cu Shell+Reglalg, cu scopul evaluării impactului a prelucrării chimice asupra gradului de infectare. A fost izolat ADN din două grupuri de boabe de grâu de toamnă a următorilor soiuri și linii: Moldova-5, Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, linia L-18 și soiul-standard Kuialnic. Primul grup au constituit boabele, prelucrate cu fungicidul Shell +Reglalg, al doilea grup – martor, boabe neprelucrate. Concentrația Reglalg – 0,5%, Shell – standard pentru prelucrare. ADN-ul a fost izolat din 3 g de proba sumară a materialului semincer (60-95 de boabe, în dependență de soi). A fost efectuată analiza PCR pentru prezența *Fusarium spp.*, *F. avenaceum*, *A. alternata*. Patogenii din g. *Fusarium* și *Alternaria* au fost prezenți în toate probele. *F. avenaceum* a fost identificat în mostre de 3 genotipuri de boabe neprelucrate (Moldova-11, Moldova-614, linia L-18), în boabe prelucrate cu fungicide – doar în mostre de Moldova-614. A fost demonstrată eficacitatea tratamentului semințelor.

Mostrele de ADN a soiurilor de grâu Moldova-5, Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, linia L-18 și soiul-standard Kuialnic, colectate la diferite faze de vegetație, au fost analizate pentru prezența patogenilor. Cei mai frecvent identificați patogeni pe loturile IGFPP în anul 2019 au fost *F. verticillioides* și *F. incarnatum*. S-a constatat că infecția spicului are loc înaintea și în timpul înfloririi. Cele mai susceptibile la fuzarioză au fost soiurile Moldova-11 și Moldova-79. Analiza ADN-lui, extras din părțile terminale ale spicului, a demonstrat că infecția se răspândește de la vârful spicului spre bază, adică nu are loc răspândirea prin vasele conductive. Pe parcursul maturării spicului se evidențiază *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *Myrothecium roridum*. La fazele tardive de vegetație în mostrele de ADN de grâu apare *Aspergillus parasiticus*. *Alternaria alternata* a fost evidențiată pe parcursul vegetației pe frunze, în spic s-a evidențiat după ieșirea din burduf și în continuarea a fost identificată în spice până la recoltare.

A fost realizată analiza genetico-moleculară la diferite soiuri de grâu din colecția IGFPP cu scopul identificării locilor de rezistență la agenți patogeni. S-a constatat că colecția de grâu studiată

a inclus genotipuri eterogene (diferit nivel de rezistență). Analiza RGA (resistance gene analogs) ale soiurilor de grâu a arătat prezența polimorfismului intraspecific și interspecific ce indică prezența variabilității genetice în genotipurile studiate. În spectrul divers de fragmente amplificate, a fost remarcată prezența secvențelor specifice care pot fi utilizate ca markeri moleculari în genotiparea grâului.

A fost creată colecția de lucru de ADN extras din frunzele și fructele a șase soiuri de tomate (Cerasus, Deșteptarea, Exclusiv, Elvira, Tomiș, Mary Graciously), care se caracterizează prin rezistență diferită la alternarioză și fuzarioză. În rezultatul efectuării analizei PCR cu utilizarea primerilor specifici au fost determinate cazuri de infectare ale soiurilor date cu fitopatogenii din g. *Fusarium* și g. *Alternaria* pe parcursul sezonului de vegetație.

A fost extras ADN total din mostre de material vegetal, colectat de la 2 genotipuri de porumb (MK-01, B-73) la diferite faze de vegetație și creată colecția de lucru. A fost analizat spectrul de fitopatogeni din g. *Fusarium*, *Alternaria*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Organele vegetative la fazele inițiale de dezvoltare au fost practic lipsite de patogeni la plantele de ambele genotipuri. Infecția apare în știulete la faza lapte-țeară. Cei mai frecvent identificați fungi au aparținut g. *Fusarium* și *Alternaria*, în contrast, specii din g. *Aspergillus* nu au fost identificați la faza lapte-țeară. Cea mai înaltă rată de infectare cu fungii din g. *Fusarium* a fost calculată pentru linia B-73. În boabe coapte s-a identificat *Penicillium spp.* la linia MK-01, *Fusarium spp.* la linia B-73, rata infecției cu *Alternaria spp.* a fost destul de joasă la faza de maturare completă și înaltă la faza lapte-țeară pentru ambele linii. Analiza specifică a demonstrat prezența speciilor *Penicillium chrysogenum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. incarnatum*, *A. alternata*. Totodată, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Penicillium expansum*, *P. brevicompactum* nu au fost identificați.

Analiza comparativă a gradului de infectare a unor plante de cultură prin metoda semicantitativă

A fost evaluat gradul de infectare a soiurilor de tomate Cerasus, Exclusiv și Elvira cu agenții cauzali a fuzariozei și alternariozei prin metoda semicantitativă. Datele obținute au demonstrat, că soiul Cerasus a prezentat cel mai mic grad de infecție cu agenți patogeni din g. *Fusarium*, soiul Exclusiv - mediu, soiul Elvira - cel mai mare. Conținutul de agenți patogeni din g. *Alternaria* a fost detectat mai mult la soiul Exclusiv, în medie - la soiul Elvira, cel mai mic - la soiul Cerasus. Conținutul de patogeni din g. *Alternaria* a fost de două ori mai mare decât din g. *Fusarium*.

Analiza moleculară a prezenței *Candidatus Phytoplasma solani* la unele soiuri de tomate cu grad diferit de rezistență și la cicade

Diagnosticul molecular al fitoplasmei în seră a demonstrat că infecția 'Ca. P. solani' nu a fost prezentă în plante și insecte până la finele creșterii răsadului. Cicadele în seră și în câmp la începutul sezonului de vegetație (prima jumătatea a lunii iunie) nu a fost prezente într-un volum considerabil și infectate cu 'Ca. P. solani'. Infectarea tomatelor cu 'Ca. P. solani' a început la etapa de înflorire dar nu a fost răspândită. La etapa începutului coacerii fructelor de tomate o jumătate din plantele soiurilor Deșteptarea și Mary Graciously au fost infectate cu 'Ca. P. solani'. Mai târziu, la etapa coacerii fructelor în masă, soiul Mary Graciously a demonstrat o sensibilitate mai înaltă la infecția fitoplasmică în comparație cu soiul Deșteptarea. Soiul Cerasus a manifestat o rezistență

sporită la infecția fitoplasmică comparativ cu sezonul de vegetație a anului curent, la fel ca și în ultimii trei ani.

Identificarea patogenilor care cauzează diferite maladii la plantele de cultură și duc la diminuarea calității producției agricole în solul din loturile experimentale

La soiurile de tomate studiate (Cerasus, Deșteptarea, Exclusiv, Elvira, Mary Gratifully, Tomiș) au fost identificate diferite genuri de fungi care duc la diminuarea calității producției agricole – *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Myrothecium spp.*

Mostrele de ADN a soiurilor de grâu colectate la diferite faze de vegetație, au fost analizate pentru prezența patogenilor care cauzează diferite maladii la plantele. Pe parcursul maturării spicului se evidențiază *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum* și *P. brevicompactum*. La fazele tardive de vegetație în mostrele de ADN de grâu apare *Aspergillus parasiticus*. În material vegetal colectat de la 2 genotipuri de porumb (MK-01, B-73) au fost identificate următoarele specii: *Penicillium spp.*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*. Speciile au fost identificate cel mai des în boabe de porumb la ambele genotipuri studiate (MK-01, B-73) la diferite stadii de coacere.

Identificarea în sol și în materialul vegetal a patogenilor-producenți de micotoxine, care afectează calitatea producției agricole și prezintă un risc semnificativ pentru sănătatea umană

Pentru PCR-analiza a ADN-lui total extras din sol s-au folosit primeri construiți pe baza genelor implicate în sinteza micotoxinelor, concentrația cărora în produse alimentare este reglementată de legislația UE.

Analiza mostrelor de sol, pe care a fost cultivat grâul, a demonstrat semnale pozitive cu primeri specifici pentru *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. minisclerotigenes*, *A. sojae*, care corespund secvenței genei AflR. Cu ajutorul primerilor pentru secvența genei O-methyltransferase A (aflP) au fost identificați *A. parasiticus* și *A. flavus*. Aceste gene sunt implicate în sinteza aflatoxinei. De asemenea, în aceleași mostre de sol au fost identificate fragmente de ADN, omoloage cu secvența genei polyketidesynthase (PKS13), ce este implicată în sinteza zearalenonei. La fel s-a demonstrat prezența în mostre de ADN din sol a secvențelor genelor trichothecene C-3 esterase (TRI8) și cytochrome P450 monooxygenase (Tri11). Aceste gene fac parte clusterul genomic implicat în biosinteza tricocetenelor. El este responsabil pentru sinteza toxinelor deoxivalenonă și T2.

Analiza solului de pe parcelele, unde a fost cultivat porumbul, a evidențiat în mostrele de ADN secvențe ale genelor fum6 și FUM1. Aceste gene sunt implicate în sinteza fumonisinei. Primerii utilizați au permis identificarea *Fusarium proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*. Adăugător aceste secvențe au demonstrat prezența în sol a *Fusarium verticillioides* și *F. proliferatum*.

4. REZUMAT

Design-ul primerilor noi pentru PCR-identificarea patogeni fungici prezintă avantaje din punct de vedere că aceștia sunt selectați în baza unui număr mai mare de succesiuni, inclusiv gene, ale căror secvențe nu au fost cunoscute anterior. A fost analizată baza de date GenBank a secvențelor genomice a *Fusarium equiseti* (polyketide synthase gene, beta-tubulin gene și translation elongation factor 1-alpha gene), *Fusarium sporotrichioides* (cytochrome P450 monooxygenase gene, genes translation elongation factor 1-alpha), *Fusarium incarnatum* (translation elongation factor 1-alpha gene). Design-ul primerilor a fost efectuat utilizând aplicația Soft Primer3. Secvențele primerilor, generați de Primer3, au fost analizate cu ajutorul aplicației BLAST pentru verificarea specificității primerilor creați.

Cu scopul evaluării impactului a prelucrării chimice asupra gradului de infectare boabelor de grâu, au fost analizate boabe, neprelucrate și prelucrate cu Shell+Reglalg. A fost izolat ADN din boabe de grâu de toamnă a următorilor soiuri și linii: Moldova-5, Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, linia L-18 și soiul-standard Kuialnic. Patogenii din g. *Fusarium* și *Alternaria* au fost prezenți în toate probele. *F. avenaceum* a fost identificat în mostre de 3 genotipuri de boabe neprelucrate (Moldova-11, Moldova-614, linia L-18), în boabe prelucrate cu fungicide – doar în mostre de Moldova-614. A fost demonstrată eficacitatea tratamentului cu Shell+Reglalg asupra gradului de infectare al boabelor. Mostrele de ADN a soiurilor de grâu Moldova-5, Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, linia L-18 și soiul-standard Kuialnic, colectate la diferite faze de vegetație, au fost analizate pentru prezența patogenilor. S-a constatat că infecția spicului are loc înaintea și în timpul înfloririi. Cele mai susceptibile la fuzarioză soiuri au fost Moldova-11 și Moldova-79. Analiza ADN-lui, extras din părțile terminale ale spicului, a demonstrat că infecția se răspândește de la vârful spicului spre bază, adică nu are loc răspândirea prin vasele conductive.

A fost creată colecția de lucru de ADN extras din frunzele și fructele a șase soiuri de tomate (Cerasus, Deșteptarea, Exclusiv, Elvira, Tomiș, Mary Gratiffully), care se caracterizează prin rezistență diferită la alternarioză și fuzarioză. În rezultatul efectuării analizei PCR cu utilizarea primerilor specifici au fost determinate cazuri de infectare ale soiurilor studiate.

A fost extras ADN total din mostre de material vegetal, colectat de la 2 genotipuri de porumb (MK-01, B-73) la diferite faze de vegetație. Organele vegetative la fazele inițiale de dezvoltare au fost practic lipsite de patogeni la plantele de ambele genotipuri. Infecția apare în știulete la faza lapte-ceară. Cei mai frecvent identificați fungi au aparținut g. *Fusarium* și *Alternaria*, în contrast, specii din g. *Aspergillus* nu au fost identificați la faza lapte-ceară. Analiza specifică a demonstrat prezența speciilor *Penicillium chrysogenum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. incarnatum*, *A. alternata*.

A fost evaluat gradul de infectare a soiurilor de tomate Cerasus, Exclusiv și Elvira cu agenții cauzali a fuzariozei și alternariozei prin metoda semicantitativă. Datele obținute au demonstrat, că soiul Cerasus a arătat cel mai mic grad de infecție cu agenți patogeni din g. *Fusarium*, soiul Exclusiv - mediu, soiul Elvira - cel mai mare. Conținutul de patogeni din g. *Alternaria* a fost de două ori mai mare decât din g. *Fusarium*. Infectarea tomatelor cu 'Ca. P. solani' a început la etapa de înflorire dar nu a fost răspândită. La etapa începutului coacerii fructelor de tomate o jumătate din plantele soiurilor Deșteptarea și Mary Gratiffully au fost infectate cu 'Ca. P. solani'. La etapa coacerii fructelor în masă, soiul Mary Gratiffully a demonstrat o sensibilitate mai înaltă la infecția

fitoplasmică în comparație cu soiul Deșteptarea. Soiul Cerasus a manifestat o rezistență sporită la infecția fitoplasmică comparativ cu sezonul de vegetație a anului curent, la fel ca în ultimii 3 ani.

La soiurile de tomate Cerasus, Deșteptarea, Exclusiv, Elvira, Mary Graciously, Tomiş au fost identificate diferite genuri de fungi care duc la diminuarea calității producției agricole – *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Myrothecium spp.* Mostrele de ADN a soiurilor de grâu Moldova-5, Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, linia L-18 au fost analizate pentru prezența patogenilor care cauzează diferite maladii la plantele. Pe parcursul maturării spicului se evidențiază speciile din g. *Fusarium* și g. *Penicillium*. La fazele tardive de vegetație în mostrele de ADN de grâu se atestă *Aspergillus parasiticus*. În materialul vegetal colectat de la 2 genotipuri de porumb (MK-01, B-73) au fost identificate următoarele specii: *Penicillium spp.*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*. Speciile au fost identificate cel mai des în boabe de porumb la ambele genotipuri studiate la diferite stadii de coacere.

Pentru PCR-analiza a ADN-lui total extras din sol s-au folosit primeri construiți pe baza genelor implicate în sinteza micotoxinelor, concentrația cărora în produse alimentare este reglementată de legislația UE. Analiza mostrelor de sol, pe care a fost cultivat grâul, a demonstrat semnale pozitive cu primeri specifici pentru *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. minisclerotigenes*, *A. sojae*, care corespund secvențelor genelor AflR, aflP și sunt implicate în sinteza aflatoxinei. De asemenea, au fost identificate fragmente de ADN, omoloage cu secvența genei polyketidesynthase (PKS13), ce este implicată în sinteza zearalenonei, a secvențelor genelor trichothecene C-3 esterase (TRI8) și cytochrome P450 monooxygenase (Tri11), care sunt responsabili pentru sinteza toxinelor deoxivalenonă și T2. Analiza solului de pe parcelele, unde a fost cultivat porumbul, a evidențiat în mostrele de ADN secvențe ale genelor fum6 și FUM1, care sunt implicate în sinteza fumonisinei. Primerii utilizați au permis identificarea *Fusarium proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*. Adăugător aceste secvențe au demonstrat prezența în sol a *Fusarium verticillioides* și *F. proliferatum*.

5. CONCLUZII

1. A fost efectuat design-ul primerilor pentru PCR-identificarea patogeni fungici *Fusarium equiseti*, *Fusarium sporotrichioides* și *Fusarium incarnatum*.
2. A fost demonstrată eficacitatea tratamentului cu Shell+Reglalg asupra gradului de infectare al boabelor de grâu.
3. Mostrele de ADN a soiurilor de grâu Moldova-5, Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, linia L-18 și soiul-standard Kuialnic, colectate la diferite faze de vegetație, au fost analizate pentru prezența patogenilor din g.*Fusarium*. Cei mai frecvent identificați patogeni pe loturile IGFPP în anul 2019 au fost *F. verticilliioides* și *F. incarnatum*. Cele mai susceptibile la fuzarioză soiuri au fost Moldova-11 și Moldova-79.
4. Organele vegetative la fazele inițiale de dezvoltare a porumbului (genotipurile MK-01, B-73) au fost practic lipsite de patogeni la plantele de ambele genotipuri. Infecția apare în știulete la faza lapte-țeară. Cei mai frecvent identificați fungi au aparținut g. *Fusarium* și *Alternaria*. Analiza specifică a demonstrat prezența speciilor *Penicillium chrysogenum*, *F. avenaceum*, *F. verticilliioides*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. incarnatum*, *A.alternata*.
5. Infectarea tomatelor cu 'Ca. P. solani' se începe la etapa de înflorire. La etapa coacerii fructelor în masă, soiul Mary Gratifully a demonstrat o sensibilitate mai înaltă la infecția fitoplasmică în comparație cu soiul Deșteptarea. Soiul Cerasus a manifestat o rezistență sporită la infecția fitoplasmică.
6. La soiurile de tomate Cerasus, Deșteptarea, Exclusiv, Elvira, Mary Gratifully, Tomiș au fost identificate diferite genuri de fungi (*Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Myrothecium spp.*) care duc la diminuarea calității producției agricole.
7. A fost evaluat gradul de infectare a soiurilor de tomate Cerasus, Exclusiv și Elvira cu agenții cauzali a fuzariozei și alternariozei prin metoda semicantitativă.
8. La soiurile de tomate, grâu și genotipurile de porumb au fost identificate diferite genuri de fungi care duc la diminuarea calității producției agricole – *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Myrothecium spp.*
9. PCR-analiza a ADN-lui din sol pe care a fost cultivat grâul și porumb a demonstrat semnale pozitive cu primeri specifici care corespund secvențelor genelor, implicate în sinteza micotoxinelor, concentrația cărora în produse alimentare este reglementată de legislația UE.

6. Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, SCOPES, JOP, IRSIS, NATO, etc.), inclusiv propunerile prezentate/câștigate în cadrul concursurilor naționale și internaționale cu tangență la tematica cercetării proiectului realizat.

1. Cercetătorii laboratorului au fost antrenați în executarea proiectelor internaționale:

- Proiect bilateral STCU nr. 6225 ”Monitoring molecular al celor mai importante boli fungice și bacteriene în livezile de meri din Moldova”;
- Proiect bilateral STCU nr. 6378 „Elaborarea tehnicii noi de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă”;
- Proiect moldo-belarus 19.80013.51.07.10A/BL “Analiza complexă a acumulării micotoxinelor în produse alimentare pe parcursul depozitării”.

2. Cercetătorii laboratorului au devenit membri ai Asociației Europene de Cooperare în domeniul Științei și Tehnologiei (COST) din cadrul Programului UE dedicat cercetării și inovării Orizont 2020, acțiunea CA 18127 – International Nucleome Consortium.

ANEXE:

Anexa 1.1.

Fișa proiectului de cercetări fundamentale

I. Denumirea direcției strategice, codul și denumirea proiectului

16.05 Biotehnologie, 15.817.05.10F Tehnologii de diagnostic molecular al fitopatogenilor

II. Obiectivele proiectului

1. Analiza speciilor de fitopatogeni fungici la unele soiuri de tomate, grâu, și porumb, care manifestă un grad diferit de rezistență la agenții studiați.
2. Analiza comparativă a gradului de infectare a unor plante de cultură prin metoda semicantitativă.
3. Analiza moleculară a prezenței *Candidatus Phytoplasma solani* la unele soiuri de tomate cu grad diferit de rezistență și la cicade.
4. Identificarea patogenilor care cauzează diferite maladii la plantele de cultură și duc la diminuarea calității producției agricole în solul din loturile experimentale.
5. Identificarea în sol și în material vegetal patogenilor-producenți de micotoxine, care afectează calitatea producției agricole și prezintă un risc semnificativ pentru sănătatea umană.

III. Termenul executării

2015-2019

IV. Volumul total planificat al finanțării

7544,1 mii lei

V. Volumul finanțării pe perioada evaluată (mii lei)

Finanțarea planificată 1930,2 mii lei *Executată 1930,2 mii lei*

VI. Subdiviziunile organizației executoare (laborator, secție, sector etc.)

Laboratorul Genetica Moleculară

VII. Executorii

	<i>Nume, prenume, funcția în cadrul proiectului</i>
1	Tumanova L., dr. ch., conferențiar cercetător, conducătorul proiectului
2	Barbacar N., dr. hab. biol., profesor cercetător, consultant științific
3	Zamorzaeva I., dr. biol., conferențiar cercetător, cercetător științific coordonator
4	Belousova G., dr. biol., cercetător științific superior
5	Deaghileva A., dr. biol., cercetător științific superior
6	Bivol I., dr. biol., cercetător științific superior
7	Mitina I., dr. biol., cercetător științific superior
8	Mitin V., cercetător științific
9	Cuznețova I., cercetător științific
10	Ignatova Z., cercetător științific
11	Bahșiev A., cercetător științific stagiar
12	Grăjdieru C., cercetător științific stagiar

VIII. Sumarul activităților proiectului realizate în anul 2019

<i>Activități planificate</i>	<i>Activități realizate și rezultate noi obținute în cadrul proiectului (150 de cuvinte)</i>
-------------------------------	--

1.	Analiza speciilor de fitopatogeni fungici la unele soiuri grâu care manifestă un grad diferit de rezistență la agenții studiați.	Au fost analizate boabe de grâu, neprelucrate și prelucrate cu Shell+Reglalg. A fost izolat ADN din două grupuri de boabe de grâu de toamnă a următorilor soiuri și linii: Moldova-5, Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, linia L-18 și soiul-standard Kuialnic. A fost efectuată analiza PCR pentru prezența <i>F. avenaceum</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. verticillioides</i>, <i>A. alternata</i>, <i>Myrothecium roridum</i>. A fost demonstrată eficacitatea tratamentului semințelor. Mostrele de ADN a soiurilor de grâu enumerate, colectate la diferite faze de vegetație, au fost analizate pentru prezența patogenilor. Cei mai frecvent identificați patogeni la soiurile aristate Moldova-11, Moldova-66, Moldova-79, Moldova-614, și soiul-standard Kuialnic pe loturile IGFPP au fost <i>F. verticillioides</i> și <i>F. incarnatum</i>. Totodată la genotipurile fără ariste Moldova 5 și linia L-18 aceste specii de patogeni nu au fost identificați. S-a constatat că infecția spicului are loc înaintea și în timpul înfloririi. Cele mai susceptibile la fuzarioză soiuri au fost Moldova-11, Moldova-79, Moldova 5 și linia L-18. Analiza ADN-lui, extras din părțile terminale ale spicului, a demonstrat că infecția se răspândește de la vârful spicului spre bază, adică nu are loc răspândirea prin vasele conductive.
	Analiza speciilor de fitopatogeni fungici la unele soiuri de tomate, care manifestă un grad diferit de rezistență la agenții studiați.	A fost creată colecția de lucru de ADN extras din frunzele și fructele a șase soiuri de tomate (Cerasus, Deșteptarea, Exclusiv, Elvira, Tomiș, Mary Gratifully), care se caracterizează prin rezistență diferită la alternarioză și fuzarioză. În rezultatul efectuării analizei PCR cu utilizarea primerilor specifici au fost determinate cazuri de infectare ale soiurilor date cu fitopatogenii din g. <i>Fusarium</i> și g. <i>Alternaria</i> pe parcursul sezonului de vegetație.
	Analiza speciilor de fitopatogeni fungici la unele soiuri porumb, care manifestă un grad diferit de rezistență la agenții studiați.	A fost extras ADN total din mostre de material vegetal, colectat de la 2 genotipuri de porumb (MK-01, B-73) la diferite faze de vegetație și creată colecția de lucru. A fost analizat spectrul de fitopatogeni din g. <i>Fusarium</i>, <i>Alternaria</i>, <i>Myrothecium</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Aspergillus</i>. Organele vegetative la fazele inițiale de dezvoltare au fost practic lipsite de patogeni la plantele de ambele genotipuri. Infecția apare în știulete la faza lapte-țeară. Cei mai frecvent identificați funghi au aparținut g. <i>Fusarium</i> și <i>Alternaria</i>, în contrast, specii din g. <i>Aspergillus</i> nu au fost identificați la faza lapte-țeară. Cea mai înaltă rată de infectare cu fungii din g. <i>Fusarium</i> a fost calculată pentru linia B-73. În boabe coapte s-a identificat <i>Penicillium spp.</i> la linia MK-

		01, <i>Fusarium spp.</i> la linia B-73, rata infecției cu <i>Alternaria spp.</i> a fost destul de joasă la faza de maturare completă și înaltă la faza lapte-țeară pentru ambele linii. Analiza specifică a demonstrat prezența speciilor <i>Penicillium chrysogenum</i>, <i>F. avenaceum</i>, <i>F. verticillioides</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. proliferatum</i>, <i>F. incarnatum</i>, <i>A.alternata</i>. <i>F. oxysporum</i>, <i>F. sporotrichioides</i>, <i>F. graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>Penicillium expansum</i>, <i>P. brevicompactum</i> nu au fost identificați.
	Examinarea locilor de rezistență la agenți patogeni în diferite genotipuri de grâu.	A fost realizată analiza genético-moleculară la diferite soiuri de grâu din colecția IGFP cu scopul identificării locilor de rezistență la agenți patogeni. S-a constatat că colecția de grâu studiată a inclus genotipuri eterogene (diferit nivel de rezistență). Analiza RGA (resistance gene analogs) ale soiurilor de grâu a arătat prezența polimorfismului intraspecific și interspecific ce indică prezența variabilității genetice în genotipurile studiate. În spectrul divers de fragmente amplificate, a fost remarcată prezența secvențelor specifice care pot fi utilizate ca markeri moleculari în genotiparea grâului.
2.	Analiza comparativă a gradului de infectare a unor plante de cultură prin metoda semicantitativă.	A fost evaluat gradul de infectare a soiurilor de tomate Cerasus, Exclusiv și Elvira cu agenții cauzali a fuzariozei și alternariozei prin metoda semicantitativă. Datele obținute au demonstrat, că soiul Cerasus a arătat cel mai mic grad de infecție cu agenți patogeni din g. <i>Fusarium</i>, soiul Exclusiv - mediu, soiul Elvira - cel mai mare. Conținutul de agenți patogeni din g. <i>Alternaria</i> a fost detectat mai mult la soiul Exclusiv, în medie - la soiul Elvira, cel mai mic - la soiul Cerasus. Conținutul de patogeni din g. <i>Alternaria</i> a fost de două ori mai mare decât din g. <i>Fusarium</i>.
3.	Analiza moleculară a prezenței <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> la unele soiuri de tomate cu grad diferit de rezistență și la cicade.	Diagnosticul molecular al fitoplasmei în seră a demonstrat că infecția 'Ca. P. solani' nu a fost prezentă în plante și insecte până la finele creșterii răsadului. Cicadele în seră și în câmp la începutul sezonului de vegetație (prima jumătate a lunii iunie) nu a fost prezente într-un volum considerabil și infectate cu 'Ca. P. solani'. Infectarea tomatelor cu 'Ca. P. solani' a început la etapa de înflorire dar nu a fost răspândită. La etapa începutului coacerii fructelor de tomate o jumătate din plantele soiurilor Deșteptarea și Mary Gratifully au fost infectate cu 'Ca. P. solani'. Mai târziu, la etapa coacerii fructelor în masă, soiul Mary Gratifully a demonstrat o sensibilitate mai înaltă la infecția fitoplasmică în comparație cu soiul Deșteptarea. Soiul Cerasus a

		manifestat o rezistență sporită la infecția fitoplasmică comparativ cu sezonul de vegetație a anului curent, la fel ca și în ultimii trei ani.
4.	Identificarea patogenilor care cauzează diferite maladii la plantele de cultură și duc la diminuarea calității producției agricole.	La soiurile de tomate studiate (Cerasus, Deșteptarea, Exclusiv, Elvira, Mary Graciously, Tomiș) au fost identificate diferite genuri de fungi care duc la diminuarea calității producției agricole – <i>Fusarium spp.</i>, <i>Penicillium spp.</i>, <i>Aspergillus spp.</i>, <i>Myrothecium spp.</i> Mostrele de ADN a soiurilor de grâu colectate la diferite faze de vegetație, au fost analizate pentru prezența patogenilor care cauzează diferite maladii la plantele. Pe parcursul maturării spicului se evidențiază <i>F. avenaceum</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>P. chrysogenum</i> și <i>P. brevicompactum</i>. La fazele tardive de vegetație în mostrele de ADN de grâu apare <i>Aspergillus parasiticus</i>. În material vegetal colectat de la 2 genotipuri de porumb (MK-01, B-73) au fost identificate următoarele specii: <i>Penicillium spp.</i>, <i>F. incarnatum</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. proliferatum</i>. Speciile au fost identificate cel mai des în boabe de porumb la ambele genotipuri studiate (MK-01, B-73) la diferite stadii de coacere.
5.	Identificarea în sol și în materialul vegetal a patogenilor-producenți de micotoxine, care afectează calitatea producției agricole și prezintă un risc semnificativ pentru sănătatea umană.	Analiza mostrelor de sol, pe care a fost cultivat grâul, a demonstrat semnale pozitive cu primeri specifici pentru <i>Aspergillus parasiticus</i>, <i>A. flavus</i>, <i>A. oryzae</i>, <i>A. minisclerotigenes</i>, <i>A. sojae</i>, care corespund secvenței genei AfIR. Cu ajutorul primerilor pentru secvența genei O-methyltransferase A (afIP) au fost identificate <i>A. parasiticus</i> și <i>A. flavus</i>. Aceste gene sunt implicate în sinteza aflatoxinei. De asemenea, în aceleași mostre de sol au fost identificate fragmente de ADN, omoloage cu secvența genei polyketidesynthase (PKS13), ce este implicată în sinteza zearalenonei. La fel s-a demonstrat prezența în mostre de ADN din sol a secvențelor genelor trichothecene C-3 esterase (TRI8) și cytochrome P450 monooxygenase (Tri11). Aceste gene fac parte clusterul genomic implicat în biosinteza tricocetenelor. El este responsabil pentru sinteza toxinelor deoxivalenonă și T2. Analiza solului de pe parcelele, unde a fost cultivat porumbul, a evidențiat în mostrele de ADN secvențe ale genei biosyntheticpolyketidesynthase (FUM1). Primerii utilizați au permis identificarea <i>Fusarium proliferatum</i>, <i>F. verticillioides</i>, <i>F. fujikuroi</i>, <i>F. oxysporum</i>.

	Adăugător, identificarea secvenței genei oxygenase (fum6) a demonstrat prezența în sol a <i>Fusarium verticillioides</i> și <i>F. proliferatum</i> .
--	--

IX. Lista lucrărilor științifice cu referință la proiectul dat pe anul 2019

Articole din reviste cu factor de impact:

- articole din reviste cu factor de impact 1,0-2,9

1. ZAMORZAEVA, I.; BAHSEV, A.; TUMANOVA, L. Optimal timing and sampling for a reliable assessment of the resistance of tomato varieties to *Ca. P. solani*. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2019, **9**(1), 159-160. ISSN 2249-4669. doi: [10.5958/2249-4677.2019.00080.X](https://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00080.X) (IF: 2.8).

- articole din reviste cu factor de impact 0,1-0,9

1. БАХШИЕВ, А.Г. Влияние метеорологических условий на распространение фитоплазмы у томатов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019, **37** (Спецвыпуск), 15, ISSN 0208-0613 <https://doi.org/10.17116/molgen2019s-tez>, (IF: 0,36).

Articole din reviste naționale

1. MITINA, I.; ZGARDAN, D.; STURZA, R.; SCUTARU, I. The methodological aspects of using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in *Brettanomyces-Dekkera* detection. *Journal of Engineering Science* Vol. XXVI, no. 2 (2019), pp. 117 – 125. DOI: [10.5281/zenodo.3249213](https://doi.org/10.5281/zenodo.3249213).

Articole în culegeri (naționale / internaționale)

1. GRAJDIERU, C.; DEAGHILEVA, A.; TUMANOVA, L.; MITIN, V.; Molecular analysis of some toxigenic fungi in moldavian tomato varieties. În: *Материалы II Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего»*. Санкт-Петербург: ФГБНУ АФИ, 2019, pp. 302-307. ISBN 978-5-905200-40-3.
2. БЕЛОУСОВА, Г.; ШУБИНА, В. Молекулярно-генетическое исследование патогенного заражения семян томата. În: *Материалы II Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего»*. Санкт-Петербург: ФГБНУ АФИ, 2019, pp. 317-323. ISBN 978-5-905200-40-3.
3. КУЗНЕЦОВА, И.; ГРЭЖДИЕРУ, К.; ИГНАТОВА, З. Использование молекулярно-генетических методов для пресимптоматического определения зараженности озимой пшеницы грибными патогенами родов *Fusarium* и *Alternaria*. În: *Материалы II Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего»*. Санкт-Петербург: ФГБНУ АФИ, 2019, pp. 383-389. ISBN 978-5-905200-40-3.
4. ZAMORZAEVA, I.; BAHSEV, A.; MIHNEA, N. Spread of phytoplasma infection in the tomato field depending on the climatic conditions of the year. În: *Материалы II Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего»*. Санкт-Петербург: ФГБНУ АФИ, 2019, pp. 662-668. ISBN 978-5-905200-40-3.

Teze ale comunicărilor la simpozioane, în culegeri naționale

1. BAHSEV, A.; MITIN, V.; ZAMORZAEVA, I. Testarea primerilor specifici pentru detecția *Candidatus Phytoplasma solani*. În: *Teze ale Simpozionului Științific*

- Internațional „Biotehnologii avansate - realizări și perspective” (Ediția a V-a).Ch.: “Print-Caro”, 2019, p. 9. ISBN 978-9975-56-695-7.*
2. ZAMORZAEVA, I.; BAHSEV, A.; MIHNEA, N. Estimation of phytoplasmosis and productivity in some moldavian tomato varieties. În: *Teze ale Simpozionului Științific Internațional „Biotehnologii avansate - realizări și perspective” (Ediția a V-a).Ch.: “Print-Caro”, 2019, p. 21. ISBN 978-9975-56-695-7.*
 3. КУЗНЕЦОВА, И.; ГРЭЖДИЕРУ, К.; ИГНАТОВА, З. Влияние предпосевной обработки на инфицированность семян некоторых генотипов озимой пшеницы грибами родов *Fusarium* и *Penicillium*. *Materialele simpozionului Științific internațional „Biotehnologii avansate-realizări și perspective” (ediția a V-a), 21-22 octombrie 2019, Chișinău , p-78.*
 4. БЕЛОУСОВА, Г.; ШУБИНА, В. Молекулярно-генетическое определение фитопатогенного поражения плодов томата на ранних стадиях. În: *Teze ale Simpozionului Științific Internațional „Biotehnologii avansate - realizări și perspective” (Ediția a V-a)Ch.: “Print-Caro”, 2019, p.10. ISBN 978-9975-56-695-7.*
 5. TUMANOVA, L.; GRAJDIERU, C.; MITIN, V. Identification of DNA of pathogens from *Fusarium* genus in maize plants (*Zea mays*) În: *Teze ale Simpozionului Științific Internațional „Biotehnologii avansate - realizări și perspective” (Ediția a V-a). Ch.: “Print-Caro”, 2019, p. 19. ISBN 978-9975-56-695-7.*
 6. DEAGHILEVA, A.; MITIN, V.; TUMANOVA, L.; GRĂJDIERU, C. Elaborarea primerilor specifici pentru identificarea moleculară a fungilor din g. *Gaeumannomyces*. În: *Teze ale Simpozionului Științific Internațional „Biotehnologii avansate - realizări și perspective” (Ediția a V-a). Ch.: “Print-Caro”, 2019, p. 15. ISBN 978-9975-56-695-7.*
 7. BIVOL, I.; SIROMEATNICOV I.; MIHNEA N. RGA markers to study of the genetic diversity of some tomato genotypes in Moldova. În: *Abstract book of International Conference. Life Sciences in the dialogue of generations: Connections between Universities, Academia and Business Community. Chișinău, Dimitrie Cantemir State University, 2019. pp.15-16.*
 8. BIVOL I.; GORE A.; ROTARI S. Assessment of diversity in some wheat genotypes, based on RGA markers analysis. În: *International Scientific Symposium (Vth Edition). Advanced Biotechnologies – Achievements and Prospects. Chisinau, Tipogr. Print-Caro, 2019. p.11.*

X. Relevanța rezultatelor științifice teoretice / aplicative obținute, 2019

În aspect fundamental, cercetările, vor contribui la crearea suportului științific pentru diagnosticarea moleculară a fungilor patogeni ai grâului, porumbului și tomatelor și la înțelegerea corelației între prezența fitopatogenelor și declanșarea procesului infecțios. În aspect aplicativ, realizarea cercetărilor va contribui la extinderea spectrului agenților fitopatogeni identificați. Elaborarea și utilizarea metodelor de control molecular al fitopatogenilor, sunt durabile din punct de vedere economic și ecologic. Procedeele elaborate vor fi recomandate, pentru diagnosticarea a fitopatogenilor în laboratoarele de profil fitosanitar. Datorită faptului că procedeele de diagnostic molecular permit identificarea infecției la etape inițiale de infectare, vor fi evitate cheltuielile enorme, ce se atestă ca urmare a utilizării materialului semincer sau săditor infectat și ca, consecință, competitivitatea producției agroalimentare pe piață internă și externă. Totodată, aplicarea metodelor noi va contribui la realizarea măsurilor de protecție a plantelor de carantina fitosanitară prevăzute de unele acte legislative-normative. Rezultatele proiectului vor contribui la sporirea potențialului instrumentelor de expertizare a fitopatogenilor în Republica Moldova.

XI. Rezumatul celor mai semnificative rezultate științifice teoretice / aplicative obținute în cadrul proiectului în anul 2019

A fost efectuat design-ul primerilor pentru PCR-identificarea patogeni fungici *Fusarium equiseti*, *Fusarium sporotrichioides* și *Fusarium incarnatum*. Sa demonstrat eficacitatea tratamentului cu Shell+Reglalg asupra gradului de infectare al boabelor de grâu. Au fost analizate șapte soiuri de grâu pentru prezența patogenilor din *g.Fusarium*. Cei mai frecvent identificați patogeni pe loturile IGFPP în anul 2019 au fost *F. verticillioides* și *F. incarnatum*. Cele mai susceptibile la fuzarioză soiuri au fost Moldova-11 și Moldova-79. Organele vegetative la fazele inițiale de dezvoltare a porumbului (genotipurile MK-01, B-73) au fost practic lipsite de patogeni la plantele de ambele genotipuri. Infecția apare în știulete la faza lapte-ceară. Infectarea tomatelor cu 'Ca. P. solani' se începe la etapa de înflorire. La etapa coacerii fructelor în masă, soiul Mary Gratifuly a demonstrat o sensibilitate mai înaltă la infecția fitoplasmică în comparație cu soiul Deșteptarea. Soiul Cerasus a manifestat o rezistență sporită la infecția fitoplasmică.

A fost evaluat gradul de infectare a soiurilor de tomate Cerasus, Exclusiv și Elvira cu agenții cauzali a fuzariozei și alternariozei prin metoda semicantitativă. La soiurile de tomate, grâu și genotipurile de porumb au fost identificate diferite genuri de fungi care duc la diminuarea calității producției agricole – *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Myrothecium spp.*

PCR-analiza a ADN-lui din sol pe care a fost cultivat grâul și porumb a demonstrat semnale pozitive cu primeri specifici care corespund secvențelor genelor, implicate în sinteza micotoxinelor, concentrația cărora în produse alimentare este reglementată de legislația UE.

Beneficiarul (ministere, instituții de stat sau private, întreprinderi, etc.)

Beneficiarii direcți ai rezultatelor proiectului vor fi laboratoarele IGFPP, IP Laboratorul Central Fitosanitar și, prin intermediul acestora, agenții economici producători agricoli.

Conducătorul proiectului

TUMANOVA Lidia, dr., conf.cerc.