UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE ALE NATURII

Consorțiu: **Universitatea Stat din Moldova, Institutul de Dezvoltare a Societății Informaționale, Universitatea de Stat „Bogdan Petriceicu Hasdeu" din Cahul**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 577.21.08:631.52:635.64(043.2)

BAHȘIEV AIGHIUNI

DIAGNOSTICUL MOLECULAR AL FITOPLASMEI LA DIFERITE SOIURI DE TOMATE AUTOHTONE

162. 01. Genetică vegetală

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Chișinău 2024

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

Conducător științific-

ZAMORZAEVA-ORLEANSCAIA Irina	doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Universitatea de Stat din Moldova

Componența Comisiei de Doctorat:

ANDRONIC Larisa	doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Universitatea de Stat din Moldova - ***președinte***
ZAMORZAEVA-ORLEANSCAIA Irina	doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Universitatea de Stat din Moldova - ***conducător de doctorat***
MIHNEA Nadejda	doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Universitatea de Stat din Moldova – ***referent***
BATÎRU Grigorii	doctor în științe biologice, conferențiar universitar, Universitatea Tehnică a Moldovei – ***referent***
BONDARCIUC Victor	doctor în științe agricole, Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare – ***referent***

Susținerea va avea loc la 15 noiembrie 2024, ora 15^{00} în cadrul Ședinței Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat din cadrul Școlii Doctorale Științe ale Naturii, USM. Sediul – Universitatea de Stata 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 la Biblioteca Națională a Republicii Moldova, Biblioteca Centrală a Universității de Stat din Moldova (MD 2009, mun. Chișinău, str. Alexei Mateevici 60), pe pagina web a ANACEC (http://www.anacec.md)

Rezumatul a fost expediat la 10 octombrie 2024

Președintele Comisiei de Doctorat
doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător — **ANDRONIC Larisa**

Conducător științific
doctor în științe biologice, conferențiar universitar — **ZAMORZAEVA-ORLEANSCAIA Irina**

Autor: — **BAHȘIEV Aighiuni**

© Bahșiev Aighiuni, 2024

CUPRINS

Reperele conceptuale ale cercetării.....4

Conținutul tezei.....6

Introducere.....6

I. ASPECTE GENERALE ALE '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA SPP'.....6

II. MATERIALE ŞI METODE.....6

III. ELABORAREA ŞI EVALUAREA EFICACITĂŢII PROCEDEELOR DE DIAGNOSTIC MOLECULAR AL FITOPLASMEI LA TOMATE, PLANTE RUDERALE ŞI LA INSECTE.....7

IV. DIAGNOSTICUL MOLECULAR A '*CA*. P. SOLANI' LA DIFERITE GENOTIPURI DE TOMATE PE PARCURSUL A TREI ANI DE VEGETAȚIE.....13

V. ANALIZA TRANSMITERII A FITOPLASMEI PRIN STUDIUL INFECTĂRII MATERIALULUI SEMINCER ȘI AL GAZDELOR INTERMEDIARE.....22

Concluzii generale și recomandări.....25

Bibliografie.....26

Lista publicațiilor autorului la tema tezei.....27

Adnotare (în română).....31

Adnotare (în engleză).....32

Adnotare (în rusă).....33

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei abordate. Fitoplasmoza (stolbur) este o problemă actuală pentru cultivarea tomatelor, atât în Republica Moldova, cât și la nivel global. Această boală cauzează pierderi economice considerabile prin scăderea calității și a cantității producției, care pot atinge 70-100 % [1]. În urma procesului patogenetic la tomate, fructele afectate prezintă o mărire a floemului, lignificarea acestuia, scăderea conținutului de zaharuri și diminuarea calităților organoleptice [2]. Răspândirea stolburului a ajuns la valori extrem de ridicate la nivel global și în special în zona euro-mediteraneeană. În Uniunea Europeană este considerată boală endemică [3]. Agentul cauzal al stolburului este '*Candidatus* Phytoplasma solani'. Un rol de bază în transmiterea fitoplasmei îl dețin insectele vector din ordinul Hemiptera, familiile *Cicadelidae, Cixidae* și *Psilidae* [4]. La fel, în răspândirea agentului patogen '*Ca*. P. solani' contribuie și plantele perene, pe ale căror rădăcini iernează insectele vector. Perioada de incubare a fitoplasmei în plante după infectare durează până la 6 - 30 zile.

Metodele tradiționale de detecție a fitoplasmei posedă numeroase limitări. Acestea sunt bazate pe observarea simptomelor tipice în condiții de câmp, studiului macro și microscopic al caracterelor morfologice. Diagnosticul bolii pe baza apariției simptomelor este posibil doar la etapele tardive de infectare, aproximativ peste o lună [5]. La fel, studiul morfologic este destul de dificil din cauza că infectarea poate avea loc concomitent cu alte boli ce pot masca simptomele maladiei [6]. Detectarea patogenului cu ajutorul microscopiei electronice este dificilă deoarece din punct de vedere morfologic fitoplasma este polimorfă. Metoda de cultivare *in vitro* a devenit posibilă relativ recent, din 2012. Acesta necesită utilizarea mediilor comerciale și nu e posibil de a obține colonii specifice [7, 8]. În același timp, diagnoza veridică și la un timp oportun este posibilă cu utilizarea metodelor moleculare de diagnostic. Avantajele diagnosticului molecular constau în posibilitatea de a determina prezența sau lipsa patogenului înainte de apariția simptomelor bolii, specificitatea, la fel ca și exactitatea mai înaltă. Diagnosticul diferențiat al fitoplasmei la tomate la etape timpurii până la apariția simptomelor are importanță în studiul plantelor cu boli mixte. Este important de remarcat că metodele moleculare permit determinarea într-un timp mai rapid rezistența diferențiată a genotipurilor de tomate la '*Ca*. P. solani' [9]. Utilizarea genotipurilor rezistente va permite reducerea eventualelor pierderi de produs și, în același timp, menținerea siguranței mediului. Prelucrarea dozată și la timp a plantelor va da posibilitatea obținerii producției calitative fără utilizarea sau cu o utilizare în cantități mici a preparatelor antibacteriene și a îngrășămintelor minerale [10]. Acest lucru este foarte important în contextul creșterii cererii la nivel de stat în numeroase țări din Europa și America pentru produse agricole de calitate [11].

Studiul molecular cu utilizarea tehnicii PCR al rezistenței soiurilor autohtone de tomate a fost realizat pentru prima în Republica Moldova. Cercetări la nivel morfologic al gradului de atac cu stolbur al plantelor de tomate au fost realizate de cercetătorii Ciobanu V. și Munteanu N. în 2014 [12]. La fel, determinarea pe baza simptomelor morfologice a nivelului procentul de infectare cu stolbur au realizat cercetării Vlasov I. și Samsonova L. în 2000 [13].

Scopul lucrării: Determinarea sensibilității genotipurilor locale de tomate la infecția '*Ca.* P. solani' și studiul răspândirii acesteia utilizând metodele moleculare.

Obiectivele cercetării:

1. Detectarea moleculară a repartizării şi gradului de atac al infecţiei fitoplasmice la plantele de tomate ale unor soiuri autohtone în diferite perioadei de vegetaţie.
2. Identificarea etapei pentru determinarea diferenței în sensibilitate la infecția fitoplasmică.
3. Determinarea fitoplasmei la 4 forme spontane de tomate.
4. Elaborarea și optimizarea sistemului de diagnostic molecular al '*Ca.* P. solani' la tomate, insecte vector și plante ruderale.
5. Analiza comparativă a metodelor (*nested*-PCR, *Real-time* PCR, PCR prin diluarea în serie a ADN-ului) pentru determinarea sensibilității soiurilor autohtone de tomate la infecția fitoplasmică.
6. Secvențierea fragmenelor genei 16S ARNr cu scopul determinării tulpinilor '*Ca.* P. solani' pe loturile experimentale.
7. Determinarea posibilității transmiterii stolburului prin semințe la soiurile de tomate analizate.
8. Determinarea infecţiei fitoplasmice la insectele din ordinul Hemiptera (insectele vector) și plante perene cu scopul monitorizării stării epidemiologice a '*Ca.* P. solani' pe câmpurile experimentale.

Ipoteza de cercetare: Sensibilitatea plantelor de tomate la fitopatogenul '*Ca.* P. solani' diferă în funcție de genotip și sub interacțiunea factorilor climaterici.

Sinteza metodologiei și justificarea metodelor de cercetare alese. Studiul științific și metodologia cercetării, include un număr vast de metode și tehnici justificative, ce a permis în cadrul acestei cercetări atingerea scopului și obiectivelor propuse. Au fost aplicate diverse metode de izolare a ADN-ului pentru determinarea metodei mai rapide și eficiente în diagnosticul fitoplasmei. Metodele moleculare bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR), *nested*-PCR, *Real-time* PCR au fost utilizate deoarece permit identificarea specifică a '*Ca.* P. solani' în comparație cu alte metode. În special utilizarea secvențierii ADN-ului a făcut posibilă determinarea tulpinii '*Ca.* P. solani' ce infectează cultura agricolă și insectele vector. Aplicarea

metodelor moderne de investigare a oferit date referitoare la sensibilitatea variată a soiurilor de tomate locale analizate la infecția cu '*Ca*. P. solani'.

Sumarul capitolelor tezei

Teza include adnotarea redactată în limbile română, engleză şi rusă, o listă cu abrevieri, introducerea, cinci capitole, concluzii generale, recomandări practice, bibliografia, declaraţia de asumare a răspunderii şi CV-ul autorului. Lucrarea este scrisă pe 99 de pagini text de bază, conține 59 figuri, 14 tabele, bibliografie din 156 de titluri și 4 anexe.

Publicaţiile la tema tezei. Pe parcursul realizării studiului, datele primite au fost expuse în 39 de publicații științifice: 9 publicații incluse în bazele de date Scopus și Web of Science, 4 articole în registrul național de profil, 2 publicații în baze de date acceptate de ANACEC, 6 articole în lucrările manifestărilor științifice internaționale, 1 articol în lucrările manifestărilor științifice cu participare internațională, 8 articole în lucrările manifestărilor științifice internaţionale (peste hotare), 1 teză prezentată la manifestărilor științifice internaționale, 4 teze la manifestări științifice naționale cu participare internațională, 4 teze în lucrările manifestărilor științifice naționale. Cercetările realizate și datele obținute au fost prezentate anual la ședințele Consiliilor științifice ale IGFPP(USM), precum și în cadrul a 21 întruniri științifice naționale și internaționale.

CONȚINUTUL TEZEI

Introducerea sintetizează şi prezintă pe scurt informaţii despre stadiul actual al diagnosticului fitoplasmei, subliniază relevanța problemei propuse spre rezolvare, definește scopul şi obiectivele lucrării, enunță ipoteza și sinteza metodologiei de cercetare, justificând metodele de analiză selectate şi oferind un rezumat al capitolelor tezei.

I. ASPECTE GENERALE ALE '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA SPP'

Acest capitol conține o analiză a cercetărilor actuale privind aspectele generale ale morfologiei, genomului și evoluției fitoplasmei. Sunt prezentate posibile căi de transmitere, cu enumerarea principalelor rezervoare naturale și a insectelor vector ce facilitează răspândirea fitoplasmei. Sunt descrise simptomele specifice ale bolii cauzate '*Ca*. P. solani' la tomate și consecințele negative care afectează calitatea și cantitatea producției. Se expune modul de interacțiune a fitoplasmei cu plantele și insectele gazdă. Sunt redate măsurile de bază pentru controlul și prevenirea răspândirii patogenului. La fel, se pune accent pe principalele metode de diagnostic al fitoplasmei, incluzând avantajele și dezavantajele fiecărei metode.

II. MATERIALE ȘI METODE

Diagnosticul molecular al prezenței '*Ca*. P. solani' a fost realizat la următoarele genotipuri de tomate: Elvira, Cerasus, Mary Gratefully, Deșteptarea, create în cadrul laboratorului Genetica aplicată a Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP) al USM. Adiacent au fost luate în studiu alte 4 forme spontane de tomate: *Solanum habrochaites, S. pimpinellifolium, S.*

chilense și *S. peruvianum.* 12 specii de plante ruderale: *C. arvensis*, *Calystegia sepium*, *Daucus carota*, *Chenopodium album*, *Setaria viridis*, *Solanum nigrum*, *Potentilla reptans*, *Artemisia vulgaris*, *Urtica dioica*, *Sonchus oleraceus*, *Polygonum convolvulus*, *Polygonum aviculare*, au fost testate ca potențiale rezervoare ale infecției fitoplasmice. Cercetările s-au efectuat pe baza materialul colectat pe parcursul anilor 2018-2020. Diverse metode de izolare a ADN-ului au fost utilizate în funcție de probă: DNA-zol, prin fierbere în soluție alcalină, K-acetat, Na-acetat și cu microunde. Diagnosticul molecular la prezența patogenului s-a realizat prin metoda PCR, *nested*-PCR, *Real-time* PCR, secvențierea ADN-ului. În cercetare au fost utilizați 22 de primeri pentru determinarea '*Ca*. P. solani' creați în cadrul laboratorului Genetica moleculară. Analiza statistică s-a realizat cu ajutorul criteriului lui Fisher prin programul Excel.

III. ELABORAREA ŞI EVALUAREA EFICACITĂŢII PROCEDEELOR DE DIAGNOSTIC MOLECULAR AL FITOPLASMEI LA TOMATE, PLANTE RUDERALE ȘI LA INSECTE

Necesitatea elaborării și optimizării procedeului de determinare a patogenului '*Ca.* P. solani' la diverse gazde este datorată numeroaselor cauze: 1) În diagnosticul molecular, există riscul de a obține rezultate fals-pozitive și fals-negative. Optimizarea metodelor permite de a minimiza acest pericol. 2) Utilizarea metodelor moleculare pe diverse obiecte, organe și țesuturi necesită selectarea unor condiții specifice pentru colectarea materialului, extracția ADN-ului și realizarea PCR, etc. 3) Pentru a accelera, simplifica și reduce costul analizelor moleculare, s-a realizat o comparație a unor proceduri relativ simple, precum izolarea prin metoda fierberii în soluție alcalină, cu microunde, PCR, PCR prin diluarea în serie a ADN-ului, *nested*-PCR și *Real-time* PCR. În studiile ulterioare, au fost utilizate metode optimizate cu fiabilitate dovedită.

3.1. Elaborarea şi evaluarea metodelor moleculare de diagnostic al fitoplasmei la plantele de tomate

Selectarea celor mai optimale metode de diagnostic molecular precis și viabil a fitoplasmei în tomate a fost realizată în următoarele etape:

- izolarea ADN-ului din diferite obiecte și organe;
- amplificarea fragmentelor de ADN fitoplasmic;
- electroforeza produșilor PCR.

3.1.1. Selectarea şi compararea metodelor de extracție a ADN-ului din tomate

Analiza moleculară a infecției '*Ca.* P. solani' la plantele de tomate, pentru evaluarea procentuală a plantelor infectate a diferitor soiuri a fost efectuată folosind extragerea ADN-ului din peduncul prin metoda alcalină expres. Această metoda este rapidă, are un cost redus per probă și permite evaluarea unui eșantion mare de plante.

Eficacitatea extragerii ADN-ului prin metoda expres a fost evaluată comparând rezultatele diagnosticării moleculare ale infecției fitoplasmice la tomate cu fructe maturate, din care ADN-ul

a fost izolat prin metoda cu utilizarea de K-acetat și prin metoda cu DNA-zol. Toate cele trei metode au dat rezultate similare, înregistrându-se 80% din tomatele soiului Elvira infectate cu '*Ca*. P. solani' (Tabelul 3.1)

Tabelul 3.1. Identificarea infecției '*Ca*. P. solani' la plantelor de tomate ale soiului Elvira utilizând diverse metode de extragere a ADN-ului

Metoda de extragere a ADN-ului	Organul tomatei	Numărul plantelor de tomate		% plantelor infectate
		analizate	infectate	
Alcalină expres	peduncul	20	16	80
K-acetat	fructul	10	8	80
DNA-zol	fructul	10	8	80

3.2. Selectarea condițiilor pentru analiza PCR la tomate

Pentru a selecta condițiile PCR ce permit de a obține rezultate veridice în diagnosticul molecular al fitoplasmei '*Ca*. P. solani' la tomate, au fost comparate:

1 – Datele obținute prin analize PCR și *nested*-PCR;

2 – Numărul ciclurilor de amplificare;

3 – Diferite seturi de primeri specifici.

3.2.1. Compararea rezultatelor obținute prin analiza PCR și nested-PCR cu primeri chaperonine

Compararea datelor obținute prin analiza PCR și *nested*-PCR permite să facem o concluzie clară că pentru diagnosticul precis și corect al infecției fitoplasmice la tomate, este necesară analiza *nested*-PCR. Aceasta este bine ilustrată în urma realizării diagnosticului molecular al '*Ca*. P. solani' la plante de tomate a soiului Elvira (Figura 3.1 A, B). Analiza PCR a permis identificarea a 4 plante infectate folosind ADN-ul izolat prin metoda K-acetat și 5 plante infectate prin metoda DNA-zol (Figura 3.1 A). În schimb, analiza *nested*-PCR a relevat 8 plante infectate în ambele moduri de izolarea ADN-ului (Figura 3.1 B). La fel, rezultatele analizei PCR sunt parțial fals-negative, permițând detectarea numai a 40% sau 50% plantelor infectate, comparativ cu 80% care a fost obținute prin analiza *nested*-PCR.

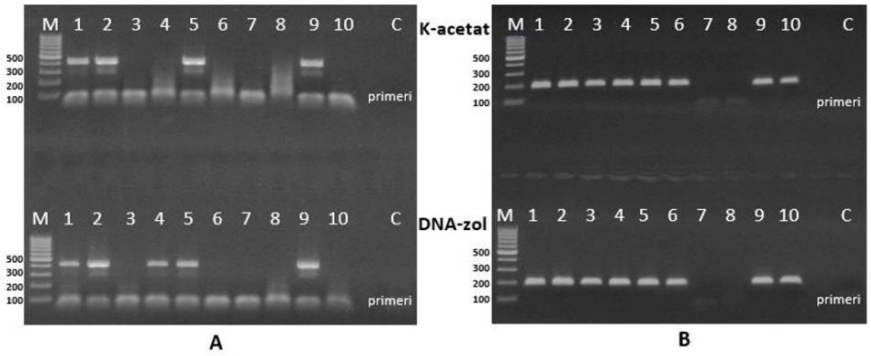


Figura 3.1. Rezultatele PCR și *nested*-PCR pe bază ADN-ului izolat din tomatele soiului Elvira prin metoda K-acetat sau DNA-zol

(**A** – fragmentul 421 pb, primeri chaperonine specifici pentru '*Ca*. P. solani') (**B** – fragmentul 200 pb obținut în runda II), M – marcherul de lungime a fragmentelor de ADN; C- – control negativ

A fost efectuată selectarea numărului de cicluri de amplificare pentru *nested*-PCR. Este important de menționat că, deși un număr mare de cicluri mărește sensibilitatea diagnosticului, aceasta poate duce la apariția fragmentelor nespecifice, inclusiv a dimerilor de primeri. Astfel, când se utilizează 45 de cicluri de amplificare, intensitatea dimerilor sintetizați este mare, iar la 35 de cicluri de amplificare, numărul de dimeri este mai redus.

În rezultatul unei serii de experiențe au fost selectate 30 cicluri de amplificare pentru runda I și 35 cicluri pentru runda II.

În rezultatul experiențelor descrise mai sus au fost stabilite condițiile pentru realizarea *nested*-PCR, ce permit de a obține rezultate stabile și corecte în diagnosticul molecular al infecției fitoplasmice la tomate. Ambele runde de amplificare trebuie să se efectueze într-un amestec cu volumul de 25µl ce conține: soluția bufer pentru *Taq*-polimerază ×1, 1U *Taq*-polimerază, 0.2 mM dNTP, 0.25 µM F primer, 0.25 µM R primer, apă ultrapură şi 1µl ADN în runda I sau 1µl amestec din runda I diluat 1/20 în runda II. Următorul program de amplificare poate fi utilizat: runda I – I - 94°C 5'; II - 94°C 30", 58°C 30", 72°C 30" × 30; III - 72°C 10'; IV - 4°C ∞; runda II – I - 94°C 5'; II - 94°C 30", 58°C 30", 72°C 30" × 35; III - 72°C 10'; IV - 4°C ∞. Perechile de primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' utilizate în prima rundă: cpn421F, cpn421R; pentru runda a doua: cpn200F, cpn200R.

3.2.2. Testarea eficienței primerilor chaperonine ps specifici pentru 'Ca. P. solani' pentru analiza PCR

Pentru a dezvolta o nouă tehnică de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă, este important să existe metode moleculare veridice de detectare a '*Ca*. P. solani' la plante. Anterior, am dezvoltat o metodă sigură pentru identificarea infecția '*Ca*. P. solani' prin *nested*-PCR la plante. La această etapă, am comparat performanța diferitelor perechi de primeri prin PCR și *nested*- PCR, cu scopul de a optimiza procesul.

În decursul acestei etape au fost testate numeroase combinații de primeri. Un accent deosebit a fost pus pe optimizarea condițiilor analizei PCR cu scopul obținerii rezultatelor veridice cu perechile de primerii utilizați. Avantajele PCR față de *nested*- PCR includ rapiditatea, sunt mai puțin costisitoare și necesită o manipulare mai mică a probelor. Cu toate acestea, are unele dezavantaje în comparație cu *nested*-PCR în sensibilitate și specificitate. Un design bun al primerilor împreună cu condițiile de reacție optimizate pot îmbunătăți sensibilitatea și specificitatea analizei PCR, păstrând avantajul accesibilității și simplității sale.

În studiu au fost analizați șase primeri ps (3 *Forward* și 3 *Revers* în diferite combinații), specifici patogenului '*Ca*. P. solani', care au fost creați pe baza secvenței genei *chaperonine*. Programul pentru realizarea reacției de amplificare a fost următor: I – 5 min la 94°C; II – 30 sec la 94°C, 30 sec la 58°C, 30 sec la 72°C × 30; III – 10 min la 72°C; IV - ∞ la 4°C. Figura 3.1 prezintă rezultatele sumare ale analizei PCR la aceleași probe ca și în figura 3.2 (ADN-ul extras prin metoda DNA-zol) cu diferite combinații de primeri ps.

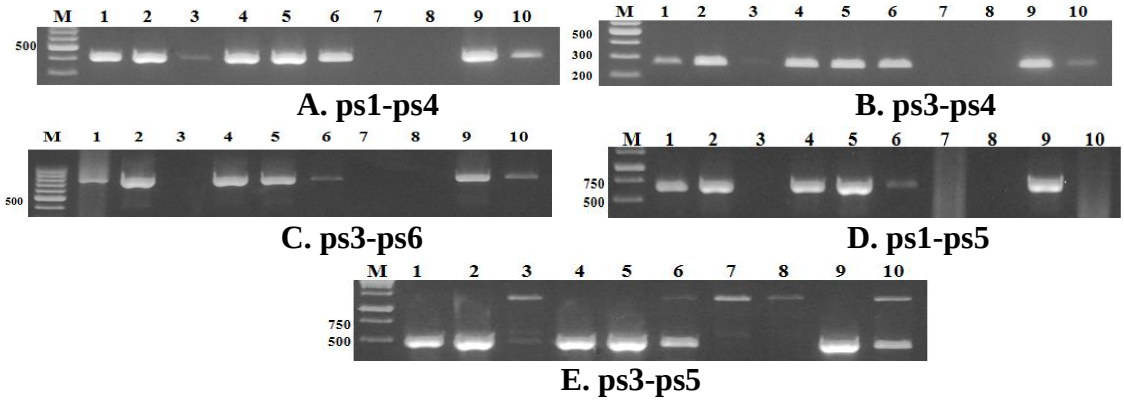


Figura 3.2. Rezultatele analizei PCR cu perechile de primeri ps, pe baza ADN-ului extras din plantele soiului de tomate Elvira la prezența fitoplatogenului '*Ca.* P. solani'

ADN-ul a fost purificat prin metoda DNA-zol. M este marcherul ADN

Rezultatele sugerează, că primerii ps1-ps4 și ps3-ps4 sunt potriviți pentru utilizare în analiza PCR. Cu toate acestea, eșantioanele cu titru de infecție scăzut pot produce benzi slabe pe gel și rezultate neconcludente, care necesită analize suplimentare prin *nested*-PCR.

3.4. Selectarea condițiilor pentru diagnosticul '*Ca.* P. solani' la insectele vector

Schema procedeelor diagnosticului molecular al insectelor vector include următoarele etape: colectarea cicadelor în câmp, izolarea ADN-ului din insecta individuală, *nested*-PCR folosind două perechi de primeri pentru '*Ca.* P. solani', electroforeza produșilor *nested*-PCR.

Au fost folosite două moduri de colectare a insectelor: capturarea cu capcane lipicioase de culoarea galbenă în câmpul de tomate sau în seră, și prin metoda cosirii cu fileul entomologic în apropierea câmpului. Important de menționat că metoda a doua oferă rezultate mai variate din punct de vedere al diversității speciilor și a numărului de insecte capturate. Considerăm că culoarea galbenă este atractivă doar pentru un număr limitat de specii.

Au fost comparate două metode de extragere a ADN-ului dintr-o cicadă individuală: metoda izolării ADN-ului cu DNA-zol și metoda alcalină expres. Rezultatele pozitive ale detecției infecției fitoplasmice au fost obținute doar cu utilizarea metoda izolării cu DNA-zol.

Nested-PCR (ambele runde de amplificare) cu primerii chaperonine trebuie să elaboreze conform următorului program de amplificare: runda I - I - 94 °C 5'; II - 94°C 30", 58°C 30", 72°C

30" × 45; III - 72°C 10'; IV - 4°C ∞; runda II - I - 94°C 5'; II - 94°C 30", 58°C 30", 72°C 30" × 35; III - 72°C 10'; IV - 4°C ∞.

Utilizarea acestui program permite de a evita apariția rezultatelor fals-negative în diagnosticul molecular al fitoplasmei la cicade. Dificultățile sunt cauzate de mărimile diferite ale cicadelor analizate și, ca rezultat, extragerea diferitor cantități de ADN. Datele fals-negative s-au obținut în cazul utilizării a 30 cicluri de amplificare în runda I și 45 sau 50 cicluri în runda II.

3.5 Analiza cantitativă *Real-time* PCR

În acest studiu, s-a detectat și cuantificat ADN-ul patogenului '*Ca*. P. solani' în probele de ADN de tomate utilizând PCR în timp real pe bază de SYBR-Green. Au fost creați și testați primeri specifici pentru detectarea în timp real a '*Ca*. P. solani'. La fel, a fost cuantificat numărul de copii ADN ale fitoplasmei izolate din plantele a patru soiuri de tomate. Aceste soiuri au fost raportate anterior ca având o rezistență contrastă la infecția fitoplasmică. Astfel, se poate preconiza că acestea să prezinte un număr diferit de copii ale genei *chaperonine* a '*Ca*. P. solani'. Soiul mai puțin rezistent ar avea mai multe copii ale ADN-ul '*Ca*. P. solani' în comparație cu soiul mai rezistent [14]. Pentru extracția ADN-ului, au fost colectate 12 plante din fiecare soi. ADN-ul a fost izolat prin metoda DNA-zol. Concentrația de ADN purificat a fost măsurată cu spectrofotometrul Nanodrop și au fost folosiți 9 ng de ADN purificat. Pentru analiza *Real-time* PCR, au fost create 2 perechi de primeri pe baza genei chaperonin a '*Ca*. P. solani'

Condițiile PCR au fost cele recomandate de producătorul SybrGreen - incubația inițială la 50^{o}C timp de 2 minute, denaturarea inițială la 95^{o}C timp de 2 minute și incubația de 95^{o}C timp de 15 secunde și 60^{o}C timp de 1 minut timp de 40 de cicluri. Reacțiile au fost efectuate în sistemul PCR în timp real BIORAD CFX96 touch. Detectarea a fost efectuată pe canalul SYBR. Eficiența primerului a fost calculată utilizând calculatorul de eficiență *Real-time* [15].

Pentru standartul *Real-time* PCR, un fragment a fost amplificat prin PCR convențional, folosind perechea de primeri qfys7 și qfys8. Apoi, fragmentul a fost vizualizat pe gelul de agaroză, excizat și purificat. Concentrația ADN-ului fragmentului purificat a fost determinată cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop. Având în vedere dimensiunea fragmentului 160 pb, s-a determinat numărul de copii în 1 ng de fragment ADN, utilizând calculatorul *on-line* [16].

În primul rând, primerii au fost testați experimental pentru a evalua specificitatea, eficiența și concentrația optimă a acestora în reacție. Pentru evaluarea specificității, curba de disociere a fost obținută pentru ambele perechi de primeri. În figura 3.3 este prezentată curba de disociere a fragmentului amplificat cu perechea de primeri qfys5-qfys6, folosind ADN-ul tomatelor infectate cu '*Ca*. P. solani' ca șablon. Pentru determinarea concentrației optime de primer și ADN, fragmentul a fost amplificat conținând 200 nM (Figura 3.3 I-A, B) și 400 nM (Figura 3.3 I-C, D) din fiecare primer, atât fără diluție (Figura 3.3 I-A, C), cât și cu o diluție de 10 ori (Figura 3.3B,

D) a ADN-ului șablon. După cum se poate vedea, concentrația mai mare a primerului a dus la o fluorescență mai intensă, fără a provoca formarea de dimeri ai primerilor (Figura 3.3 I-C), indicând un singur vârf pronunțat. Totuși, această pereche de primeri nu a reușit să amplifice fragmentul dintr-un șablon mai diluat (Figura 3.3 I - B, D)

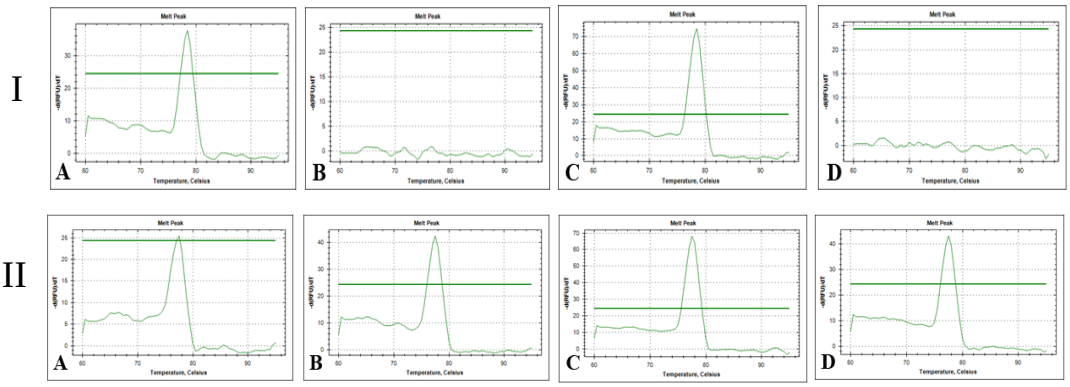


Figura 3.3. Curba de disociere a fragmentului, amplificată de perechea de primeri qfys5-qfys6 (I) și qfys7-qfys 8(II). Concentrația primerului: 200 nM fiecare (A, B); 400 nM fiecare (C, D). Diluții șablon: nediluat (A, C), diluție de 10 ori (B, D)

Concentrația mai mare a primerului qfys7-qfys8 a dus la o fluorescență mai mare și nu a provocat formarea dimerilor primerului (Figura 3.3 II-C), deci putem observa un singur vârf pronunțat. Această pereche de primeri a reușit să amplifice fragmentul chiar și în reacția cu șablonul diluat (Figura 3.3 II-B, D). Deci, această pereche de primeri a fost utilizată pentru analize suplimentare, la o concentrație de 400 nM fiecare. Apoi, a fost evaluată eficiența perechii de primeri qfys7-qfys8. Fragmentul ADN a fost amplificat de aceeași pereche de primeri într-o PCR convențională și apoi diluat pentru a fi utilizat ca șablon pentru reacția RT-PCR. Au fost realizate patru diluții (de 10, 100, 1000 și 10000 de ori) ale ADN-ului reacției PCR inițiale, utilizate ca șablon în reacția RT-PCR. S-au măsurat valorile Ct și s-a construit curba de concentrație pentru a calcula eficiența primerilor.

Graficul de eficiență a primerilor, realizat din diluții în serie, este prezentat în Figura 3.4 a. Panta de -3.3183 indică o eficiență de aproape 100%, ceea ce sugerează că această pereche de primeri poate fi utilizată în teste PCR în timp real pentru măsurarea concentrațiilor de '*Ca*. P. solani'. Astfel, perechea de primeri qfys7-qfys8 a fost utilizată pentru cuantificarea ADN -ului '*Ca*. P. solani' în probele de tomate. În acest scop, a fost realizate diluții în serie a ADN-ului cu numărul de copii cunoscut și apoi cercetate cu *Real-time* PCR. Elaborarea unei curbe standard s-a efectuat pe baza valorilor Ct înregistrate. Figura 3.4 b ilustrează dependența valorii Ct de numărul inițial de copii ale șablonului din reacție.

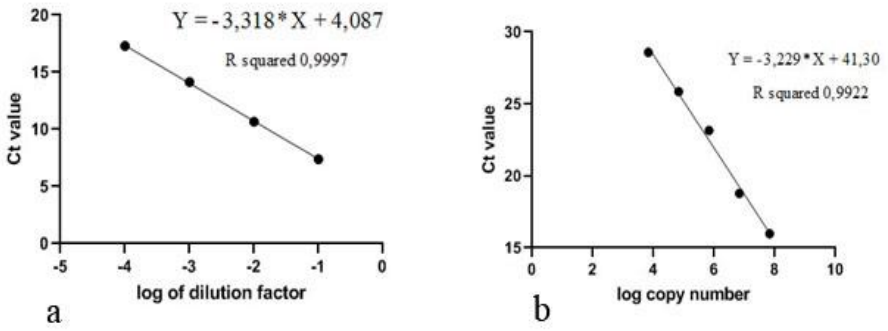


Figura 3.4. Graficul eficienței perechii de primeri qfys7-qfys8 (a) și corelația între valoarea Ct și numărul copiilor inițiale ale șablonului în reacție (b)

IV. DIAGNOSTICUL MOLECULAR AL '*CA.* P. SOLANI' LA DIFERITE GENOTIPURI DE TOMATE PE PARCURSUL A TREI ANI DE VEGETAȚIE

Diagnosticul molecular a '*Ca.* P. solani' la tomate au fost efectuat în trei etape de dezvoltare a plantelor: începutul maturării fructelor (iulie), coacerea în masă a fructelor (august), sfârșitul sezonului de vegetație după colectarea unei părți semnificative din recolta de fructe (septembrie).

4.1. Diagnosticul molecular al fitoplasmei la plantele de tomate din câmp în anul 2018

Determinarea moleculară în plantele a 4 soiuri de tomate (Cerasus, Elvira, Deșteptarea și Mary Gratefully) la prezența '*Ca.* P. solani' a fost realizat pe baza ADN-ului izolat din pedunculi colectați în luna iulie, august și septembrie. Pentru analiza prezenței infecției fitoplasmice au fost selectate câte zece plante în două repetări pentru fiecare dintre cele patru soiuri analizate. Analiza a relevat diferențe în rata de infectare a plantelor la anumite soiuri. Conform datelor obținute, primele simptome de infecție au apărut în luna iulie. Procentul de infectare cu '*Ca.* P. solani' a soiului Elvira a fost de 35%, iar soiul Deșteptarea a prezentat indici asemănători de 30%. O sensibilitate mai scăzută a demonstrat soiul Cerasus, doar 5 % din plante au fost infectate cu fitoplasmă. Analiza moleculară a '*Ca.* P. solani' în luna august a arătat tendințe similare. Infectarea mai redusă a fost stabilită la soiul Cerasus - 35% și jumate din plante au fost infectate la soiul Mary Gratefully. Infectarea mai pronunțată a fost la soiurile Elvira și Deșteptarea de 80%.

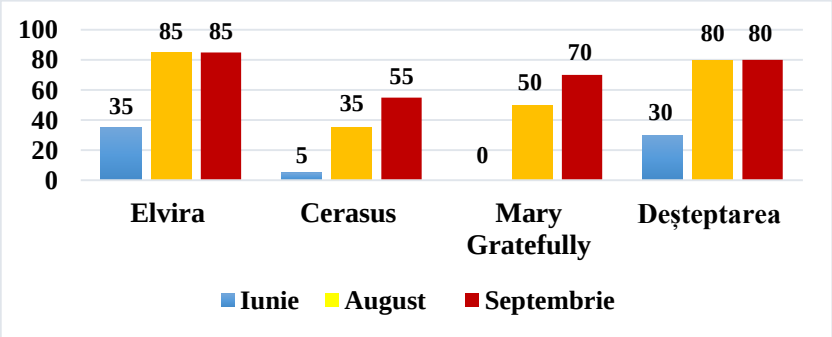


Figura 4.1. Răspândirea infecției fitoplasmice la diferite soiuri de tomate în anul 2018

Analiza *nested*-PCR realizată în septembrie, la sfârșitul perioadei de vegetație, la cele patru soiuri autohtone de tomate, a reconfirmat tendințele de abundență a fitoplasmozei. Totuși, diferențele dintre soiuri au fost nu atât de pronunțate. Procentul plantelor afectate a soiului Cerasus a constituit 55%, la Elvira de 80%, Mary Gratefully de 75% și soiul Deșteptarea fiind de 85% (Figura 4.1).

4.2. Diagnosticul molecular al fitoplasmei la plantele de tomate din câmp în anul 2019

Detectarea moleculară a infectării plantelor de tomate cu fitoplasmă la diferite etape ale coacerii fructelor a fost efectuată la soiurile Elvira, Cerasus, Deșteptarea și Mary Gratefully. Plantele au fost cercetate în decursul diferitelor stadii de dezvoltare (sfârșitul lunii iulie, sfârșitul lunii august, mijlocul lunii septembrie) folosind analiza *nested*-PCR cu primerii chaperonine cpn421 F/R și cpn200 F/R specifici pentru '*Ca.* P. solani'. Probele de ADN au fost izolate din peduncul fructului de tomate folosind metoda alcalină expres.

Rezultatele diagnosticului molecular al infecţiei fitoplasmice la plantele de tomate ale celor patru soiurilor crescute în câmp sunt prezentate în figura 4.2. Compararea datelor obținute a fost efectuată utilizând prelucrarea statistică conform criteriului Fisher.

În luna iulie, la începutul maturării fructelor de tomate, o jumătate de plante ale soiurilor Deșteptarea și Mary Gratefully au fost infectate cu '*Ca.* P. solani'. La soiurile Cerasus și Elvira numai un sfert din plante analizate a fost determinată infecția fitoplasmică, utilizând analiza *nested*-PCR. Numărul plantelor infectate cu fitoplasma ale soiului Deșteptarea a crescut cu un mod nesemnificativ în următoarele etape ale coacerii fructelor care a atins nivelul de 58% în lunile august și septembrie. Jumătate din plantele soiului Elvira au fost infectate cu stolbur în luna august și procentul a crescut până la 58% în luna septembrie. Infecția fitoplasmică la plantele soiul Mary Gratefully a crescut semnificativ la etapa coacerii fructelor în masă în august, ajungând la peste 90% și rămânând la acest nivel în septembrie.

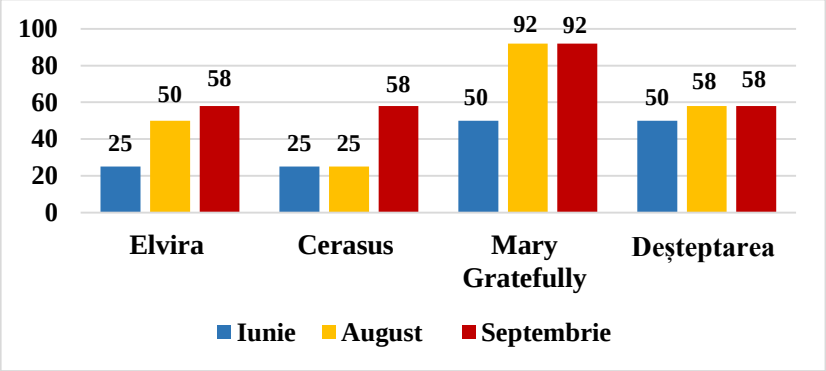


Figura 4.2. Răspândirea '*Ca.* P. solani' în câmpul de tomate în anul 2019

Numai un sfert din plantele soiului Cerasus a fost infectate cu '*Ca.* P. solani' și în luna august, la etapa coacerii fructelor în masă. La sfârșitul perioadei de vegetație, în septembrie, nivelul infecției fitoplasmice la acest soi a crescut nesemnificativ, reprezentând 58%.

Analiza moleculară a infecției fitoplasmice la plantele de tomate ale soiurilor analizate a demonstrat că în condițiile anului 2019 (vară cu temperaturi înalte și precipitații reduse) valorile maxime ale infectării au fost înregistrate la etapa coacerii în masă a fructelor în luna august și nu au crescut semnificativ până la sfârșitul sezonului de vegetație (mijlocul lunii septembrie). Primele semne de infectare au fost identificate în prima decadă a lunii iulie, la începutul formării fructelor. La sfârșitul lunii iulie o jumătate din plantele soiurilor Elvira și Deșteparea au fost infectate cu '*Ca.* P. solani'. Credem că acest mod de repartizare a infecției fitoplasmice în câmpul de tomate este asociat cu ciclul de reproducere și activitatea insectelor vector. Clima caldă a majorat activitatea cicadelor la începutul sezonului de vegetație dar a influențat negativ reproducerea lor. La fel, numărul plantelor infectate cu fitoplasma nu a crescut semnificativ din luna august până în luna septembrie. Comparația sensibilității soiurilor studiate în anul 2019 a demonstrat că soiul Mary Gratefully a fost cel mai sensibil la infecția '*Ca.* P. solani', în timp ce soiurile Deșteptarea și Elvira au demonstrat valori intermediare. Soiul Cerasus a prezentat cea mai mare rezistență.

4.3. Diagnosticul molecular al fitoplasmei la plantele de tomate din câmp în anul 2020

Schema diagnosticului molecular la prezența infecției '*Ca.* P. solani' la soiurile autohtone de tomate în condițiile sezonului de vegetație 2020 a fost similară ca în anul 2019 și 2018.

Conform rezultatelor înregistrate se observă o răspândire scăzută a infecției fitoplasmice în câmp (Figura 4.3). În luna iulie, prezența infecției '*Ca.* P. solani' nu a fost detectată în câmpul de tomate. Infectarea tomatelor cu fitoplasma a început la etapa de maturare-coacere, însă nivelul de infecție a fost scăzut. Prezența stolburului a fost confirmată la două genotipuri de tomate analizate. La soiul Elvira procentul plantele infectate cu '*Ca.* P. solani' a constituit 8%, iar la soiul Mary Gratefully - 33%.

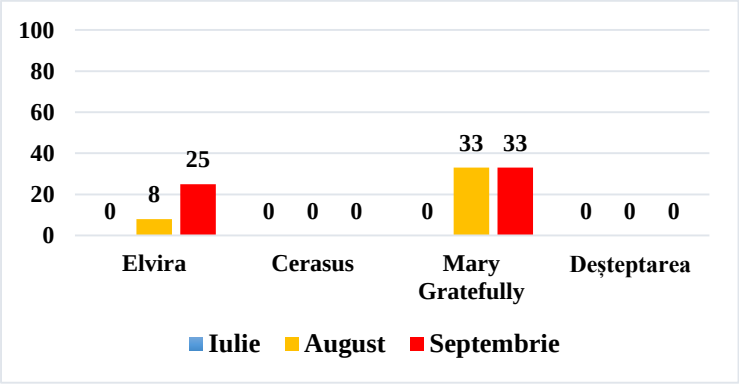


Figura 4.3. Răspândirea infecției '*Ca.* P. solani' la diferite soiuri de tomate în anul 2020

Procentul de infecție fitoplasmică la soiul Mary Gratefully a rămas la același nivel și la sfârșitul perioadei de vegetație. La soiul Elvira s-a observat o creștere a nivelului de infecție cu fitoplasmă, ajungând la 25%. La soiul Cerasus și Deșteptarea prezența a '*Ca.* P. solani' nu a fost determinată pe parcursul întregii perioade de vegetație. Astfel, rezultatele obținute indică o distribuție scăzută a fitoplasmei în câmp în condițiile anului 2020. Procentul de infecție '*Ca.* P. solani' în câmp a ajuns doar la 14,5% la sfârșitul sezonului de vegetație. Datele nu permit o determinare statistică clară a soiului mai mult sau mai puțin rezistent la infecția '*Ca.* P. solani'. Totuși, s-au stabilit unele tendințe în condițiile anului 2022 – sensibilitate mai mare la soiurile Elvira și Mary Gratefully și sensibilitate mai mică la soiurile Cerasus și Deșteptarea.

4.4. Analiza comparativă a gradului de distribuție a fitoplasmei la tomate pe parcursul a trei ani de vegetație

Analiză detaliată a distribuției stolburului la plantele de tomate a soiurilor analizate a relevat o diferență semnificativă în sensibilitatea acestor soiuri la infecția cu fitoplasmă. Această diferența a fost vizibilă în toate trei sezoane de vegetație (Figura 4.4 și Tabelul 4.1).

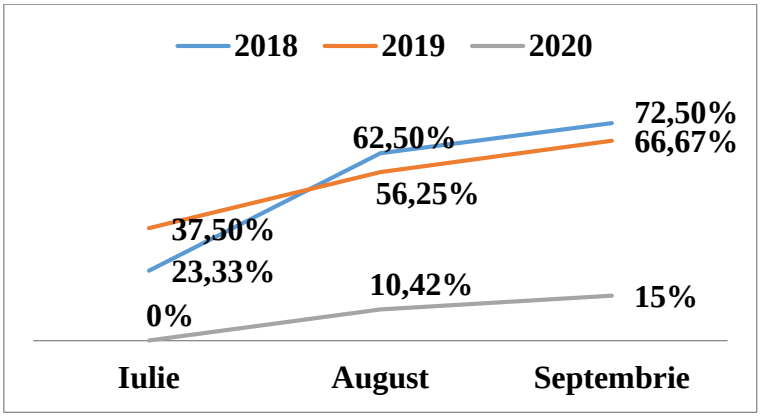


Figura 4.4. Datele sumare privind răspândirea '*Ca.* P. solani' pe câmpul de tomate în anii 2018, 2019 și 2020

Tabelul 4.1 prezintă datele obținute în urma identificării moleculare a infecției '*Ca.* P. solani' în plante de tomate a 4 genotipuri analizate, la diferite etape de vegetație din anii 2018, 2019 și 2020.

Diagnosticarea moleculară a infecției cu fitoplasme la soiurile de tomate analizate în perioada anilor 2018-2020 a evidențiat diferențe semnificative. În iulie 2019, la începutul maturării fructelor, jumătate din plantele a două soiuri de tomate (Deșteptarea și Mary Gratefully) au fost afectate de stolbur. În schimb, la soiurile Elvira și Cerasus, procentul de plante infectate a fost semnificativ mai mic, de doar 25%. În condițiile anului 2018, la soiul Cerasus s-a înregistrat o infestare foarte nesemnificativă (5%), iar la soiul Deșteptarea s-a observat un procent mai mic de plante infectate 30% în 2018 față de 50% de plantele infectate în 2019. În iulie a 2020, infecția '*Ca.* P. solani' a fost absentă în câmpul de tomate.

Tabelul 4.1. Rezultatele identificării infecției fitoplasmice în plantele diferitor genotipuri de tomate în anii 2018, 2019 și 2020

Soiul	Răspândirea stolburului în câmp (%)								
	2018			2019			2020		
	I	A	S	I	A	S	I	A	S
Elvira	35	85	85	25	50	58	0	8	25
Cerasus	5	35	55	25	25	58	0	0	0
Mary Gratefully	XX	50	70	50	92	92	0	33	33
Deșteptarea	30	80	80	50	58	58	0	0	0

Note: I - Iulie ; A - August; S - Septembrie. XX - diagnosticul molecular al infecției cu fitoplasme în aceste soiuri nu a fost efectuat

Cele mai mari diferențe în gradul de infectare cu fitoplasmă a plantelor diferitor soiuri de tomate au fost observate la etapa de coacere în masă a fructelor, în august. Influența condițiilor climatice în anii de studiu asupra răspunsului plantelor soiurilor analizate a fost ambiguă (Tabelul 4.1, Figura 4.5).

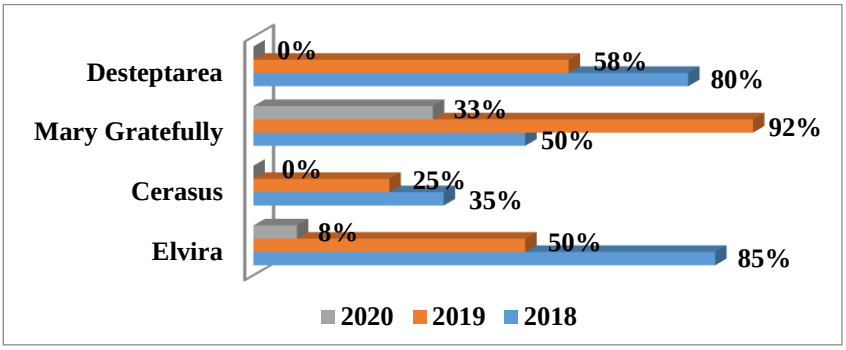


Figura 4.5. Distribuția '*Ca.* P. solani' în câmpul de tomate în perioada de coacere în masă a fructelor în anii 2018, 2019 și 2020 (luna august)

Studiile efectuate au permis identificarea genotipurilor mai sensibile și mai rezistente la infecția *'Ca.* P. solani' în anii 2018, 2019 și 2020. În primul rând, sa constatat că Cerasus arată cea mai mare rezistență la infestarea cu '*Ca.* P. solani' printre soiurile studiate, un nivel relativ mai mare de daune aduse plantelor acestui soi de către infecția fitoplasmică a fost observat doar la sfârșitul sezonului de vegetație, în septembrie, în timp ce puțin mai mult de jumătate din plante au fost infectate. Astfel, soiul Cerasus poate fi recomandat amelioratorilor ca material genetic pentru crearea genotipurilor rezistente la fitoplasmă (hibrizi, soiuri). În plus, utilizarea acestui soi mai rezistent la fitoplasmă în agricultură poate fi rentabilă pentru producători prin creșterea calității și cantității fructelor recoltate.

Soiul Elvira a avut o sensibilitate mai înaltă la infecția fitoplasmică în toți anii de cercetare indiferent de condițiile climatice. La fel, soiul Deșteparea a demonstrat indici asemănători cu soiul Elvira în sezoanele de vegetație a anilor 2018 și 2019. Pe când, în condițiile climatice ale anului

2020 cu temperaturi înalte și o secetă pedologică, acest soi a demonstrat o rezistență înaltă la infecția fitoplasmică. Totuși, sumând datele obținute în decursul anilor studiați putem afirma că aceste două soiuri au arătat o sensibilitate mult mai mare la infecția cu fitoplasmă în comparație cu soiul Cerasus, diferența de răspândire a infecției la etapa de coacere în masă a fructelor a fost foarte evidentă (2018 și 2019).

Genotipurile care au fost susceptibile la infecția '*Ca*. P. solani' în dependență de condițiile climatice ale sezonului de creștere, s-au dovedit a fi Mary Gratefully și Deșteparea. S-a constatat că soiul Mary Gratefully, în condițiile climatice nefavorabile ale sezoanelor 2019 și 2020, a fost cel mai sensibil la fitoplasmă, gradul de infecție al acestuia a fost semnificativ mai mare în comparație cu alte soiuri, iar acest lucru s-a remarcat deja în luna august, la etapa de coacere în masă a fructelor. Pe când, în luna august 2018, acest soi a fost mai puțin sensibil la infecția fitoplasmică, un număr mai mic de plante infectate au fost înregistrate în această perioadă doar la soiul Cerasus, care este cel mai rezistent soi la fitoplasmă. La fel, soiul Deșteptarea în condițiile anilor 2018 a fost mai sensibil la infecția '*Ca*. P. solani', iar cu ridicarea temperaturii climatice nivelul infestării plantelor soiului scădea [17].

Analizând datele expuse mai sus, putem concluziona că diagnosticul molecular este un instrument util în procesul de ameliorare pentru identificarea genotipurilor rezistente la infecția cu fitoplasmă. La fel, analiza moleculară oferă rezultate valide ce au fost confirmate în analiza plantelor cu simptome morfologice ale stolburului (Figura 4.6)

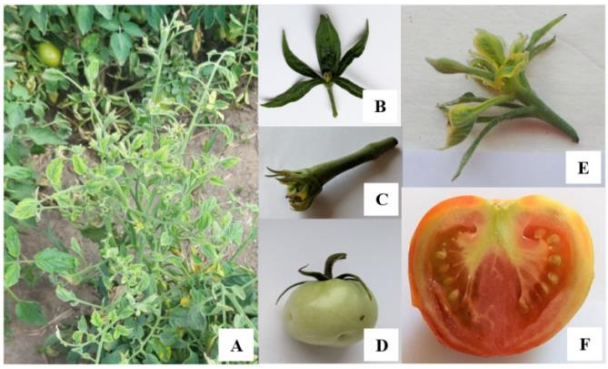


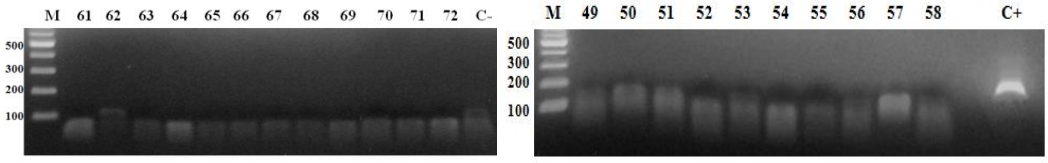
Figura 4.6. Simptomele fitoplasmozei la tomate

A. Plantă simptomatică, B. Inflorescență fără petale, C. Inflorescență cu petale reduse, D. Fruct redus, E. Floare cu simptome de virescență, F. Fruct lignificat

4.2. Analiza formelor spontane de tomate la prezența fitoplasmei

Diagnosticul molecular al formei spontane de tomate *Solanum habrochaites* la prezența patogenului '*Ca.* P. solani' a fost realizat în decursul anilor 2019 și 2020. Determinarea fitoplasmei a fost realizată pe 10 plante individuale. Analiza moleculară nu a identificat prezența patogenului *'Ca*. P. solani*'* în forma spontană *S. habrochaites* în ambele sezoane de vegetație în câmp (Figura

4.7). Astfel, putem face o concluzie despre rezistența înaltă a plantelor de *S. habrochaites* la stolbur în condițiile anilor de studiu.



2019 **2020**

Figura 4.7. Determinarea '*Ca*. P. solani' la *Solanum habrochaites* în luna septembrie a anului 2019 și 2020. M – Marker, C- – Control negativ, C+ – Control pozitiv.

Adiacent, în anul 2020 au fost luate în studiu alte 3 forme spontane de tomate: *S. pimpinellifolium, S. chilense* și *S. peruvianum.* Analiza moleculară cu primerii cpn 200 F/R nu a identificat prezența patogenului '*Ca*. P. solani' în plantele speciilor de tomate analizate în decursul perioadei de vegetație. Astfel, prezența infecției fitoplasmice nu a fost determinată în plantele a celor patru forme spontane de tomate. Credem, că formele spontane de tomate au o sensibilitatea redusă la fitoplasmă în comparație cu soiurile de tomate de cultură. Ele pot fi cu succes utilizate în procesul de ameliorare ca surse sigure de rezistență la stolbur în crearea soiurilor noi de tomate.

4.3. Analiza cantitativă a infecției fitoplasmice în fructele de tomate

4.3.1. Analiza cantitativă Real-time PCR

Rezultatele obținute în urma realizării *Real-time* PCR au demonstrat că fructele de tomate cu cea mai mare concentrație de '*Ca*. P. solani' aparțineau soiurilor Elvira și Mary Gratefully (Figura 4.8). Soiul Cerasus, în comparație cu soiul Elvira sau Mary Gratefully, avea aproximativ jumătate din cantitatea de fitopatogen. Aceste date sunt în corespundere cu rezultatele anterioare, care raportează o rezistență mai înalta a soiului Cerasus. Cea mai scăzută concentrație de fitoplasmă în fructele de tomate a fost depistată la soiul Deșteptarea, fiind de două ori mai mică decât la soiul Cerasus [18].

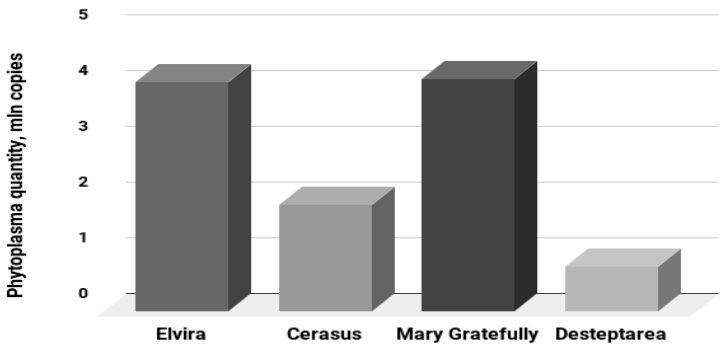


Figura 4.8. Cuantificarea a '*Ca*. P. solani' la patru soiuri de tomate prin *Real-time* PCR

Pe lângă cuantificarea '*Ca.* P. solani' în fructele de tomate și contribuția sa la scăderea calității fructelor, a fost analizată răspândirea infecției fitoplasmice în câmpul de tomate în perioada de coacere în masă a fructelor, precum și productivitatea soiurilor de tomate studiate. Procentul plantelor infectate a celor patru soiuri de tomate a fost calculată și comparată folosind criteriul Fisher. S-a stabilit o diferență semnificativă în rata infectării cu '*Ca*. P. solani' între cele patru soiuri de tomate, cu o diferență notabilă între cel mai rezistent soi (Cerasus, 25,0% din plantele infectate) și cel mai sensibil (Mary Gratefully, 91,7% din plantele infectate) ($P < 0,05$). Soiurile Elvira (50,0% din plantele infectate) și Deșteptarea (58,3% din plantele infectate) s-au situat într-o poziție intermediară în ceea ce privește distribuția infecției.

Compararea datelor privind cuantificare a '*Ca.* P. solani' în fructele diferitor soiuri de tomate și distribuția fitoplasmei în câmp au demonstrat o concordanță parțială a rezultatelor. Atât concentrația de fitoplasmă, cât și procentul plantelor infectate a fost mai jos la soiul Cerasus și ridicat la soiul Mary Gratefully, indicând o similitudine. În cazul soiului Elvira, acești indicatori au prezentat o concordanță a rezultatelor. Pe de altă parte, deși fructele soiului Deșteptarea au înregistrat o concentrație foarte scăzută de fitoplasmă, s-a observat un procent relativ mare de plante infectate în câmp.

Astfel, deși un procent mare de plante a soiului Deșteptarea au fost infectate cu '*Ca*. P. solani', cantitatea de infecție în fructele din acest soi a fost redusă. Nivelul scăzut al '*Ca*. P. solani' în fructele acestui soi s-ar putea datora unui răspuns imun al plantelor la această infecție. Prin urmare, natura unui astfel de răspuns necesită un studiu suplimentar. Acest răspuns ar putea fi asociat cu unele trăsături genetice și metabolice ale genotipului, de exemplu, căile de semnalizare hormonală studiate pentru boala stolbur la plantele de tomate sau capacitatea plantelor infectate cu fitoplasmă de a se recupera. Randamentul fructelor comercializabile la soiul Deșteptarea a fost foarte mare, sugerând că fructele colectate de la plantele cu concentrație scăzută de agent patogen sunt de o bună calitate (Tabelul 4.2), [19].

Tabelul 4.2. Indicii de productivitate la soiurile de tomate analizate în anii 2018 și 2019

Soiul	Productivitatea, t/ha				Procentul fructelor comercializabile., %	
	Total		Fructe comercializabile			
	2018	2019	2018	2019	2018	2019
Elvira	58,0	23,1	40,1	20,3*	69,1	87,9
Mary Gratefully	73,0*	31,5*	59,5*	28,2*	80,2*	89,5
Cerasus	74,4*	31,7*	60,9*	29,6*	84,6*	93,4*
Deșteptarea	67,8*	30,2*	50,9*	29,8*	75,0*	98,7*

* diferență semnificativă cu Elvira, $P<0.05$

Soiul Cerasus a demonstrat cei mai înalți indicatori de rezistență la '*Ca*. P. solani' în condițiile nefavorabile ale anului 2019. Soiurile Elvira și Mary Gratefully au fost mai susceptibile

la fitoplasmă și, în consecință, calitatea fructelor acestora a fost mai joasă. O corelație puternică între concentrația scăzută a fitoplasmei în fructe și randamentul fructelor de calitate a fost observată la soiul Deșteptarea. Analiza corelațională a fost realizată cu ajutorul programei Excel. Proporția fructelor comercializabile a fost cea mai mare la acest soi, în ciuda răspândirii largi a infecției în câmpul experimental. Astfel, perechea de primeri selectată poate fi folosită pentru cuantificarea '*Ca*. P. solani' în tomate, cu condițiile optime stabilite anterior, pentru testarea a patru soiuri de tomate cu rezistență contrastă la infecția cu fitoplasmă. Metoda PCR în timp real poate fi utilizată cu succes pentru detectarea infecției cu fitoplasmă și pentru cuantificarea acesteia, precum și pentru a compara rezistența soiurilor de tomate la fitoplasmă. Există potențialul de utilizare a acestei metode cu scopul de a detecta și cuantifica patogenul '*Ca*. P. solani' în alte culturi agricole, nu doar în tomate.

4.3.2. Analiza PCR prin diluarea serială a ADN-ului izolat din tomate la prezența fitoplasmei

Analiza PCR prin diluția în serie a ADN-ului a fost efectuată pentru a cuantifica agentul patogen în tomatele soiurilor Elvira, și Mary Gratefully. Metoda dată constă în aplicarea unei serii de diluții succesive a ADN-ului izolat din fructele de tomate. Conform rezultatelor obținute putem constata că cantitatea ADN-ului din proba soiului Elvira este mai mică comparativ cu probele de ADN izolate din soiul Mary Gratefully. Aceste rezultate se regăsesc și în cazul analizei *Real-time* PCR pentru determinarea cantitativă a patogenului '*Ca.* P. solani' la soiurile de tomate. Drept urmare, tehnica PCR prin diluarea serială a ADN-ului este sigură pentru a cuantifica patogenul în unele soiuri. Astfel, putem concluziona că analiza cu ajutorul PCR prin diluarea în serie a ADN-ului poate fi utilizată ca metodă alternativă pentru a cuantifica '*Ca*. P. solani' în plante de tomate. De asemenea, considerăm că această metodă este o abordare eficientă și relativ ieftină, în special dacă este necesară analiza în masă.

4.4. Compararea secvențelor nucleotidice a fitoplasmei și stabilirea tulpinilor '*Ca.* P. solani' prezente în tomate

În urma analizei datelor obținute, au fost selectate 3 probe de ADN cu concentrații necesare pentru realizarea secvențierii (Figura 4.9). Produsele PCR amplificate din cele trei probe colectate în decursul a trei ani de studiu (2018, 2019, 2020), au fost apoi externalizate pentru purificare prin extracție din gel și secvențiere directă în ambele direcții, folosind primerii R16F2n/R2, către compania CeMIA din Grecia.

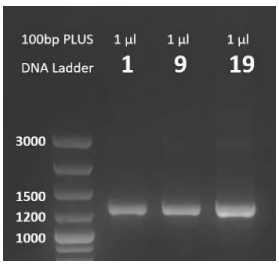


Figura 4.9. Probele de ADN cu concentrații optimale pentru realizarea secvențierii

Secvențele de ampliconi ale probelor pentru cei trei ani s-au dovedit a fi identice între ele. Aceste secvențe au fost comparate într-o analiză de căutare BLAST cu secvențe din diferite zone geografice disponibile în GenBank. Compararea a dezvăluit că secvența genei ribozomale a fitoplasmei care a infectat plantele de tomate în 2018 și 2019 în Moldova, a împărtășit o identitate de 100% cu 97 de secvențe de '*Ca*. P. solani'.

Identificarea moleculară a '*Ca*. P. solani' la tomate a fost efectuată pentru prima dată în Moldova, iar studiul prezent a demonstrat prezența '*Ca*. P. solani' în tomatele simptomatice din țară. Două secvențe de nucleotide stabilite au fost înregistrate în baza de date mondială NCBI GenBank (numerele de acces OQ275003 și OQ275004) [19].

Astfel, analiza secvențelor ADN a arătat o identitate completă cu șiruri de secvențe disponibile în NCBI din mai multe țări europene (România, Bulgaria, Serbia, Polonia, Cehia, Italia) și din Rusia, Turcia, Iran și China. Aceasta sugerează că tulpina ar putea proveni din aceste țări.

V. ANALIZA TRANSMITERII A FITOPLASMEI PRIN STUDIUL INFECTĂRII MATERIALULUI SEMINCER ȘI AL GAZDELOR INTERMEDIARE

5.1. Determinarea posibilității transmiterii fitoplasmei prin semințe

Posibilitatea transmiterii fitoplasmei prin semințe a fost studiată la patru soiuri autohtone de tomate. Pentru studiu au fost crescute semințele a patru soiuri de tomate: Elvira, Cerasus, Mary Gratefully și Deșteptarea. Adiacent, acestor probe au fost analizate semințele extrase din fructul nr. 41 a soiului Elvira infectat cu fitoplasma. În continuare, a fost realizat diagnosticul semințelor și a plantulelor de tomate crescute în termostat la prezența fitoplasmei. Pentru fiecare probă, au fost luate câte 15 semințe. Analiza *nested*-PCR s-a efectuat cu primerii chaperonin cpn200F/R și s-a constatat prezența infecției în toate semințele soiurilor de tomate. Pe când, în urma analizei plantelor crescute în condiții de termostat, s-a stabilit lipsa infecției '*Ca.* P. solani' în toate probele analizate, inclusiv și în proba nr. 41 (Figura. 5.1).

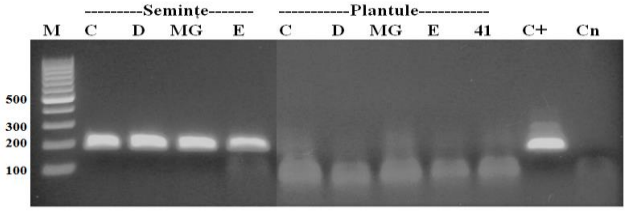


Figura 5.1. Rezultatele *nested*-PCR la prezența infecției '*Ca.* P. solani' în semințe și plantule de tomate. M – marcher molecular; Cn – control negativ al amplificării

Principala concluzie a acestui studiu este că stolburul nu este transmis prin semințele soiurilor de tomate analizate [20].

5.2. Identificarea fitoplasemei în insectele din ordinul Hemiptera–potențiali vectori

Studiul molecular privind infestarea insectelor și, simultan, al tomatelor cu patogenul '*Ca*. P. solani' s-a realizată în 4 faze distincte: perioada de creștere a răsadului în solar (sfârșitul lunii mai); 2 – perioada de înflorire în masă - începutul legării fructelor (primele zile a lunii iunie); 3 – etapa de maturare a fructelor de tomate (iulie - august); 4 – sfârșitul perioadei de vegetație a plantelor de tomate în câmp (septembrie) (Tabelul 5.1) [21].

Tabelul 5.1. Determinarea patogenului '*Ca.* P. solani' la insecte pe parcursul sezonului de vegetație a tomatelor

Etapa	Etapa de vegetație /Luna	Numărul insectelor		% insectelor infectate	% tomatelor infectate
		Analizate	Infectate		
I	Creșterea răsadului în solar (sfârșitul lunii mai)	5	0	0	0
II	Înflorirea în masă (primele zile a lunii iunie)	25	0	0	0
III	Maturarea fructelor (iulie-august)	48	7	14.6	44.9
IV	Sfârșitul perioadei de vegetație (septembrie)	12	7	58.3	69.6

Analiza moleculară a fitoplasmei la 48 insecte prinse în lunile iulie și august a facilitat determinarea a patogenului doar la 7 insecte. Rezultatele sunt ilustrate în tabelul 5.1. Analiza moleculară a plantelor de tomate colectate în perioada lunilor iulie și august a indicat prezența infecției fitoplasmice la 44,9% din plante examinate.

În Figura 5.2 sunt ilustrate cicadele la care s-a diagnosticat că sunt putători ai infecției fitoplasmice în perioada de analiză iulie și august.



Figura 5. 2. Potențialele insecte-vector a *'Ca.* P. solani', colectate în lunile iulie și august

Analiza *nested*-PCR a stabilit prezența infecției fitoplasmice în 58,3% din insectele analizate la finele sezonului de vegetație (Tabelul 5.1). Diagnosticul molecular a permis determinarea unui procent ridicat de infecție cu stolbur și la plantele de tomate în perioada studiată, care a atins valoarea de 69,6%.

Insecte din ordinul Hemiptera, infectate cu '*Ca*. P. solani' în septembrie, sunt prezentate în figura 5.3.



Figura 5.3. Potențialele insecte-vector a *'Ca.* P. solani', colectate în luna septembrie

Examinând rezultatelor primite, se remarcă că în septembrie (la finele sezonului de vegetație), a avut loc o creștere procentuală considerabilă a răspândirii infecției '*Ca*. P. solani' la insecte în comparație cu lunile iulie și august. Respectiv, în urma diagnosticului molecular au fost determinate 7 insecte infectate cu fitoplasmă în iulie și august din 48, iar în septembrie tot 7 însă din 12. Astfel, procentual infectării cu fitoplasmă a insectelor de la 14,6% în lunile iulie și august a atins valoarea de 58,3% la sfârșitul sezonului de vegetație.

Datele primite în urma diagnosticului molecular ne sugerează prezența infecției fitoplasmice pe parcelele experimentale ale IGFPP începând cu luna iulie și cu o creștere a abundenței infecției în luna septembrie. Această tendință a fost observată și constatată atât în urma analizei moleculare a plantelor de tomate, cât și la cicade. Astfel, insectele din ordinul Hemiptera în care a fost determinată prezența patogenului, pot fi considerate ca potențiali vectori ai acestui patogen.

5.3. Analiza plantelor ruderale la prezența fitoplasmei

O importanță deosebită în studiul răspândirii fitoplasmei îl constituie analiza tuturor elementelor în lanțul de transmitere acestui patogen inclusiv a plantelor perene pe rădăcinile cărora iernează insectele vector. Screeningul molecular pentru determinarea fitoplasmei s-a efectuat la douăsprezece specii de buruieni: *Chenopodium album, Solanum nigrum, Daucus carota, Setaria viridis, Polygonum convolvulus, Potentilla reptans, C. arvensis, Polygonum aviculare, Calystegia sepium, Artemisia vulgaris, Urtica dioica, Sonchus oleraceus*. Materialul vegetal s-a colectat în apropierea câmpurilor experimentale ale institutului și lângă seră, în principal în ultima decadă a lunii august. Selecția acestor specii s-a bazat pe faptul că sunt cunoscute ca gazde naturale a '*Ca*. P. solani' în țările vecine [22].

În urma analizei moleculare s-au constatat condițiile optime pentru identificarea fitoplasmei la unele specii de buruieni. Metoda expres de extracție a ADN-ului a prezentat cele

mai sigure rezultate comparativ cu alte metode. Deși, utilizând metoda K-acetat a diagnosticat prezența patogenului la specia *S. nigrum*, fragmentul amplificat nu a fost evidențiat. Astfel, în cazul titrului scăzut al patogenului este posibilă obținerea rezultatelor fals-negative. După optimizarea diagnosticului molecular prezența infecției '*Ca*. P. solani' s-a stabilit la speciile *C. arvensis* și *S. nigrum*. *C. arvensis* este o plantă perenă și, prin urmare, poate fi considerată ca un rezervor important de infecție în regiune.

Tabel 5.2. Rezultatele analizei moleculare a fitoplasmei la unele specii de buruieni [23]



Nr.	Specia	Nr. plantelor	Organul	Prezența / Lipsa infecției
1	*Daucus corota*	27	tulpină	-
2	*Urtica dioca*	20	tulpină	-
3	*Convolvulus arvensis*	21	tulpină	+
4	*Artemisia vulgaris*	20	tulpină	-
5	*Potentilla reptans*	24	frunze	-
6	*Solanum nigrum*	14	tulpină	+
7	*Polygonum aveculare*	8	tulpină	-
8	*Polygonum convolvulus*	12	frunze	-
9	*Castygela sepium*	12	frunze	-
10	*Sonchus oleraceus*	6	tulpină	-
11	*Chemopodium album*	12	frunze	-
12	*Setaria viridis*	12	frunze	-

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMADĂRI

1. Analiza moleculară a '*Ca*. P. solani' în plantele a 4 soiuri de tomate a fost realizat în decursul a trei ani. Soiul Cerasus este mai rezistent în comparație cu soiul Elvira.
2. Genotipurile care sunt susceptibile la infecția '*Ca*. P. solani', în funcție de condițiile climatice ale anului, s-au dovedit a fi Mary Gratefully și Deșteptarea.
3. Sensibilitatea diferențiată a soiurilor analizate la '*Ca*. P. solani' este demonstrată mai clar la etapa coacerii fructelor în masă, la materialul vegetal colectat în luna august. Perioada de maturare în masă a fructelor este cea mai potrivită pentru estimarea rezistenței soiurilor de tomate la fitoplasmă.
4. Infecția fitoplasmică nu a fost determinată la formele spontane de tomate. Forma spontană *S. habrochaites* poate fi utilizată ca martor, deoarece plantele speciei date nu au fost afectate cu '*Ca*. P. solani'.
5. Rezistența diferențiată la fitoplasmoză evaluată prin metoda *nested*-PCR a fost confirmată prin *Real-time* PCR. Ca metodă alternativă pentru a cuantifica '*Ca*. P. solani' poate fi utilizat PCR prin diluarea serială a ADN-ului.
6. Diagnosticul la prezența '*Ca*. P. solani' a semințelor și a plantulelor de tomate crescute în condiții controlate a constatat lipsa transmiterii infecției fitoplasmice la genotipurile locale analizate.
7. Infecția '*Ca*. P. solani' a fost determinată în unele insecte din ordinul Hemiptera în lunile august și septembrie, pe câmpurile experimentale ale IGFPP. Insectele din ordinul Hemiptera, în care

a fost identificată infecția '*Ca*. P. solani', pot fi considerate ca potențiali vectori ai acestui agent patogen.

8. Patogenul '*Ca*. P. solani' a fost identificată la cicade în special la sfârșitul perioadei de vegetație, pe când la începutul sezonului de vegetație aceasta nu a fost determinată.
9. Analiza *nested*-PCR a '*Ca*. P. solani' la 12 specii de buruieni a stabilit prezența patogenului la două specii *Convolvulus arvensis* și *Solanum nigrum*. Specia *C. arvensis* fiind plantă perenă, poate fi considerată ca rezervoar al infecției.
10. Secvențele nucleotidice obținute pe baza ADN-ul extras din tomatele afectate de stolbur, colectate în decursul anilor 2018-2020 sunt în totalmente similare între ele.
11. Fragmentele secvențiate sunt complet identice cu cele raportate în baza de date NCBI ce au fost detectate în numeroase state europene (Romania, Polonia, Bulgaria, Italia, Serbia, Cehia), precum și în Rusia, Turcia, China ș.a.

Se recomandă:

1. Soiul Cerasus, împreună cu forma sălbatică *Solanum habrochaites*, pot fi recomandate pentru includerea în programele de ameliorare pentru crearea soiurilor sau hibrizilor de tomate rezistenți la fitoplasme.
2. Metoda de izolare a ADN-ului în soluție alcalină poate fi utilizată în evaluarea rapidă și sigură a rezistenței tomatelor la stolbur.
3. Diagnosticul molecular al 12 probe din cadrul unui soi permite obținerea datelor statistic veridice în luna august. Totuși, în cazul analizei plantelor în iulie și septembrie este necesar un eșantion numeric mai mare, de aproximativ 20 probe individuale de a ajunge la o semnificație statistică $P \leq 0,05$.

BIBLIOGRAFIE

1. **BAHȘIEV, A**., ZAMORZAEVA, I. Identificarea insectelor infectate cu fitoplasmă în decursul perioadei de vegetație a tomatelor. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2020, nr. 2 (341), pp. 86–91.
2. PUNJA, Z. K., DE BOER, S. H., SANFAÇON, H. Biotechnology and Plant Disease Management. Ed. I. UK: CABI, 2008. pp. 250–277. ISBN: 978-1845932886.
3. EFSA Panel on Plant Health (PLH). Scientific Opinion on the pest categorisation of *Candidatus* Phytoplasma solani. In: *EFSA*. 2014, vol. 12, pp. 14. [citat 18 Iunie 2019]. Disponibil: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2014.3924/pdf.
4. ROMANAZZI, G. et al. Induction of resistance in the control of phytoplasma diseases. In: *Petria*. 2009, vol. 19, nr. 3, pp. 113–129.
5. ZAMORZAEVA, I., **BAHȘIEV, A**., MIHNEA, N. Testarea primerilor creați pentru diagnosticul molecular al infecției fitoplasmice. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2016, nr. 2 (329), pp. 55–61.
6. XU, X. et al. Detection and characterization of phytoplasma associated with big bud disease of tomato in China. In: *Phytopathology*. 2013, vol.161, nr. 6, pp. 430–433.
7. WANG, K. *Molecular detection and identification of phytoplasmas and establishment of phytoplama-free clonal plants*. MS. 1997, pp. 2, 18.
8. BERTACCINI, A. Plants and phytoplasmas: when bacteria modify plants. In: *Plants*. 2022, vol. 11, nr. 1425, pp. 1–20.

9. FLUIT, A. C., VISSER, M. R., SCHMITZ F. J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. In: *Clinical Microbiology Reviews.* 2001, vol.14, nr.4, pp. 836–871.
10. **BAHŞIEV, A**. Diagnosticul molecular a fitoplasmelor asupra diferitor genotipuri de tomate. In: *Materialele conferinței a studenților și masteranzilor "Viitorul ne aparține"*, Ediția a VI-a, 21 aprilie 2016, Chișinău, Republica Moldova: Universitatea Academiei de Ştiinţe a Moldovei, 2016, pp. 14.
11. MARTIN H. Introduction to organic farming. "Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs". [online]. Canada: Ontario, 2009. pp. 1–5. [citat 20 Iulie 2019]. Disponibil: http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/09-077.htm.
12. CIOBANU, V., MUNTEANU N. Caracterizarea imuno-fiziologică a colecției de tomate pentru câmp deschis. In: *Academos*. 2014, nr. 4(35), pp. 111–115.
13. ВЛАСОВ, Ю.И., САМСОНОВА, Л.Н. Об устойчивости томатов к фитоплазменному заболеванию столбуру. In: *Вестник защиты растений*. 2000, vol. 2, pp. 26–28.
14. MITINA, I., **BAHSIEV, A**., MITIN, V., ZAMORZAEVA, I. QPCR detection and quantification of '*Candidatus* Phytoplasma solani' in tomato with primers targeting cpn60 gene. In: *Materialele conferinței științifice internaționale "Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor"*, Ediția a VII-a, 4-5 octombrie 2021, Chişinău. Chişinău: "Print-Caro" SRL, 2021, pp. 79–82. ISBN 978-9975-56-912-5.
15. https://www.thermofisher.com/md/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html
16. https://www.thermofisher.com/md/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html
17. **БАХШИЕВ, А**., ЗАМОРЗАЕВА, И., МИХНЯ, Н. Молекулярная диагностика заражения некоторых молдавских сортов томата фитоплазмой. In: *Овощи России*. 2020, vol. 4, pp. 3–7.
18. ZAMORZAEVA, I., MITINA, I., **BAHSIEV, A**., MITIN, V., MIHNEA, N. Impact of "*Candidatus* Phytoplasma solani" presence on fruit quality of different Moldovan tomato varieties. In: *Phytopathogenic Mollicutes*. 2020, vol. 10, nr. 2, pp.166–172.
19. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A**. Identification of stolbur phytoplasma in tomato in Moldova. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2022, vol. 12, nr. 2, pp. 151–154.
20. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A**. Lack of stolbur transmission by seeds in some moldavian tomato and pepper varieties. In: *Materialele simpozionului ştiinţific internaţional "Protecţia plantelor - realizări şi perspective"*, 27-28 octombrie 2020, Chişinău. Chişinău: "Print-Caro" SRL, 2020, pp. 359–363. ISBN 978-9975-3472-0-4.
21. **BAHȘIEV, A**., ZAMORZAEVA, I. Identificarea insectelor infectate cu fitoplasmă în decursul perioadei de vegetație a tomatelor. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2020, nr. 2 (341), pp. 86–91.
22. BULGARI, D. et al. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, vol.77, pp. 5018–5022.
23. **BAHȘIEV, A**., ZAMORZAEVA, I. Optimizarea metodei de analiză moleculară a plantelor ruderale la prezența '*Candidatus* Phytoplasma solani'. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2022, nr. 3 (347), pp. 41–47.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE

Articole în reviste științifice

Articole în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

1. Zamorzaeva, I., **BAHȘIEV, A**. Identification of stolbur phytoplasma in tomato in Moldova. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2022, Issue 2, P. 151-154. **SCOPUS**
   DOI: http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2022.00057.3
2. **BAHSIEV, A.** Distribution of phytoplasma infection in weeds, insect vectors and tomato plants. *FEBS Open Bio*. 2022, vol. 12 (Suppl. S1), P. 161. (IF: 2.7). **SCOPUS, Web of Science**
   DOI: https://doi.org/10.1002/2211-5463.13440
3. **BAHSIEV, A.** Monitoring phytoplasma infection in tomato during two growing seasons. *FEBS Open Bio*. 2021, Volume 11. (Suppl. S1). P. 383-384. **SCOPUS, Web of Science**
   DOI: https://doi.org/10.1002/2211-5463.13205

4. ZAMORZAEVA, I., MITINA, I., **BAHSIEV, A.**, MITIN, V., MIHNEA, N. Impact of "*Candidatus* Phytoplasma solani" presence on fruit quality of different Moldovan tomato varieties. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2020, 10(2), P.166-172 (IF: 2.8). **SCOPUS**
   DOI: http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2020.00017.1
5. Zamorzaeva I., **Bahsiev A.**, Tumanova L. Optimal timing and sampling for reliable assessment of the resistance of tomato varieties to *Candidatus* Phytoplasma solani. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2019, 9(1), P. 159-160. (IF: 2.8). **SCOPUS**
   DOI: https://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00080.X
6. **БАХШИЕВ, А.** Молекулярная диагностика фитоплазмы в растениях томата, вьюнка и в насекомых. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021, 39(1-2), С.14-15 . (IF: 0.34). **SCOPUS, Web of Science**
   DOI: https://doi.org/10.17116/molgen2021390129
7. **БАХШИЕВ, А. Г.** Влияние метеорологических условий на распространение фитоплазмы у томатов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019, 37, спец. вып., С. 15. **SCOPUS, Web of Science**
   DOI: https://doi.org/10.17116/molgen2019s-tez. (IF: 0,36).
8. ZAMORZAEVA I., **BAHSIEV A.,** MIHNEA N. Spread of stolbur in some tomato varieties and indicators of their productivity. *SCIENTIFIC PAPERS-SERIES B-HORTICULTURE*. Bucharest, Romania, 2020, 64(2). P.273-278. **Web of Science**
9. ZAMORZAEVA-ORLEANSCAIA, I., **BAHSIEV, A.,** MIHNEA, N. Molecular diagnosis of Candidatus phytoplasma solani infection in some tomato genotypes at the different ontogeny stages. In: *Oltenia - studii si comunicari stiintele naturii*, 2017, nr. 1(33), pp. 48-52. ISSN 1454-6914. **Web of Science**
   https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/113847

Articole în reviste din alte baze de date acceptate de către ANACEC (cu indicarea bazei de date)

10. **BAHSIEV, A.**, ZAMORZAEVA I., MIHNEA N. Monitoring the spread of '*Candidatus* Phytoplasma solani' in moldavian tomato varieties. *Scientific Studies And Research*. Biology, 2023, V.32, Nr.1. P.12- 15. **EBSCO, PROQUEST**
11. **БАХШИЕВ, А.Г., ЗАМОРЗАЕВА**, И.А., МИХНЯ, Н.И. Молекулярная диагностика заражения некоторых молдавских сортов томата фитоплазмой. *Овощи России*. 2020, (4), С. 3-7. **EBSCO, DOAJ**
    DOI: https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-88-92

Articole în reviste din Registrul Naţional al revistelor de profil (cu indicarea categoriei)

12. **BAHȘIEV, A.**, Zamorzaeva I. Optimizarea metodei de analiză moleculară a plantelor ruderale la prezența '*Candidatus* Phytoplasma solani'. *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*, 2022, nr. 3, P. 41–47. ISSN 1857-064X. **Categoria B**
    DOI: https://doi.org/10.52388/1857-064X.2022.3.04
    https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/176472
13. **BAHSIEV, A**, ZAMORZAEVA, I. Identificarea insectelor infectate cu fitoplasmă în decursul perioadei de vegetație a tomatelor. *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*, Chișinău, 2020, nr. 2, P. 86-91. ISSN 1857-064X. **Categoria B**
    https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/121105
14. **ZAMORZAEVA I., BAHSIEV A.**, MIHNEA N. Diagnosticul molecular al infecţiei fitoplasmice la etapa de maturare a fructelor de tomate. *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*, 2018, nr. 1, P.81-88. ISSN 1857-064X. **Categoria B**
    https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/63249
15. ZAMORZAEVA I., **BAHȘIEV A.**, MIHNEA N. Testarea primerilor creați pentru diagnosticul molecular al infecției fitoplasmatice. *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii,* 2016, nr. 2(329), P. 55-61. ISSN 1857-064X.
    https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/47019

Articole în lucrările manifestațiilor ştiinţifice incluse în *Registrul materialelor publicate în baza manifestațiilor științifice organizate din Republica Moldova*

Articole în lucrările conferințelor internaționale

16. MITINA, I., **BAHSIEV, A.,** MITIN, V., ZAMORZAEVA, I. QPCR detection and quantification of '*Candidatus* Phytoplasma solani' in tomato with primers targeting cpn60 gene. În: *Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor*, Ed. 7, 4-5 octombrie 2021, Chişinău. Chişinău: "Print-Caro" SRL, 2021, Ediția 7, P. 79-82. ISBN 978-9975-56-912-5. **IBN**

DOI: https://doi.org/10.53040/gppb7.2021.20
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/139481

17. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A.** Lack of stolbur transmission by seeds in some moldavian tomato and pepper varieties. In: *Protecţia plantelor - realizări şi perspective*, Ed. 57, 27-28 octombrie 2020, Chişinău. Chisinau: "Print-Caro" SRL, 2020, nr.57, P. 359-363. ISBN 978-9975-3472-0-4. **IBN, CrossRef**
DOI: https://doi.org/10.53040/9789975347204.86
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/112492
18. ZAMORZAEVA I., **BAHSIEV A.,** BELOUSOVA G., CUZNETOVA I., IGNATOVA Z., TUMANOVA L. Molecular diagnosis of phytoplasma in some agricultural crops in Moldova. In: *Aspecte ameliorative în ameliorarea plantelor*, 6 septembrie 2018, Pașcani. 2018, P. 589-596. **IBN**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/93908
19. **BAHŞIEV A.,** ZAMORZAEVA I., MIHNEA N. Diagnosticul molecular al fitoplasmei la soiurile de tomate Elvira și Cerasus. In: *Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor: conferinţă ştiinţifică internaţională*, Ed. 6, 23-24 octombrie 2017, Chişinău. Chişinău. "Print-Caro" SRL, 2017, Ediția 6, P. 13-15. ISBN 978-9975-56-463-2. **IBN**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/89901

Articole în lucrările conferințelor naționale cu participare internațională

20. Михня, Н.И., **БАХШИЕВА, А.Г**. Фенотипическая изменчивость некоторых морфо-биологических признаков томатов. In: Materialele ale Conferinței științifico-practice republicane cu participare internațională *„Securitatea alimentară a Transnistriei”*, 25 noiembrie 2021.Tiraspol, 2022, P.175-181.

Articole în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (peste hotare)

21. **BAHŞIEV, A.,** ZAMORZAEVA-ORLEANSCAIA, I. Estimation of '*Candidatus* Phytoplasma solani' prevalence in local tomato varieties. In: *Biology and sustainable development*, Ed. 21, 23 noiembrie 2023, Bacău. Bacău: 2023, Ediția 21, P. 69. **IBN**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/193898
22. ЗАМОРЗАЕВА, И., **БАХШИЕВ, А.** Молекулярная диагностика распространения столбура в некоторых важных для сельскогохо зяйства Молдовы культурах. In: *Агрофизический институт: 90 лет на службе земледелия и растениеводства*, 14-15 aprilie 2022, Санкт-Петербург. Санкт-Петербург: ФГБНУ АФИ, 2022, P. 509-513. ISBN 978-5-905200-48-9. **eLIBRARY**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/167171
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/143122
23. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A.,** MIHNEA, N. 2020. Spread of stolbur in some tomato varieties and indicators of their productivity. In: Agriculture for life, life for agriculture : The intern. conf. Univ. of agron. sci. and veterinary med. of Bucharest, 4-6 June 2020 : book of abstr. Sect. 2. Horticulture. Bucharest, 2020, P. 109. ISSN 2457-3213.
https://horticulturejournal.usamv.ro/pdf/2020/issue_2/Art38.pdf
24. **BAHSIEV A.**, ZAMORZAEVA I. Detection of ′*Candidatus* Phytoplasma solani′ and ′*Candidatus* Phytoplasma asteris′ infection at insects during the tomato growing season. Research leadership. Rusia. P 115-124. **eLIBRARY**
https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44382606&pff=1
25. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A.,** MIHNEA, N. Spread of phytoplasma infection in the tomato field depending on the climatic conditions of the year. In: *Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего: Посвящено памяти академика Е.И. Ермакова*, Ed. 2, 2-4 octombrie 2019, St. Petersburg. Russia: ФГБНУ АФИ, 2019, Ediția 2, P. 662-668. ISBN 978-5-905200-40-3.
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/150567
26. ZAMORZAEVA I., **BAHSIEV A.**, MIHNEA N. *Ca. P. solani* infection in tomato plants depending on the method of sowing and conditions of growth. In: *Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего*, Saint-Petersburg, Rusia, 27-29 septembrie 2017, P.123-128. ISBN978-5-905200-34-2. **eLIBRARY**
https://www.agrophys.ru/Media/Default/Conferences/ARI85/Sbornik_Materialov.pdf
27. ЗАМОРЗАЕВА И., **БАХШИЕВ А.** Надежность выявления столбура у томата при экспресс-методе выделения ДНК. In: *Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском*

хозяйстве России, СНГ и ЕС, 9-12 august 2016, Большие Вяземы. Большие Вяземы: Печатный город, 2016, Vol.1, P. 479-489. ISBN 978-5-98467-015-9.
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/150671

Teze în lucrările manifestațiilor ştiinţifice incluse în *Registrul materialelor publicate în baza manifestațiilor științifice organizate din Republica Moldova*

Teze în lucrările conferințelor internaționale

28. **BAHSIEV, A.,** MITIN, V., MITINA, I., ZAMORZAEVA, I. Assessment of the load of tomato plants by phytoplasma. In: *International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova*, Ed. 11, 15-16 iunie 2021, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Centrul Editorial-Poligrafic al Universităţii de Stat din Moldova, 2021, Ediția 11, P. 18. ISBN 978-9975-933-56-8. **IBN**
DOI: https://doi.org/10.53040/cga11.2021.002
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/132674

Teze în lucrările conferințelor naționale cu participare internațională

29. **BAHSIEV A.,** ZAMORZAEVA I., MIHNEA N. Distribution of '*Candidatus* Phytoplasma solani' in local tomato varities. In: *Natural sciences in the dialogue of generations*, 14-15 septembrie 2023, Chişinău. Chişinău.: CEP USM, 2023, P. 21. ISBN 978-9975-3430-9-1. **IBN**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/188805
30. **BAHSIEV, A.,** ZAMORZAEVA, I. Molecular diagnosis of phytoplasma in the wild tomato species *Solanum habrochaites*. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*, Ed. 2, 29-30 septembrie 2022, Chişinău. Chişinău. Republica Moldova: USM, 2022, P. 21. ISBN 978-9975-159-80-7. **IBN**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/167223
31. **BAHŞIEV, A.,** MITIN, V., ZAMORZAEVA, I. Testarea primerilor specifici pentru detecția '*Candidatus* Phytoplasma solani'. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective: Simpozionul ştiinţific naţional cu participare internaţională*, Ed. 5, 21-22 octombrie 2019, Chişinău. Chișinău. Republica Moldova: Centrul Editorial-Poligrafic al USM, 2019, Editia a V-a, P. 9. ISBN 978-9975-56-695-7. **IBN, CrossRef**
DOI: https://doi.org/10.53040/9789975566957.04
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/94085
32. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A.,** MIHNEA, N. Estimation of phytoplasmosis and productivity in some moldavian tomato varieties. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective: Simpozionul ştiinţific naţional cu participare internaţională*, Ed. 5, 21-22 octombrie 2019, Chişinău. Chișinău. Republica Moldova: Centrul Editorial-Poligrafic al USM. 2019, Editia a V-a, P. 21. ISBN 978-9975-56-695-7. **IBN, CrossRef**
DOI: https://doi.org/10.53040/9789975566957.16
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/94102
33. **BAHŞIEV, A.** Analiza moleculară a *Candidatus Phytoplasma solani* la etape timpurii de dezvoltare a tomatelor și la insectele vector. In: *Sesiune naţională de comunicări ştiinţifice studenţeşti: Ştiinţe ale naturii şi exacte*, 4-5 mai 2017, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Centrul Editorial-Poligrafic al USM, 2017, SNE, P. 12-14. **IBN**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/60309
34. **BAHŞIEV, A.** Molecular detection of phytoplasma in tomato seeds and seedlings. In: *Viitorul ne aparţine*, 27 aprilie 2017, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Universitatea Academiei de Ştiinţe a Moldovei, 2017, Ediția 7, P. 11. ISBN 978-9975-3036-5-1. **IBN**
https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/67005
35. **BAHŞIEV, A.** Diagnosticul molecular a fitoplasmelor asupra diferitor genotipuri de tomate. In: *Viitorul ne aparţine*, Ed. 6, 6-7 octombrie 2016, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Universitatea Academiei de Ştiinţe a Moldovei, 2016, Ediția 6, P. 14. ISBN 978-9975-3036-5-1. **IBN**
https://ibn.idsi.md/en/vizualizare_articol/67151/dublincore
36. **BAHŞIEV, A.** Detectarea speciei de fitoplasmă la diferite genotipuri de *Solanum lycopersicum* pe loturile experimentale a IGFPP. În: *Sesiune naţională de comunicări ştiinţifice studenţeşti: Ştiinţe ale naturii şi exacte Ştiinţe juridice şi economice*, 21-22 aprilie 2016, Chişinău. Chişinău, 2016: CEP USM, 2016, 2016, SNE, SJE, P. 7-8. **IBN** https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/77016

ADNOTARE

Bahșiev Aighiuni, "Diagnosticul molecular al fitoplasmei la diferite soiuri de tomate autohtone", teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2024.

Structura tezei: Introducere, 5 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie din 156 de titluri, 4 anexe, 99 de pagini text de bază, 59 figuri, 14 tabele. Rezultatele cercetării au fost publicate în 39 publicații științifice.

Cuvinte-cheie: '*Candidatus* Phytoplasma solani', diagnostic molecular, tomate, perioadă de vegetație, stolbur, rezistență, *nested*-PCR, insecte vector, plante ruderale.

Domeniu de studiu: 162.01. Genetică vegetală

Scopul lucrării: Determinarea sensibilității genotipurilor locale de tomate la infecția '*Ca.* P. solani' și studierea răspândirii acesteia utilizând metode moleculare.

Obiectivele cercetării: Detectarea moleculară a repartizării şi a gradului de atac al infecţiei fitoplasmice la plantele de tomate ale unor soiuri autohtone pe parcursul perioadei de vegetaţie; Identificarea etapei pentru determinarea diferenței în sensibilitate la infecția fitoplasmică; Determinarea fitoplasmei la 4 forme spontane de tomate; Elaborarea și optimizarea sistemului de diagnostic al '*Ca.* P. solani' la tomate, insecte vector și plante ruderale; Analiza comparativă a metodelor (*nested*-PCR, RT-PCR, PCR) prin diluarea în serie a ADN-ului) pentru determinarea sensibilității la infecția fitoplasmică a soiurilor autohtone de tomate; Secvențierea a fragmentelor a genei 16S ARNr cu scopul determinării tulpinilor '*Ca.* P. solani' pe loturile experimentale; Determinarea posibilității transmiterii stolburului prin materialul semincer la soiurile analizate; Determinarea infecţiei fitoplasmice la insectele din ordinul Hemiptera (insectele vector) și plante ruderale cu scopul analizei stării epidemiologice a '*Ca.* P. solani' pe câmpurile experimentale.

Noutatea şi originalitatea ştiinţifică: Pentru prima dată în Republica Moldova, a fost determinată prin metode moleculare prezența fitoplasmei la soiurile de tomate autohtone. Prin secvențierea ADN-ului patogenului a fost identificată tulpina '*Ca.* P. solani' ce infectează tomatele.

Rezultatul obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în: Determinarea metodelor de minimizare a răspândirii '*Ca.* P. solani' la tomatele autohtone prin utilizarea genotipurilor rezistente.

Semnificația teoretică: Sensibilitatea diferită a soiurilor autohtone la infecția fitoplasmică a fost confirmată prin metode moleculare. S-a determinat că perioada de maturare în masă a fructelor este cea mai potrivită pentru estimarea rezistenței soiurilor de tomate la stolbur. Lipsa transmiterii infecției fitoplasmice prin semințe la genotipurile locale de tomate a fost constatată în condiții controlate. S-a realizat secvențierea fragmentelor genei 16S ARNr a '*Ca.* P. solani'. Două secvențe de ADN specifice pentru '*Ca.* P. solani' identificate în tomate în Republica Moldova s-au plasat în Banca de Gene Mondială (NCBI). Creșterea numerică semnificativă a cicadelor infectate cu '*Ca*. P. solani' a fost determinată la sfârșitul perioadei de vegetație a tomatelor.

Valoarea aplicativă: Rezultatele obținute permit de a propune soiul Cerasus, împreună cu forma spontană *Solanum habrochaites*, pentru includerea în programele de selecție pentru crearea soiurilor sau hibrizilor de tomate rezistenți la stolbur. Metoda alcalină expres de extragere a ADN-ului poate fi utilizată în evaluarea rapidă și sigură a rezistenței tomatelor la fitoplasmoză. A fost elaborată schema diagnosticului molecular al fitoplasmei la tomate.

Implementarea rezultatelor științifice: Datele obținute în lucrare servesc în calitate de material ştiinţifico-didactic la predarea cursului de Fitopatologie. Primerii se recomandă a fi utilizați în testarea sensibilității germoplasmei de tomate la '*Ca.* P. solani'.

АННОТАЦИЯ

диссертация **«Молекулярная диагностика фитоплазмы у различных местных сортов томата»,** представленная **Бахшиев Айгюнь** на сойскание степени доктора биологических наук по специальности – **162.01. Генетика растений**

Кишинев, 2024.

Структура диссертации: Работа включает введение, 5 глав, выводы и рекомендации, библиографию из 156 наименований, 4 приложения, 99 страниц основного текста, 59 рисунков, 14 таблиц. Результаты исследований были опубликованы в 39 научных работах.

Ключевые слова: *'Candidatus* Phytoplasma solani′, молекулярная диагностика, томат, столбур, устойчивость, вегетационный период, нестед-ПЦР, насекомые-переносчики, сорняки.

Цель работы: Определение молекулярными методами чувствительности местных генотипов томата к инфекции '*Ca*. P. solani' и изучение ее распространения.

Задачи исследования: Молекулярная диагностика распространения фитоплазмоы и степени поражения фитоплазмозом растений томатов местных сортов в течение вегетационного периода; Идентификация стадии развития растений для наиболее точного определения разницы в чувствительности к фитоплазменной инфекции; Тестирование фитоплазмы у 4 диких видов томатов. Разработка и оптимизация системы диагностики '*Ca*. P. solani' у томатов, насекомых-векторов и растений-сорняков; Сравнительный анализ методов (нестед-ПЦР, ПЦР в реальном времени, ПЦР с использованием серийного разведения ДНК) для определения чувствительности местных сортов томатов к фитоплазменной инфекции; Секвенирование фрагментов гена 16S рРНК с целью идентификации штаммов '*Ca*. P. solani', присутствующих в растениях томата на экспериментальных участках; Изучение возможности передачи столбура через семенной материал анализируемых сортов; Определение фитоплазменной инфекции у насекомых из отряда Hemiptera (насекомые-векторы) и многолетних растений с целью мониторинга эпидемиологического состояния '*Ca*. P. solani' на экспериментальных полях.

Научная новизна и оригинальность: Впервые в Республике Молдова было доказано молекулярными методами наличие столбура у местных сортов томатов. Также был идентифицирован штамм '*Ca*. P. solani', заражающий томаты, путем секвенирования фрагмента ДНК.

Решённая научная проблема: состоит из определения подходов снижения распространения '*Ca*. P. solani' у местных томатов за счет использования устойчивых генотипов.

Теоретическое значение работы: Различная чувствительность местных сортов к фитоплазменной инфекции была подтверждена молекулярными методами. Было определено, что период массового созревания плодов является наиболее подходящим для оценки устойчивости сортов томатов к фитоплазменной инфекции. Отсутствие передачи фитоплазменной инфекции через семена было установлено в контролируемых условиях у местных генотипов томатов. Было выполнено секвенирование фрагментов гена 16S рРНК '*Ca*. P. solani'. Две специфичных последовательности ДНК '*Ca*. P. solani', идентифицированных на томатах в Республике Молдова, были размещены в Мировом Банке Генов (NCBI). Значительное увеличение численности цикадок, зараженных *′Ca*. P. solani´, было отмечено в конце сезона вегетации томатов.

Прикладная ценность: Полученные результаты позволяют предложить сорт Cerasus и дикую форму Solanum habrochaites для включения в селекционные программы для создания сортов или гибридов томатов, устойчивых к столбуру. Экспресс-метод щелочной экстракции ДНК может быть использован для быстрой и надежной оценки устойчивости томатов к фитоплазмозу. Разработана схема молекулярной диагностики фитоплазмы у томатов.

Внедрение научных результатов: Полученные данные служат в качестве научно-дидактического материала при преподавании курса Фитопатологии. Разработанные праймеры рекомендуется использовать для тестирования чувствительности гермоплазмы томатов '*Ca*. P. solani'.

ANNOTATION

Of the thesis entitled **"Molecular diagnosis of phytoplasma in different local tomato varieties"**. Presented by the candidate **Bahsiev Aighiuni,** for obtaining the degree of Doctor in Biological Sciences with specialty – **162.01. Plant genetics.**

Chisinau, 2024

Structure of the thesis: Introduction, 5 chapters, conclusions and recommendations, a bibliography of 156 titles, 4 appendicies, 99 pages of basic text, 59 figures, 14 tables. The research results were published in 39 scientific papers.

Key words: '*Candidatus* Phytoplasma solani', molecular diagnostics, tomato, vegetative period, stolbur, resistance, nested-PCR, insect-vectors, weeds.

Research purpose: Determine the sensitivity of local tomato genotypes to '*Ca*. P. solani' infection of and to study its spread by molecular methods.

Research objectives: Molecular detection of phytoplasma spread and the degree of phytoplasma infection in tomato plant of local varieties during the vegetation period; Identification of plant development stage for the most reliable determination of the difference in sensitivity to phytoplasma infection. Testing phytoplasma presence in 4 wild tomato species. Development and optimization of a diagnostic system for '*Ca*. P. solani' in tomato, insect vectors, and weeds. Comparative analysis of methods (nested-PCR, RT-PCR, PCR, serial dilution of DNA) to determine the sensitivity of local tomato varieties to phytoplasma infection. Sequencing a 16S rRNA gene fragment to identify '*Ca*. P. solani' strains in experimental plots. Study of the possibility of stolbur transmission through the seed material of analyzed varieties. Determination of phytoplasma presence in insects of the Hemiptera order (insect vectors) and weeds to monitor the epidemiological state of '*Ca*. P. solani' in experimental fields.

Scientific novelty and originality: For the first time in the Republic of Moldova, the presence of stolbur in local tomato varieties was proven by molecular methods. The '*Ca*. P. solani' strain infecting tomato was identified by DNA sequencing.

An important scientific problem solved: Consists of determining aproaches to reduce the spread of '*Ca*. P. solani' in local tomato through using resistant genotypes.

The theoretical significance: The varied sensitivity of local varieties to phytoplasma infection was confirmed by molecular methods. It was determined that the mass fruit ripening period is the most suitable for assessing the resistance of tomato varieties to phytoplasma infection. The absence of infection transmission through seeds was established under controlled conditions in local tomato genotypes. Sequencing of the 16S rRNA gene fragment of '*Ca*. P. solani' was performed. Two specific DNA sequences to '*Ca*. P. solani' identified in tomato in the Republic of Moldova were placed in the Global Gene Bank (NCBI). A significant increase in the number of leafhoppers infected with '*Ca*. P. solani' was noted at the end of the tomato growing season.

The applicative value: The obtained results suggest that the Cerasus variety, and the wild species *Solanum habrochaites* can be included in breeding programs to create tomato varieties or hybrids resistant to stolbur. The alkaline DNA extraction express method can be used for rapid and reliable assessment of tomato resistance to stolbur. The scheme for the molecular diagnostic of phytoplasma presence in tomato was developed.

Implementation of the results: The obtained data serve as scientific didactic material for the teaching Phytopathology course. The developed primers are recommended for testing the sensitivity of tomato germplasm to '*Ca*. P. solani'.

BAHȘIEV Aighiuni

DIAGNOSTICUL MOLECULAR AL FITOPLASMEI LA DIFERITE SOIURI DE TOMATE AUTOHTONE

161. 01. Genetică vegetală

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 2 octombrie 2024 Formatul hârtiei: 60×84 1/16
Hârtie ofset. Tipar ofset. Tiraj: **35 ex.**
Coli de tipar: 2,25 Comanda 1/10-24

Tipografia «Tipocart Print» SRL
str. Alexandr Puskin, 22, of.523, Chișinău