UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

ŞCOALA DOCTORALĂ ŞTIINŢE ALE NATURII

Consorţiu: **Universitatea Stat din Moldova, Institutul de Dezvoltare a Societăţii Informaţionale, Universitatea de Stat „Bogdan Petriceicu Hasdeu" din Cahul**

Cu titlu de manuscris
CZU: 577.21.08:631.52:635.64(043.3)

BAHŞIEV AIGHIUNI

DIAGNOSTICUL MOLECULAR AL FITOPLASMEI LA DIFERITE SOIURI DE TOMATE AUTOHTONE

162.01. GENETICĂ VEGETALĂ

Teză de doctor în ştiinţe biologice

Conducător ştiinţific: **ZAMORZAEVA-ORLEANSCAIA Irina,**
doctor în ştiinţe biologice, conferenţiar cercetător

Autor: Bahsiev A. **BAHŞIEV Aighiuni**

CHIŞINĂU 2024

© Bahșiev Aighiuni, 2024

CUPRINS

ADNOTARE (în română, rusă și engleză).....6
LISTA TABELELOR.....9
LISTA FIGURILOR.....10
LISTA ABREVIERILOR.....13
INTRODUCERE.....15
1. ASPECTE GENERALE ALE '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA SPP'.....19
1.1. Caracteristici morfo-structurale ale fitoplasmei.....19
1.2. Genomul fitoplasmei.....22
1.3. Evoluția fitoplasmei.....25
1.4. Biologia fitoplasmei.....28
1.5. Interacțiunea fitoplasmei cu gazda.....29
1.6. Virulența fitoplasmei.....31
1.7. Simptomele infecției fitoplasmice la tomate.....33
1.8. Distribuția '*Ca.* P. solani'.....34
1.9. Controlul infecției fitoplasmice.....35
1.10. Detectarea fitoplasmei.....37
1.11. Concluzii la capitolul 1.....42
2. MATERIALE ȘI METODE.....43
2.1. Obiectele de studiu.....43
2.2. Caracteristica speciilor și soiurilor de tomate analizate.....43
2.2.1. Elvira.....43
2.2.2. Mary Gratefully.....43
2.2.3. Deșteptarea.....43
2.2.4. Cerasus.....44
2.2.5. Caracteristica formelor spontane de tomate analizate......44
2.3. Experiențe în câmp.....46
2.4. Colectarea cicadelor.....46
2.5. Germinarea semințelor de tomate.....47
2.6. Izolarea ADN-ului.....47
2.6.1. Izolarea ADN-ului din tomate cu DNA-zol.....48
2.6.2. Confirmarea calității ADN-ului izolat din tomate.....48
2.6.3. *Izolarea ADN-ului din cicade cu DNA-zol*.....48
2.6.4. Izolarea ADN-ului cu K-acetat.....48

2.6.5. Izolarea ADN-ului prin fierbere în soluție alcalină (metoda expres) 49
2.6.6. Izolarea ADN-ului cu utilizarea microundelor.....49
2.7. PCR.....49
2.8. *Nested*-PCR.....50
2.9. Electroforeza.....51
2.10. Schema elaborată pentru diagnosticul molecular al fitoplasmei la tomate.....52
2.11. *Real-Time* PCR.....52
2.12. Analiza statistică.....53
2.13. Concluzii la capitolul 2.....53
3. ELABORAREA ŞI EVALUAREA EFICACITĂŢII PROCEDEELOR DE DIAGNOSTIC MOLECULAR AL FITOPLASMEI LA TOMATE, PLANTE RUDERALE ȘI LA INSECTE.....55
3.1. Elaborarea și evaluarea metodelor moleculare de diagnostic al fitoplasmei la plantele de tomate.....55
3.1.1. Selectarea și compararea metodelor de extracție a ADN-ului din tomate.....55
3.1.2. Eficiența metodei de extracție a ADN-ului cu microunde.....56
3.2. Selectarea condițiilor pentru analiza PCR la tomate.....57
3.2.1. Compararea rezultatelor obținute prin analiza PCR și nested-PCR cu primeri chaperonine.
.....58
3.2.2. Testarea perechilor de primeri chaperonine ps specifici pentru 'Ca. P. solani' în analiza nested-PCR.....59
3.2.3. Testarea eficienței primerilor chaperonine ps specifici pentru 'Ca. P. solani' pentru analiza PCR.....60
3.3. Selectarea condițiilor optimale pentru realizarea electroforezei în gel de agaroză a fragmentelor amplificate specifice pentru '*Ca*. P. solani' 62
3.4. Selectarea condițiilor pentru diagnosticul veridic '*Ca.* P. solani' la insectele vector.....62
3.5. Analiza cantitativă *Real-Time* PCR.....63
3.6. Concluzii la capitolul 3.....66
4. DIAGNOSTICUL MOLECULAR A '*CA.* P. SOLANI' LA DIFERITE GENOTIPURI DE TOMATE PE PARCURSUL A TREI ANI DE VEGETAȚIE.....68
4.1. Diagnosticul molecular al fitoplasmei la plantele de tomate din câmp în anul 2018.....68
4.2. Diagnosticul molecular al fitoplasmei la plantele de tomate din câmp în anul 2019.....69
4.3. Diagnosticul molecular al fitoplasmei la plantele de tomate din câmp în anul 2020.....72

4.4. Analiza comparativă a gradului de distribuție a fitoplasmei la tomate în decursul a trei ani de vegetație....73
4.2. Analiza formelor spontane de tomate la prezența fitoplasmei....78
4.3. Analiza cantitativă a infecției fitoplasmice în fructele de tomate....80
4.3.1. Analiza cantitativă Real-Time PCR....80
4.3.2. PCR prin diluarea serială a ADN-ului izolat din tomate la prezența fitoplasmei....82
4.4. Compararea secvențelor nucleotidice a fitoplasmei și stabilirea tulpinilor '*Ca*. P. solani' prezente în tomate....84
4.5. Concluzii la capitolul 4....86
5. ANALIZA TRANSMITERII A FITOPLASMEI PRIN STUDIUL INFECTĂRII MATERIALULUI SEMINCER ȘI AL GAZDELOR INTERMEDIARE 88
5.1. Determinarea posibilității transmiterii fitoplasmei prin materialul semincer....88
5.2. Identificarea fitoplasmei în insectele din ordinul Hemiptera–potențiali vectori....90
5.3. Analiza plantelor ruderale la prezența fitoplasmei....93
5.4. Concluzii la capitolul 5....97
CONCLUZII GENERALE....98
RECOMANDĂRI....99
BIBLIOGRAFIE....100
ANEXE....113
ANEXA 1. Secvențele specifice ale genei ribozomale '*Ca*. P. solani'....113
ANEXA 2. Rezultatele testării primerilor n65-n66 pentru analiza *Real-Time* PCR....115
ANEXA 3. Analiza moleculară a plantelor ruderale la prezența '*Ca*. P. solani'....116
ANEXA 4. Temperatura și cantitatea de precipitații medii în perioada de vegetație 2018, 2019 și 2020 117
DECLARAŢIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII....118
DIPLOME ȘI DISTINCȚII....119
CV-ul AUTORULUI....132

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

Бахшиев Айгюнь, «Молекулярная диагностика фитоплазмы у различных местных сортов томата», диссертация на звание кандидата биологических наук, Кишинэу, 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.

Область исследований: 162.01. Генетика растений

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 важная 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.

Практическое значение работы: 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

Bahsiev Aighiuni, "Molecular diagnosis of phytoplasma in different local tomato varieties", PhD thesis in biological sciences, 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 area: 162.01. Plant genetics

The purpose of the work: 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.

The novelty of the research: 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 of the work: 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 practical significance of the work: 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 scientific 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'.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1. Clasificarea fitoplasmelor conform profilului RFLP.....21

Tabelul 1.2. Caracteristicele generale ale genomului fitoplasmei.....23

Tabelul 1.3. Taxonomia clasei *Mollicutes*.....25

Tabelul 1.4. Speciile de vectori ale '*Ca.* P. solani'.....29

Tabelul 1.5. Compararea diferitor metode de detectare a fitoplasmei.....37

Tabelul 2.1. Primeri utilizați pentru diagnosticul '*Ca.* P. solani'……...……50

Tabelul 3.1. Identificarea infecției '*Ca*. P. solani' la plantele de tomate ale soiului Elvira, utilizând diverse metode de extragere a ADN-ului.....56

Tabelul 4.1. Distribuția infecției '*Ca.* P. solani' la diferite soiuri de tomate în anul 2018.....69

Tabelul 4.2. Distribuția infecției fitoplasmice la diferite soiuri de tomate în anul 2019.....71

Tabelul 4.3. Rezultatele identificării infecției fitoplasmice în plantele diferitor genotipuri de tomate în anii 2018, 2019 și 2020.....74

Tabelul 4.4. Indicii de productivitate la soiurile de tomate analizate în anii 2018 și 2019…….....81

Tabelul 5.1. Diagnosticului molecular al '*Ca.* P. solani' în semințe și germeni de tomate.....90

Tabelul 5.2. Rezultatele identificării '*Ca.* P. solani' la insecte pe parcursul perioadei de vegetație a tomatelor.....91

Tabel 5.3. Diagnosticul molecular al '*Ca*. P. solani' la unele specii de plante ruderale.....97

LISTA FIGURILOR

Figura 1.1. Imagine la microscopul electronic a unei secțiuni a tuburilor conductoare cu fitoplasme.....19
Figura 1.2. Arborele filogenetic al clasei *Mollicutes*.....26
Figura 1.3. Ciclul biologic al fitoplasmei.....28
Figura 1.4. Proteinele membranare imunodominante ale fitoplasmelor și localizarea lor.....30
Figura 1.5. Influența efectorilor SAP11 și SAP54 asupra plantelor și insectelor vector.....33
Figura 1.6. Distribuția '*Ca.* P. solani' în lume.....34
Figura 1.7. Numărul de genomuri ai fitoplasmei secvențiați anual din 2003.....41
Figura 2.1. Soiurile de tomate autohtone analizate.....44
Figura 2.2. Formele spontane de tomate analizate.....46
Figura 2.3. Capcană lipicioasă utilizată în colectarea insectelor.....47
Figura 2.4. Germinarea semințelor de tomate în condiții de termostat.....47
Figura 2.5. Echipamentul științific utilizat în realizarea experiențelor….....51
Figura 2.6. Schema diagnosticului molecular al fitoplasmei la tomate.....52
Figura 3.1. Rezultatul analizei PCR cu primerii cpn 421F/R pe baza ADN-ului izolat prin metoda alcalină din plantele soiurilor Elvira și Deșteptarea la etapa coacerea în masă a fructelor.....56
Figura 3.2. Rezultatul analizei PCR și *nested*-PCR cu primerii cpn 421F/R și cpn 200 F/R pe baza ADN-ului izolat prin metoda cu microunde din plantele soiurilor Elvira și Deșteptarea la etapa coacerea în masă a fructelor.....57
Figura 3.3. Rezultatele PCR și *nested*-PCR pe bază ADN-ului izolat din tomatele soiului Elvira prin metoda K-acetat sau DNA-zol.....58
Figura 3.4. Rezultatele *nested*-PCR cu primerii ps, pe baza ADN-ului izolat din plantele soiului de tomate Elvira la prezența '*Ca*. P. solani'.....59
Figura 3.5. Rezultatele *nested*-PCR cu primerii ps, pe baza ADN-ului izolat din plantele soiului de tomate Elvira la prezența '*Ca*. P. solani'.....60
Figura 3.6. Rezultatele PCR cu perechile de primeri ps, pe baza ADN-ului extras din plantele soiului de tomate Elvira la prezența fitopatogenului '*Ca*. P. solani'.....61
Figura 3.7. Rezultatele electroforezei fragmentului amplificat cu mărimea 200 pb.....62
Figura 3.8. Rezultatele *nested*-PCR pe bază ADN-ului izolat din cicade.....63
Figura 3.9. Curba de disociere a fragmentului amplificată de perechea de primeri qfys5-qfys6...65
Figura 3.10. Curba de disociere a fragmentului, amplificată de perechea de primeri qfys7-qfys8.....65

Figura 3.11. Graficul eficienței perechii de primeri qfys7-qfys8 (a) și relația dintre numărul de copii inițiale ale șablonului din reacție și valoarea Ct (b).....66
Figura 4.1. Rezultatele analizei *nested*-PCR pentru identificarea '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din pedunculul a patru soiuri de tomate în diferite perioade de dezvoltare a plantelor (anul de vegetație 2018).....68
Figura 4.2. Răspândirea infecției fitoplasmice la diferite soiuri de tomate în anul 2018.....69
Figura 4.3. Rezultatele *nested*-PCR pe bază ADN-ului extras din tomate ale soiurilor Elvira, Cerasus, Mary Gratefully și Deșteptarea la etapa de înflorire.....70
Figura 4.4. Răspândirea infecției '*Ca.* P. solani' la diferite soiuri de tomate în anul 2019…….....70
Figura 4.5. Răspândirea '*Ca.* P. solani' în câmpul de tomate în anul 2019.....71
Figura 4.6. Rezultatele analizei *nested*-PCR pentru diagnosticul '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din pedunculul a patru soiuri de tomate în diferite perioade de dezvoltare a plantelor (anul de vegetație 2020).....72
Figura 4.7. Răspândirea infecției '*Ca.* P. solani' la diferite soiuri de tomate în anul 2020.....73
Figura 4.8. Datele sumare privind răspândirea '*Ca*. P. solani' pe câmpul de tomate în anii 2018, 2019 și 2020.....74
Figura 4.9. Distribuția '*Ca*. P. solani' în câmpul de tomate în perioada de coacere în masă a fructelor în anii 2018, 2019 și 2020 (luna august).....75
Figura 4.10. Simptomele fitoplasmozei la tomate.....78
Figura 4.11. Determinarea '*Ca*. P. solani' la *Solanum habrochaites* în luna septembrie a anului 2019.....78
Figura 4.12. Diagnosticul '*Ca*. P. solani' la *S. habrochaites* în luna septembrie a anului 2020.....79
Figura 4.13. Analiza ADN-ului izolat la trei forme spontane tomate: 1 – *S. pimpinellifolium,* 2 – *S. chilense* și 3 – *S. peruvianum*.....79
Figura 4.14. Diagnosticul molecular al formelor spontane de tomate la prezența '*Ca*. P. solani'. 1 – *S. pimpinellifolium,* 2 - *S. chilense* și 3 - *S. peruvianum*.....80
Figura 4.15. Cuantificarea a '*Ca*. P. solani' la patru soiuri de tomate prin qPCR.....80
Figura 4.16. Rezultatele analizei PCR prin diluarea serială a ADN-ului la prezența '*Ca*. P. solani'.....83
Figura 4.17. Rezultatele analizei PCR prin diluarea serială a ADN-ului la prezența '*Ca*. P. solani' la soiul de tomate Elvira.....83
Figura 4.18. Rezultatele analizei PCR prin diluarea serială a ADN-ului la prezența '*Ca*. P. solani' la soiul de tomate Mary Gratefully.....83
Figura 4.19. Testarea ADN-ului din colecția tomatelor infectate la prezența '*Ca*. P. solani'.....84

Figura 4.20. Selectarea condițiilor analizei *nested*-PCR pentru obținerea fragmentelor ale genei ribozomale 16S ARNr cu concentrații necesare.....85
Figura 4.21. Probele de ADN cu concentrații optimale pentru realizarea secvențierii……...85
Figura 4.22. Dendrograme pentru probele s19 (2020), s1 (2019) și s9 (2018).....86
Figura 5.1. Diagnosticul '*Ca*. P. solani' în plantule de tomate crescute în condiții controlate.....88
Figura 5.2. Plantule a patru genotipuri de tomate, crescute în condiții de controlate din semințele colectate în anii 2017 și 2020.....89
Figura 5.3. Rezultatele *nested*-PCR la prezența infecției '*Ca*. P. solani' în semințe și plantule de tomate.....90
Figura 5.4. Diagnosticul molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din insectele colectate în lunile iulie și august.....91
Figura 5.5. Diagnosticul molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din insectele colectate în lunile iulie și august.....92
Figura 5. 6. Potențialele insecte-vector a '*Ca*. P. solani', colectate în lunile iulie și august.....92
Figura 5.7. Diagnosticul molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din insectele colectate în mijlocul lunii septembrie.....92
Figura 5.8. Potențialele insecte-vector a *'Ca.* P. solani', colectate în luna septembrie.....93
Figura 5.9. Speciile de buruieni cercetate la prezența '*Ca*. P. solani'.....94
Figura 5.10. Diagnosticul molecular al plantelor speciei *C. arvensis* cu primeri cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras cu Na-acetat.....95
Figura 5.11. Diagnosticul molecular calitativ al ADN-ului extras cu K-acetat din buruieni.....95
Figura 5.12. Diagnosticul molecular al unor specii de buruieni cu primerii cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras cu K-acetat.....96
Figura 5.13. Diagnosticul molecular al unor specii de buruieni cu primerii cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras prin fierbere în soluție alcalină.....96
Figura 5.14. Diagnosticul molecular al unor specii de buruieni cu primeri cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras prin fierbere în soluție alcalină.....96

LISTA ABREVIERILOR

ADN	Acidul dezoxiribonucleic
ARN	Acidul ribonucleic
ATP	Adenozin trifosfat
pb	Perechi de baze
kb	kilobaze
SDS	sodiumdodecil sulfat
PCR	reacția de polimerizare în lanț
dNTP	dezoxinucleotidtrifosfaţi
TBE	Tris-Borat EDTA (tamponul tris-borat)
l	litru
m	mili
n	nano
µ	micro
OY	*Onion yelows*
ARNr	ARN ribozomal
ARNt	ARN de transport
rpm	rotații pe minută
U	unitate
16S	subunitatea 16S ribosomală
AMP	*Antigen membrane protein*
IdpA	*Imunodominant protein* A
Imp	*Imunodominant membrane protein*
%	procent
°C	grad Celsius
µl	microlitru
µmol	micromol
cm	centimetru
EDTA	ethilenediaminetetraacetic acid
g	gram
kg	kilogram
LAMP	*loop-mediated isothermal amplification*
m	metru

M	molar (moli pe litru)
V	volt
min	minute
ml	millilitru
mol%	mol procent
NGS	*Next-Generation Sequencing*
No.	număr
pH	puterea de hidrogen
qPCR	*quantitative polymerase chain reaction*
RFLP	*restriction fragment length polymorphism*
sec	secunde
sp.	specie
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol
UV	ultraviolet

INTRODUCERE

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 % [3]. În urma procesului patogenetic la tomate, fructele afectate prezintă o mărire a floemului, lignificarea acestuia, scăderea conținutului de zaharuri și diminuarea calităților organoleptice[108]. 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 [39]. 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* [115]. 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 de 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 [149]. La fel, studiul morfologic este destul de dificil din cauza că infectarea poate avea loc concomitent cu alte boli ce pot masca simptomele maladiei [144]. 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 [134, 9]. 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 poate avea importanță în studiul plantelor cu boli mixte. Este important de remarcat că metodele moleculare pot permite de a determina într-un timp mai rapid rezistența diferențiată a genotipurilor de tomate la '*Ca*. P. solani' [43]. Utilizarea genotipurilor rezistente va permite de a reduce eventualele pierderi de produs și, în același timp, menținând siguranța pentru mediu. 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 [2]. 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 [77].

Studiul molecular cu utilizarea tehnicii PCR al rezistenței soiurilor autohtone de tomate a fost realizat pentru prima în Republica Moldova. Cercetări dar 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 [28]. La fel, determinarea pe baza simptomelor morfologice a nivelului procentul de infectare cu stolbur au realizat cercetării Vlasov I. și Samsonova L. în 2000 [154].

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 diagnosticului 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 fragmentelor genei 16S ARNr cu scopul determinării tulpinilor '*Ca.* P. solani' pe loturile experimentale.
7. Determinarea posibilității transmiterii fitoplasmei 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, care include un număr vast de metode și tehnici justificative, ce a permis în cadrul acestei cercetări atingerea scopurilor 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 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, declarația 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

Introducerea sintetizează şi prezintă pe scurt informaţii despre stadiul actuală 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.

Capitolul 1 *ASPECTE GENERALE ALE 'CANDIDATUS PHYTOPLASMA SPP.'* conține informații generale despre morfologia, genomul și evoluția fitoplasmei. Sunt descrise posibile căi de transmitere a fitoplasmei, simptomele de bază la tomate și controlul bolii. La fel se pune accent pe principalele metode de diagnostic al fitoplasmei.

Capitolul 2 *OBIECTUL ŞI METODELE DE CERCETARE* include o descriere a metodelor folosite în studiu, precum și caracterizarea obiectului de studiu şi detaliile despre condițiile în care s-au desfășurat experiențele. De asemenea, capitolul explică modul în care au fost realizate cerecetările experimentale, inclusiv diagnosticul molecular al '*Ca*. P. solani' la tomate, colectarea cicadelor, germinarea semințelor de tomate, metodele de izolare a ADN-ului și diferite variații a tehnicii PCR ce au fost folosite pentru a detecta și cuantifica infecția cu '*Ca*. P. solani'.

Capitolul 3 *ELABORAREA ŞI EVALUAREA EFICACITĂŢII PROCEDEELOR DE DIAGNOSTIC MOLECULAR AL FITOPLASMEI LA TOMATE, PLANTE RUDERALE ŞI LA INSECTE* se concentrează pe optimizarea și evaluarea procedeelor moleculare de diagnostic pentru infecția fitoplasmică la plantele de tomate și cicade. Diverse metode de extracție a ADN-ului, inclusiv metoda prin fierbere în soluție alcalină, DNA-zol, și diferite tehnici de PCR, au fost comparate. Studiul subliniază importanța alegerii condițiilor optime pentru o analiză PCR fiabilă.

Capitolul 4 *DIAGNOSTICUL MOLECULAR A 'CA. P. SOLANI' LA DIFERITE GENOTIPURI DE TOMATE PE PARCURSUL A TREI ANI DE VEGETAȚIE.* Studiul analizează infecția '*Ca*. P. solani' la plantele a patru soiuri de tomate (Elvira, Cerasus, Mary Gratefully, Deșteptarea) în perioada anilor 2018-2020. Analiza moleculară indică diferențe semnificative în sensibilitatea soiurilor, evidențiind soiul Cerasus ca rezistent la infecția fitoplasmică. Se observă variații în gradul de infecție în funcție de perioada sezonului de creștere și condițiile climatice.

Capitolul 5 *ANALIZA TRANSMITERII A FITOPLASMEI PRIN STUDIUL INFECTĂRII MATERIALULUI SEMINCER ȘI AL GAZDELOR INTERMEDIARE* se axează pe determinarea posibilității de transmitere a fitoplasmei prin semințe. Studiul investighează transmiterea '*Ca*. P. solani' în semințele de tomate a patru soiuri. Infecția fitoplasmică a fost identificată în semințele de tomate, cu toate acestea, studiul efectuat în decursul a doi ani, nu a determinat posibilitatea transmiterii fitoplasmei prin semințe. La fel, în acest capitol se explorează și testează potențialele insecte vector din ordinul Hemiptera și distribuția acestora în decursul sezonului de vegetație a tomatelor. În plus, studiul analizează numeroase specii de plante ruderale dintre care și perene ca potențiale rezervoare ale infecției fitoplasmice.

Concluziile generale şi recomandările prezintă o sinteză a principalelor rezultate obținute în urma realizării experiențelor și expuse conform capitolelor discutate.

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.

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

1.1 Caracteristici morfo-structurale ale fitoplasmei

În calitate de agenți de infecție fitoplasmele, au fost descoperite de savanți japonezi Doi și alții, în anii 60 ai secolului XX sub denumirea MLOs (*Mycoplasma like organisms*). Fitoplasmele au fost astfel denumite datorită similitudinii morfologice și ultrastructurale cu micoplasmele. Fitoplasmele ca și micoplasmele aparțin clasei *Mollicutes*. Aceste microorganisme parazitare intracelulare reprezintă un intermediar în calea evolutivă dintre virusuri și bacterii, având trăsături comune cu ambele [38, 48].

În comparație cu bacteriile la fitoplasme nu este prezent peretele celular, de unde și denumirea clasei *Mollicutes* din lat. *mollis* - moale, *cutis* – piele [110, 7]. Mult timp a fost considerat că atât virusurile cât și micoplasmele tipice pot fi crescute *in vitro* în comparație cu fitoplasmele. Doar relativ recent a fost posibilă cultivarea *in vitro* cu obținerea a colonii care conțineau fitoplasme ce variau din punct de vedere molecular, în medii artificiale, de la diferite specii de plante infectate [29, 30]. Datorită tehnologiilor moleculare, statul *MLOs* a fost rezolvat. Astfel au fost denumite fitoplasme și eventual au fost redenumite '*Candidatus* Phytoplasma spp.', termenul *Candidatus* ne indica de statul incert al acestui microorganism din punct de vedere filogenetic fiindcă caracterizarea are loc doar cu ajutorul metodelor moleculare [55, 89].

Fitoplasmele posedă o structură tipică celulei procariote, este alcătuită dintr-un cromozom, citoplasmă, ribozomi şi o membrană citoplasmatică alcătuită din 2 straturi de lipide. Faptul că posedă enzime induce proprietatea de a avea metabolism propriu [1].

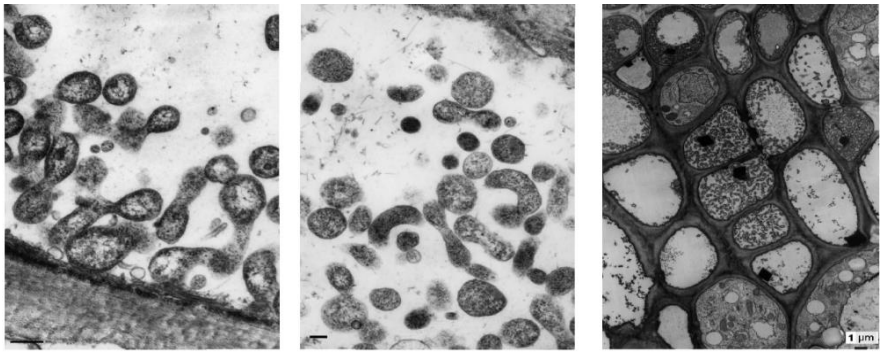


Figura 1.1: Imagine la microscopul electronic a unei secțiuni a tuburilor conductoare cu fitoplasme [9]

Pleomorfismul fitoplasmelor este datorat faptului că nu prezintă la exterior un perete celular, care să le confere o formă stabilă. Aceasta trăsătură definitorie a fitoplasmelor o posedă fiindcă nu au echipament enzimatic necesar biosintezei constituenților de bază ai peretelui celular ca la bacterii, (Figura 1.1) şi din acest motiv celulele fitoplasmelor au formă variabilă: corpusculi

elementari sferici (50-100 nm), celule sferice (100 - 300 nm), celule ovoide (400 - 1000 nm) și forme filamentoase de 1-2 μm lungime. Această diferență de forme este în dependență cu etapa de infectare. La etapa inițială are o formă filamentoasă. După care devin de forme mai sferice. Dimensiunea variind de la 200-800 nm, în funcție de tulpina patogenului și mediu [55].

Taxonomia fitoplasmei: regnul: Bacteria; filumul: Tenericutes; clasa: Mollicutes; ordinul: Acholeplasmatales; familia: Acholeplasmataceae; genul: *Candidatus* Phytoplasma; specia: '*Ca.* P. solani' [91].

Inițial sistemul de clasificare a fitoplasmelor era propus pe baza specificității transmiterii de către insectele vector, spectrul de plante gazdă și a simptomelor infecției. Însă experimental au fost determinate o mulțime de suprapuneri în spectrul de plante gazdă și arealul insectelor vector decât ce se observă în natură. La fel, simptomele induse la plantele infectate, asemănările și diferențele dintre speciile de fitoplasme transmise de insecte și speciile de plante-gazde ar putea reflecta diferențele genetice în agenții patogeni, precum și genetica plantei și a insectelor gazde [8, 66].

Ulterior a urmat sistemul de clasificare bazat pe metodele serologice, care a permis inițierea diferențierii între grupurile de fitoplasme (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). În timp ce antiserurile policlonale au titruri specifice relativ scăzute și nu sunt foarte eficiente pentru discriminarea între fitoplasme, antiserurile monoclonale au îmbunătățit semnificativ fiabilitatea tehnicilor de imunoidentificare. [8, 66].

În prezent sistemul de clasificare a speciilor *Candidatus* este construit pe baza tehnicilor molecular - genetice. În caracterizarea genotipică, gena 16S ARNr servește ca element de bază in clasificarea taxonomică: dacă izolatele în cadrul unei specii împărtășesc mai puțin de 98,65% identitate de secvență în cadrul genei lor 16S rRNA ele sunt considerate specii diferite. În cazul când două fitoplasme care au similitudine mai mare de 98,65% din secvența ribozomală 16S ARNr pot fi considerate ca specii *Candidatus* separate atunci când îndeplinesc următoarele trei criterii: 1) sunt transmise de vectori diferiți; 2) au gazdă diferită; și 3) există dovezi privind diversitatea moleculară între cele două fitoplasme [55, 139]. În plus, există și sistemul de clasificare al grupului 16S. Acest sistem se bazează pe profilurile de polimorfism de lungime a fragmentelor de restricție (RFLP) ale unei regiuni specificate a 16S, care este amplificată cu ajutorul primerilor universali pentru fitoplasme [67] și cuprinde în prezent 33 de grupuri notate cu cifre romane, care sunt împărțite în subgrupuri prin adăugarea de caractere alfabete romane. Ambele sisteme au demonstrat consistență între ele (Tabelul 1.1), totuși, datorită conservării ridicate a genei 16S ARNr, multe tulpini de fitoplasme care sunt biologic sau ecologic distincte ar putea justifica reatribuirea ca noi taxe în urma cerințelor actualizate bazate pe marcheri genetici suplimentari

pentru '*Ca*. P. ' sau identificarea de subgrupuri [34, 69]. În ultimii ani, un progres semnificativ a fost realizat în taxonomia bacteriilor ca de exemplu tranziția de la gena 16S ARNr spre întreaga secvențiere a genomului la bacteriile cultivabile[54].

Tabelul 1.1: Clasificarea fitoplasmelor conform profilului RFLP [36, 10, 139]

16Sr grupa	Specia	Descripția
I-A	'*Ca*. P. asteris'	*Aster yellows*
I-B	'*Ca*. P. asteris'	*Onion yellows*
I-C	'*Ca*. P. asteris'	*Clover phyllody*
I-D	'*Ca*. P. asteris'	*Paulownia witches' broom*
I-E	'*Ca*. P. asteris'	*Blueberry stunt*
I-F	'*Ca*. P. asteris'	*Apricot chlorotic leaf roll*
II-A	'*Ca*. P. aurantifolia'	*Peanut witches' broom*
II- B	'*Ca*. P. aurantifolia'	*Lime witches' broom*
II-C	'*Ca*. P. aurantifolia'	*Cactus witches' broom*
II-D	'*Ca*. P. australasia'	*Papaya mosaic*
III-A	'*Ca*. P. pruni'	*Western X disease*
III-B	'*Ca*. P. pruni'	*Clover yellow edge*
IV-A	'*Ca*. P. palmae'	*Coconut lethal yellowing*
IV-B	'*Ca*. P. palmae'	*Yucatan coconut lethal decline*
IV-C	'*Ca*. P. palmae'	*Coconut lethal disease*
IV-D	'*Ca*. P. palmae'	*Carludovica palmata yellows*
V-A	'*Ca*. P. ulmi'	*Elm yellows*
V-B	'*Ca*. P. ziziphi'	*Jujube witches' broom*
V-C	'*Ca*. P. vitis'	*Alder yellows / Flavescence dorée C*
V-D	'*Ca*. P. vitis'	*Flavescence dorée D*
V-E	'*Ca*. P. rubi'	*Rubus stunt*
V-F	'*Ca*. P. balanitae'	*Balanites witches' broom*
VI-A	'*Ca*. P. trifolii'	*Clover proliferation*
VI-I	'*Ca*. P. sudamericanum'	*Passion fruit disease*
VII-A	'*Ca*. P. fraxini'	*Ash yellows*
VIII-A	'*Ca*. P. luffae'	*Loofah witches' broom*
IX-A	N/A	*Pigeon-pea witches' broom*
IX-B	'*Ca*. P. phoenicium'	*Almond witches' broom*
IX-C	'*Ca*. P. phoenicium'	*Picris echioides yellows*
X-A	'*Ca*. P. mali'	*Apple proliferation*
X-B	'*Ca*. P. prunorum'	*European stone fruit yellows*
X-C	'*Ca*. P. pyri'	*Pear decline*

X-D	'*Ca*. P. spartii'	*Spartium witches' broom*
XI-A	'*Ca*. P. oryzae'	*Rice yellow dwarf*
XII-A	'*Ca*. P. solani'	*Stolbur*
XII-B	'*Ca*. P. australiense'	*Australian grapevine yellows*
XII-C	N/A	*Strawberry lethal yellows*
XII-D	'*Ca*. P. japonicum'	*Japanese hydrangea phyllody*
XII-E	'*Ca*. P. fragariae'	*Strawberry yellows*
XIII-A	'*Ca*. P. hispanicum'	*Mexican periwinkle virescence*
XIII-G	'*Ca*. P. meliae'	*Melia azedarach yellows*
XIV-A	'*Ca*. P. cynodontis'	*Bermudagrass white leaf*
XV-A	'*Ca*. P. brasiliense'	*Hibiscus witches' broom*
XVI-A	'*Ca*. P. graminis'	*Sugarcane yellow leaf*
XVII-A	'*Ca*. P. caricae'	*Papaya bunchy top*
XVIII-A	'*Ca*. P. americanum'	*Potato purple top wilt*
XIX-A	'*Ca*. P. castanae'	*Chestnut witches' broom*
XX-A	'*Ca*. P. rhamni'	*Buckthorn witches' broom*
XXI-A	'*Ca*. P. pini'	*Pine shoot proliferation*
XXII-A	'*Ca*. P. palmicola'	*Mozambique coconut yellows*
XXIII-A	N/A	*Buckland valley grapevine yellows*
XXIV-A	N/A	*Sorghum bunchy shoot*
XXV-A	N/A	*Weeping tea witches' broom*
XXVI-A	N/A	*Sugar cane phytoplasma*
XXVII-A	N/A	*Sugar cane phytoplasm*
XXVIII-A	N/A	*Derbid phytoplasma*
XXIX-A	'*Ca*. P. omanense'	*Cassia witches' broom*
XXX-A	'*Ca*. P. tamaricis'	*Salt cedar witches' broom*
XXXI-A	'*Ca*. P. costaricanum'	*Soybean stunt*
XXXII-A	'*Ca*. P. malaysianum'	*Malaysian periwinkle virescence*
XXXIII-A	'*Ca*. P. allocasuarinae'	*Allocasuarina phytoplasma*

1.2. Genomul

Caracterizarea genomului fitoplasmei a început la nivel mondial după anii 1990 prin secvențierea unor fragmente ale genomului. Secvențierea completă a genomului a fost efectuată pentru prima dată în 2004 [151]. Celulele fitoplasmice asemenea altor membri ai clasei *Mollicutes*, conţin ADN circular dublu-catenar. De asemenea, acestea sunt printre organismele cu cel mai mic genom (530-1350 kb) [9].

Studiile filogenetice bazate pe organizarea a 16S ARNr şi a genelor *housekeeping* demonstrează că strămoșul comun a fitoplasmei este *Acholeplasma laidlawii* și *Acholeplasma*

palmae dar nu *Spiroplasma spp.* sau alte micoplasme. Un argument ce afirmă această ipoteză este că tripletul ce codifică triptofanul (trp) este UGG, la alte procariote inclusiv micoplasmele și spiroplasmele trp este codificat de UGA, pe când la fitoplasme UGA este stop codon [119].
În tabelul 1.2. sunt prezentate unele caracteristici de bază ale genomului fitoplasmei și ale elementelor extracromozomiale ale acestuia.

Tabelul 1.2: Caracteristicele generale ale genomului fitoplasmei [103]

	Cromozom	**ADN extacromozomial**	**Plasmida**
Lungimea (pb)	860631	5025	3932
G+C (%)	28	25	24
Regiunile ce codifică proteine (%)	73	71	75
Genele ce codifică proteine cu funcție definită	446	2	2
Genele ipotetic-conservative	51		
Genele ipotetice	257	4	3
Total	754	6	5
Lungimea medie a genelor ce codifică proteine	785	595	588
ARNt	32		
ARNr operoni	2		

La fel, fitoplasma este genetic distinctibilă față de micoplasme deoarece are o regiune spacer (în jur de 300 pb) între regiunile ribozomale16S și 23S, care codifică izoleucina ARNt ($ARNt^{Ile}$) și partea secvenței pentru alanină ARNt ($ARNt^{Ala}$). Genomul fitoplasmei are un conținut scăzut de G+C (21-28%) similar cu micoplasmele și bacteriile endosimbionte [135].

Având în vedere că genomul mic a microorganismelor parazitare și / sau simbiotice este format în mare parte din gene funcționale, comparația căilor metabolice a organismelor dezvăluie de multe ori diferențe în modul de viață microbian și originile lor evolutive [105].

În general, genomul microorganismelor patogene a pierdut gene pentru numeroase căi biosintetice, cel mai probabil pentru că mulți metaboliți necesari sunt disponibili în organismul gazdă. În plus, selecția a favorizat pierderea de factori, cum ar fi (*mAmps* sau *PAMPs*, eng. *microbe/pathogen-associated molecular patterns*), care pot efectua răspunsuri de declanșare în celula gazdă. Aceasta este o posibilă cauză de pierdere a genelor pentru fitoplasmă, care posedă în ciclul lor biologic două gazde diferite [50].

Totuși necătând la genomul mic al fitoplasmei, multe gene sunt prezente în mai multe copii, conțin doi operoni ARNr și heterogenitatea acestor operoni a fost demonstrată la unele fitoplasme.

La fel, fitoplasmele conțin un număr larg de transpozomi și secvențe de inserție ce sunt unice pentru aceste organisme. Aceste sunt responsabile pentru variabilitatea genomului, supraviețuirea în diferite medii ale plantelor și insectelor și producerea eterogenității în dimensiunea fitoplasmei Aceste sunt numite secvențe mozaic variabile *SVM* și unități potențial mobile *PMU*, ce conțin o familie a polindroamele *REP* numite *PhREPS*. Rolul acestora este necunoscut dar se presupune că *PhREPS* pot juca un rol în terminarea transcripției sau în conferirea stabilității genomice [58].

PMU și *SVM* au o compoziție analoagă și conțin gene similare. Aceste gene se găsesc într-o singură copie, mai multe sau în clustere. Prezența repetată a *PMU*, genele lor conțin inclusiv și gene pentru recombinare (*tra5, ssb, himA*) și replicare (*dnaG, dnaB*), iar ordinea conservativă a genelor sugerează *PMU* ca transpozoni replicativi de compoziție. *PMU* există ca elemente liniar cromozomiale și circular extracromozomiale în genom, ce ne permite de a afirma că acestea au posibilitatea de a se mișca prin genom [50].

Fitoplasma conține ADN extracromozomial - plasmide cu o lungime de 1.7-7.4 kb. Unele plasmide pot avea origine virală. Genele ADN-ului extracromozomial sunt cunoscute că joacă un rol important în asigurarea patogenității și virulenței [94]. Se presupune că unele plastide sunt implicate în transmiterea la insecte [100].

Genomul fitoplasmei conține gene pentru funcțiile celulare de bază ca replicare, transcripție, translație și translocație, necătând la faptul că a pierdut multe gene metabolice. În general la micoplasme lipsesc genele pentru realizarea ciclulului Kalvin, biosinteza sterolilor, acizilor grași, a celor mai mulți aminoacizi și nucleotidelor *de novo*, astfel fiind în dependență deplină de gazdă. La fel, lipsa acestor gene a fost depistată și la fitoplasme, mai mult ca atât acestea au pierdut gene pentru biosinteza acizilor pentozofosfatici. În loc fitoplasmele conțin mai multe copii ale genelor legate de transportul prin membrane, care nu sunt depistate la micoplasme. Astfel aceste caracteristici a genomului ne sugerează că fitoplasmele sunt foarte dependente de compușii metabolici din gazdele lor [105].

O caracteristică distinctivă a fitoplasmelor o constituie și diferența în dimensiuni a cromozomului, aceasta variație este datorată duplicației și a abundenței unor gene. A fost estimat că aproximativ 18 % din genele totale sunt multiple copii a doar cinci gene: *uvrD* (ADN-helicaza ATP dependentă, 3117 nucliotide, 7 copii), *hflB* (Zn proteaza ATP-dependentă, 1551 nucleotide, 17 copii), *tmk* (timidilat kinaza, 624 nucleotide, 6 copii), *dam* (ADN-metilaza, 660 nucleotide, 4 copii) și *ssb* (*single stranded DNA-binding protein*, 345 nucleotide, 15 copii) toate aceste gene au doar o singură copie în alte *Mollicutes* a căror genom a fost deja secvențiat. De asemenea, aceste 5 gene au multiple copii ce codifică elementele a sistemului transportor, însă nu toate sunt funcționale [78].

La fel, genomul fitoplasmei se distinge prin absența tipului F_0F_1 de ATP sintetază. Majoritatea bacteriilor inclusiv și cele cu un genom mic produc ATP sintetază și sintetizează ATP prin reacție reversă de descărcare a protonilor. Totuși, nici una din cele opt subunități a ATP sintetazei nu au fost identificată în genomul fitoplasmei [52].

1.3. Evoluția fitoplasmei

Fitoplasma fiind reprezentant ai clasei *Mollicutes*, posedă caracteristica tipică pentru acești membri - pierderea peretelui celular și acoperirea doar cu o membrană celulară, ceea ce îi permite de a-și modifica forma [6].

Această clasă include micoplasmele, ureoplasmele, fitoplasmele, acheoplasmele și spiroplasmele (Tabelul 1.3). Ei au un genom mic și cel mai probabil s-au diferențiat de la specii gram-pozitive ale genului *Clostridium* sau *Lactobacilus* [151].

Tabelul 1.3: Taxonomia clasei *Mollicutes* [41]

Clasificarea	Nr. current de specii recunoscute	Mărimea genomului	G+C	Necesitatea de colesterol	Proprietăți distinctive	Habitatul
Ordinul I: *Mycoplasmatales*						
Familia I: *Mycoplasmataceae*						
Genul I: Mycoplasma	102	580-1,350	23-40	Da	T. optimală 37 C	Om, animale
Genul II: *Ureaplasma*	6	760-1170	27-30	Da	Hidroliza ureei	Om, animale
Ordinul II: *Entomoplasmatales*						
Familia I: *Entomoplasmataceae*						
Genul I: *Entomoplasma*	5	790-1140	27-29	Da	T. optimală 30 C	Insecte, plante
Genul II: *Mesoplasma*	12	870-1100	27-30	Nu	T. optimală 30 C; 0,04 % Tween 80 în mediu	Insecte, plante
Familia II: *Spiroplasmataceae*						
Genul I: *Spiroplasma*	33	780-2220	24-31	Da	T. optimală 30-37 C	Insecte, plante
Ordinul III: *Acholeplasmatales*						
Familia I: *Acholeplasmataceae*						
Genul I: *Acholeplasma*	13	1500-1650	26-36	Nu	T. optimală 30-37 C	Animale, plante, insecte
Ordinul IV: *Anaeroplasmatales*						
Familia I: *Anaeroplasmataceae*						
Genul I: *Anaeroplasma*	4	1500-1600	29-34	Da	Anaerobi	Bovine/ ovine
Genul II: *Asteroleplasma*	1	1500	40	Nu	Anaerobi	Bovine/ ovine
Statut taxonomic nedefinit						
Candidatus Phytoplasma	ND	640-1185	23-29	Ne cunoscut	Dificil de cultivat *in vitro*	Insecte, plante

Lungimea genomului molecutelor variază de la 600 până la 2200 kb cu suprapunerea valorilor printre genurile *Mollicutes*. Prin urmare, dimensiunea genomului micoplasmei variază de la 600 până la 1380 kb, pe când pentru speciile de *Spiroplasma* variază de la 780 până la 2200 kb la *S. ixodites* [76]. Este evident că lungimea genomului nu poate fi considerată un criteriu taxonomic de evaluare pentru a distinge evoluția acestora. Totuși ca o regulă generală speciile de *Acholeplasma* și *Spiroplasma* sunt considerate din punct de vedere taxonomic cele mai "tinere", deoarece au un genom mai mare decât speciile de *Micoplasma* și *Ureoplasma* care au apărut mai recent (Figura 1.3). Aceasta este confirmat prin teoria evoluției degenerative ori reductive, care s-a realizat concomitent cu pierderea semnificativă a secvențelor genetice [110, 144].

Variabilitatea în dimensiune are loc nu doar în cadrul diferitor genuri, dar chiar și în cadrul aceleași specii, care este datorată în primul rând elementelor repetitive constituite din fragmente de gene ce expresează proteine ce diferă în lungime ori în secvențe de inserție [24, 37]. Variabilitatea intraspecifică la fel poate fi și de natură virală. Ca de exemplu, a fost demonstrat că fagii din ordinul *Caudovirales* au un impact major în structura secvențelor a două genomuri de fitoplasma. Analizând secvențele a fost demonstrat că 264.2 kb (31% din genom) din secvența OY-M și 160.2 kb (~ 22.7% din genom) a secvenței AY-Wb este de natură virală [51, 64]. De asemenea, a fost constatată prezența secvențelor virale și în cadrul genomului molecutelor, ca de exemplu la spiroplasme *S. citri* a fost identificată secvența de origine virală cu o lungime în jur de 150 kb [114].

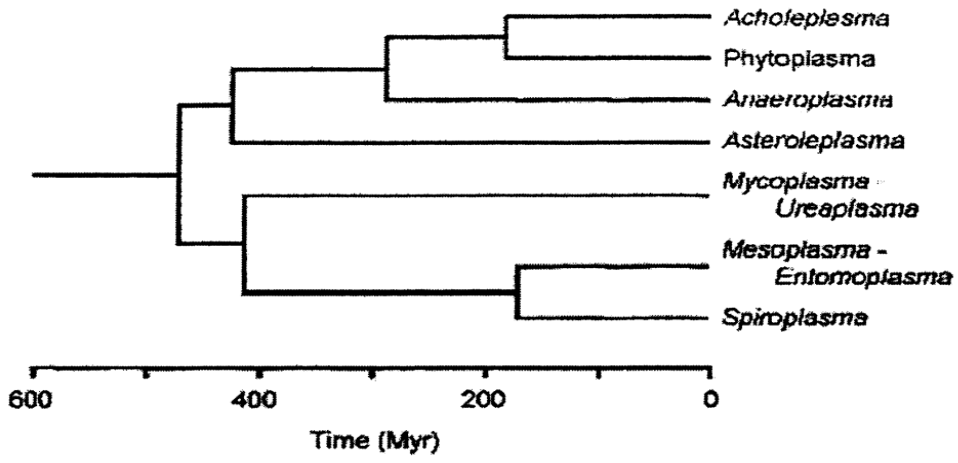


Figura 1.2. Arborele filogenetic al clasei *Mollicutes* [74]

Genomului fitoplasmei este de o lungime redusă de aproximativ 530-1350 kb. Astfel genomul mic al fitoplasmelor este rezultatul unei reduceri ale genomului de aproximativ 50%.

Aceste date sugerează că 600-800 kb este limita inferioară a complexității genetice pentru un organism cu autoreplicare pe pământ [74].

Fitoplasmele cel mai probabil au evoluat de la *Acheoplasme* aceasta este datorat în primul rând preferințelor nutritive iar în al doilea rând stop codonului care la *Acheoplasme* și fitoplasme este UGG în comparație cu alți reprezentați ai micoplasmelor care este UGA [68].

Majoritatea molecutelor au pierdut capacitatea de a sintetiza aminoacizii *de novo* în comparație cu fitoplasmele, micoplasme și spiroplasme. O caracteristică importantă ce diferențiază reprezentații molecutelor este preferința față de sterol. Ca de exemplu, membrii genului *Micoplasma* au preferință strictă față de sterol în comparație cu reprezentanții ureoplasmi ce necesită adăugare exogenă de urați pentru o bună dezvoltare [41]. O caracteristică la fel de importantă este tipul de gazdă care este de asemenea destul de variat și determină modul lor de evoluție. Reprezentanții genului *Micoplasma* și *Ureoplasma* sunt agenți patogeni ai animalelor în timp ce fitoplasmele sunt agenți patogeni ai plantelor, transmiși prin intermediul insectelor. Spiroplasmele infectează preponderent insectele cu excepția celor trei specii de spiroplasme *S. citri, S. kunkelii, S. phenoceum* care sunt agenții patogeni ai plantelor și sunt transmise cu ajutorul insectelor asemenea fitoplasmelor [45, 151].

Datorită structurii morfologice a fitoplasmelor, înregistrările fosile nu sunt păstrate, astfel se utilizează metode indirecte pentru determinarea originii. Se utilizează trei metode indirecte: evenimente ecologice, inferențe bazate pe fosilele gazdă și pe ceasurile moleculare a eucariotelor [95]. Arborele temporal pe bazat pe secvența 16S ARNr sugerează că ratele evolutive au rămas relativ constante în general în evoluția fitoplasmelor și că originea acestui liniaj datează acum aproximativ 641 de milioane de ani (Ma). Se estimează că grupul principal de fitoplasme a început să se diversifice aproximativ 316 Ma, fiind identic cu originea plantelor cu semințe și a insectelor din ordinul Hemiptera. Unele grupuri de fitoplasme aparent asociate cu anumite familii de plante sau insecte vectori au apărut în general mai recent decât gazdele și vectorii lor respectivi, sugerând că schimbările de gazdă mediate de vectori au fost un mecanism important în diversificarea evolutivă a fitoplasmelor [74].

Analiza moleculară sugerează că fitoplasmele, vectorii lor hemiptereni și plantele vasculare au evoluat împreună de sute de milioane de ani [131]. Progresele suplimentare în înțelegerea modelelor macroevolutive în fitoplasme sunt împiedicate de lacune mari în cunoașterea identității vectorilor competenți și de lipsa datelor privind asociațiile fitoplasmelor cu plantele neimportante din punct de vedere economic [23].

1.4. Biologia fitoplasmei

Fitoplasma este o bacterie care infectează un spectru larg de plante și culturi agricole aproximativ 1000 de specii din Europa, cât și din alte continente. Însă, pot fi și alte specii de plante care nu au fost încă identificate [90, 9]. Printre gazdele fitoplasmei se enumeră solonaceele, vița de vie, cerealele, mazărea, sfecla de zahăr, căpșunele, levănțica ș.a. În ciclul de viață a fitoplasmei sunt necesare două sau mai multe gazde [39]. În plante acestea sunt depistate în floem, în timp ce la insecte sunt în glandele salivare, hemolimfă cât și alte organe intracelulare și extracelulare [50].

Infectarea are loc odată cu hrănirea insectelor cu plantele infectate. Fitoplasma din țesuturile floemice este preluată de insecte, apoi are loc multiplicarea fitoplasmei, penetrarea prin peretele intestinului, pătrunderea fitoplasmei în hemolimfă de unde circulă prin tot corpul insectei și poate infecta în așa mod organele interne - tuburile Malpighi, creierul, organele reproductive [63]. Un factor important pentru transmiterea în continuare a fitoplasmei este prezența ei în glandele salivare a vectorului [40, 78]. Perioada de la pătrunderea fitoplasmei în corpul insectei și multiplicarea ei o constituie perioada latentă, care variază între 7-80 zile [88,123].

Deși reprezentanții ordinului Hemiptera au doar o generație pe an, infecția este transmisă și prin larve. Un nou ciclu începe cu sosirea unui alte insecte neinfectate, potențial vector pentru planta recent infectată. Primele simptome pot fi văzute la a șasea zi după infectare, în timp ce în unele cazuri este necesar de la 6 la 24 luni pentru apariția primelor semne de infecție, în dependență de specia fitoplasmei și gazdă (Figura 1.3). Infectarea cu fitoplasmă poate avea și prin intermediul cuscutei plantei parazite care reprezintă rezervorul natural al insectelor vector. Posibilitatea transmiterii fitoplasmei de la cuscută la alte specii de plante a fost investigată [55]. Recent se discută privind posibilitatea transmiterii fitoplasmei prin semințe [9].

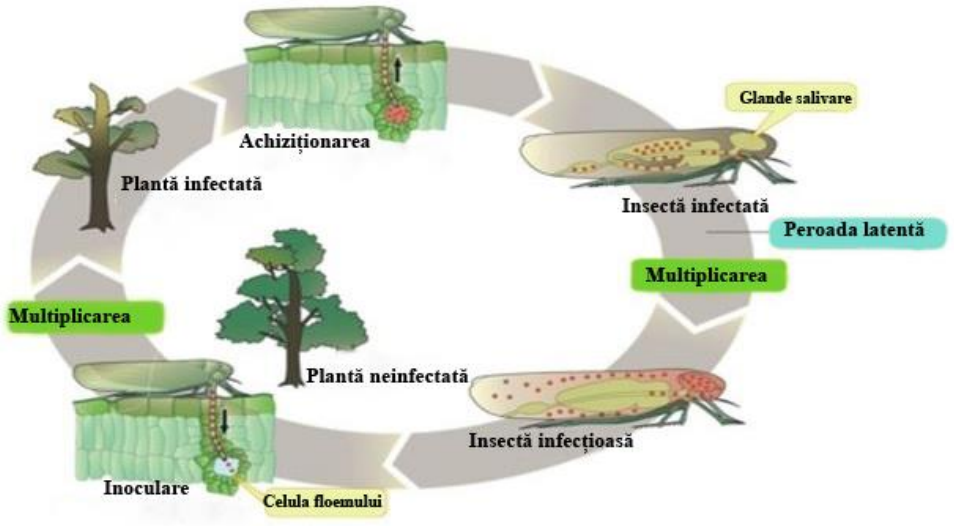


Figura 1.3. Ciclul biologic al fitoplasmei [151]

Fitoplasmă este transmisă preponderent de insectele din ordinul Hemiptera - familiile: Cicadellidae, Psyllidae, Cercopidae, Delphacidae, Derbidae, Menoplidae, Flatidae și Cixiidae. Cea mai numeroasă familie fiind Cicadellidae cu 12-25 mii de specii dintre care 88 de specii sunt vectori ai fitoplasmei (Tabelul 1.4). Dintre vectorii tipici ai fitoplasmei sunt *Hyalesthes obsoletus* și *Replatus panzeri* dar și reprezentanții altor familii cum ar fi Fulgoridae și Psylidae care se hrănesc cu țesutul floemic a plantelor infectate [151].

Tabelul 1.4. Speciile de vectori a '*Ca.* P. solani' [39, 109]

Familia	Subfamilia	Specia
Cicadellidae	**Agalliinae**	*Anaceratagallia ribauti*
		Austroagallia sinuata
	Aphrodinae	*Aphrodes bicinctus*
	Deltocephalinae	*Cechenotettix quadrinotatus*
		Euscelidius variegatus
		Euscelis obsoletus
		Euscelis lineolatus
		Euscelis plejebus
		Hardya tenuis
		Macrosteles quadripunctulatus
Cixiidae	**Cixiinae**	*Psammotettix striatus*
		Pentastridius leporinus (Pentastridius beieri)
		Reptalus panzeri
		Reptalus quinquecostatus
Triozidae	**Isiinae**	*Banctericera trigonica*

1.5. Interacțiunea fitoplasmei cu gazda

Fitoplasmele coexistă de mai bine de 400 de milioane de ani cu plantele și insectele. De-a lungul istoriei evolutive fitoplasmele au stabilit cu organismele gazdă relații complexe și foarte diverse, ce permit supraviețuirea și răspândirea acesteia. În prezent studiul interacțiunii fitoplasmei cu planta sau insecta gazdă reprezintă un studiu destul de actual. Numeroase cercetări se realizează privind diferite aspecte ale interacțiunii fitoplasmei cu ambele gazde [125].

Fitoplasmele modulează recunoașterea microbiană și răspunsurile induse de plante [14]. Bacteriile fitopatogene, transmise de insecte, posedă de asemenea factori de virulență pentru stabilirea interacțiunilor fizice cu insectele vectorii și posibil pentru modularea în plante a căilor implicate în atracția insectelor și răspunsurilor de apărare față de insectele vectori [99]. În plus, fitoplasmele pot să posede factori de virulență ce au efecte directe asupra insectei vector, cum ar

fi modificările comportamentului (de hrănire) și de redirecționare a căilor de trafic de vezicule pentru a facilita migrația patogenului prin insecte și de transmitere către plante [98].

Fitoplasmele eliberează efectori în celulele gazdă ale plantelor și insectelor pentru a ținti moleculele gazdelor, iar în plante acești efectori se transportă din floem pentru a accesa țesuturile mai îndepărtate și a modifica procesele de dezvoltare de bază. Efectori oferă fitoplasmelor un avantaj de adaptabilitate prin reglarea gazdelor lor - a plantelor și insectelor [126].

Un rol deosebit în determinarea interacțiunii cu gazda îl are studiul proteinelor membranare. Fitoplamele posedă două sisteme de secreție, sistema YidC pentru integrarea proteinelor membranare și sistema Sec pentru integrarea și secreția proteinelor în interiorul citoplasmei celulare. Proteina antigenică membranară Amp, care ocupă suprafețe vaste a membranei fitoplasmice, a fost raportată ca substrat pentru sistemul Sec. Amp are secvența signal Sec la capătul N terminal, ce sugerează că sistemul Sec al fitoplasmei utilizează ca secvență signal de recogniție și clivare, la fel ca și în alte sisteme Sec ale altor bacterii [103].

Cercetările serologice au determinat una sau două proteine imunodominante (proteine puternic antigenice de pe suprafața fitoplasmei) cu domenii trans-membranare. Marea parte a suprafeței proteinelor joacă rol în recunoașterea, aderența pe celula plantei ori insectei gazdă (fiind ca un mijloc pentru colonizare și infectare), patogenitate și diminuarea declanșării răspunsului de apărare a gazdei. Majoritatea epitopilor sunt unici pentru fiecare specie de fitoplasmă ce sugerează că aceste proteine participă la interacțiunea specifică cu celule gazdă. Proteinele imunodominante ocupă o suprafață majoră a celulei [9].

Au fost identificate 3 tipuri de proteine imunodominante la fitoplasme: Amp, IdpA și Imp (Figura. 1.4). Aceste proteine nu au similitudine privind succesiunea aminoacizilor cât și a genelor pentru sinteza acestor proteine ce sunt localizate în diferite regiuni a genomului. Regiunea hidrofilică este prezentă la toate pe când regiunea hidrofobică transmembranară este variabilă la toate tipurile de proteine imunodominante privind capătul N și C terminal [60].

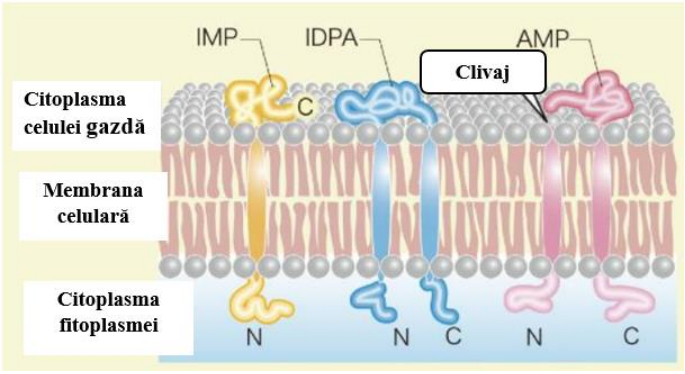


Figura 1.4. Proteinele membranare imunodominante ale fitoplasmelor și localizarea lor [90]

A fost raportat că interacțiunea dintre Amp a fitoplasmei OY și insectei vector determină specificitatea. OY fitoplasma este localizată pe microfilamentele mușchiului ce acoperă tractul intestinal a insectei și Amp formează un complex cu trei proteine ale insectei: actina, miozina lanțul greu, miozina lanțul ușor. Formarea Amp complexului este legată cu capacitatea de transmitere a fitoplasmei cu ajutorul insectelor. Ceia ce sugerează că interacțiunea dintre Amp și complexului de microfilamentele joacă un rol major în transmiterea fitoplasmei [128]. De asemenea pe parcursul studiului privind succesiunea aminoacizilor din compoziția proteinelor membranare a fost observat o selecție pozitivă a aminoacizilor ceea ce a fost mult timp legat de evoluția fitoplasmei și adaptarea ei la noi specii, cât și o similitudine a acestora. Însă Morton și al. [87] au izolat gene ce codifică Imp și au găsit secvențe identice a acestor gene în câteva fitoplasme ce nu au fost legate cu gena 16S ARNr. Aceasta sugerează că variabilitatea proteinelor membranare imunodominate este legată de alt factor decât de cel evolutiv [78].

Gena *Imp* poate avea un rol important în interacțiunea dintre fitoplasmă și gazdă, ca și multe proteine cu selecție pozitivă. A fost calculat că acumularea de Amp este de zece ori mai mare decât Imp cea ce denotă importanta mai majoră în calitate de imunodominant. Astfel din moment de când fitoplasma este un parazit intracelular al plantelor și insectelor, capacitatea de a se adapta la două medii diverse este de o importanță vitală privind dezvoltarea și evoluția fitoplasmei ca specie [101].

1.6. Virulența fitoplasmei

Fitoplasma habitează și se multiplică în elementele funcționale ale floemului, însă cel mai mare efect prin prezența sa îl are asupra tuburilor floemice. Numeroase studii au demonstrat că inhibiția transportului floemic a plantelor infectate duce la acumularea unei cantități considerabile de carbohidrați în frunze și o reducere însemnată a compușilor esențiali ergoergici în organele de rezervă, frunze tinere și rădăcini [78].

Schimbările includ reducerea fotosintezei, deschiderea stomatelor și respirația radiculară, alterarea metabolismul secundar și desturbarea balanței hormonale a plantei posibil datorată disfuncției floemice. Infecția fitoplasmică poate determina sinteza proteinelor de apărare, creșterea compușilor fenolici și supraproducerea de peroxid de hidrogen în planta gazdă. La fel, are loc reducerea pigmenților fotosintetici, a proteinelor solubile și dereglarea transportului aminoacizilor [101]. Totuși încă foarte puțin se cunoaște despre virulența fitoplasmei. Genomul fitoplasmelor secvențiate nu posedă nici una din genele virulente cunoscute (ca *hrp*) găsite în alte bacterii patogene [103].

Din cauza pierderii celor mai principale căi de biosinteza a metaboliților, se afirmă că efectele specifice asupra plantei sunt datorate consumului larg de nutrienți din celulele gazdei cu consecințele respective. Consumul mare de surse de carbon poate favoriza rata de creștere a fitoplasmei care poate la fel direct ori indirect induce mai multe simptome severe [104].

TENGU (factorul de virulență, inductorul *tendu-su*), un mic polipeptid din 38 de aminoacizi, este cunoscut că factor virulent fitoplasmic care poate induce simptomul numit "matură de vrăjitoare" la plantele gazdă. La fel, s-a demonstrat expresia diferențiată a genei în plante și insecte gazdă, în care expresia *TENGU* este de 5 ori mai mare în plantele gazdă decât în insectele gazdă [53]. Aceasta poate sugera rolul important al acestuia când fitoplasma infectează plantele. *TENGU* a fost demonstrat că acționează ca inducător al sterilității [102, 80].

Unele studii au arătat că *TENGU* induce și simptomul de nanism când se expresează în plantele transgenice *Nicotiana benthamina* și *Arabidopsis thaliana.* Deși localizarea este limitată în floem, proteinele *TENGU* au fost detectate în lăstarii apicali prin analiza imunohistochimică, ce sugerează că *TENGU* a fost transportat din floem în alte celule. Analiza *microarray* a detectat că genele ce determină sinteza auxinei și a acidului jasmonic au fost dereglate în plantele *TENGU*-transgenice în comparație cu plantele control [59]. Scăderea sintezei de acid jasmonic se consideră că duce la atragerea insectelor.

Fitoplasmele influențează expresia genelor legate de inflorescență. Astfel, transcripția genelor *LeWUS* în plantele bolnave nu are loc. În mod similar, transcrierea *LeCLV1* a fost deficientă sau nu s-a produs în toate plantele infectate. Descreșterea ratei de transcriere a genelor legate de înflorire este cu aproximativ 25 - 40 % [107]. În studiul fenotipurilor filodice s-a demonstrat că filogenul joacă un rol crucial la câteva specii de dicotiledonate [62]. Genele acestuia au fost identificate la diverse specii de fitoplasme și se consideră că sunt transmise orizontal între patogeni [56]. Aceste rapoarte indică faptul că familia filogen este un efector universal eficient inducător de filodie, comun fitoplasmelor.

Schimbările morfologice sunt paralele cu acumularea a fosfaților celulari și creșterea expresiei genelor ce răspund de sinteza fosfaților cât și a microARN. De asemenea, se atestă că *SAP11* suprimă răspunsului salicilic și induce creșterea bacteriilor patogene. Identificarea *TENGU*, *SAP11* și *SAP54* sugerează că fitoplasma poate induce simptome severe prin secreția proteinelor efector și modificarea activității genelor plantei [127]. *SAP11/SWP1* perturbă biosinteza acidului jasmonic acid și promovează formarea lăstarilor [136]. După cum observăm în figura 1.5 fecunditatea insectelor vector a fost crescută la plantele care exprimă *SAP11* în comparație cu plantele martor, ceea ce poate fi benefic pentru fitoplasme și insecte vector [126]. La fel, s-a

raportat că *SAP11* suprimă răspunsurile de apărare mediate de acid salicilic și sporește creșterea patogenilor [71].

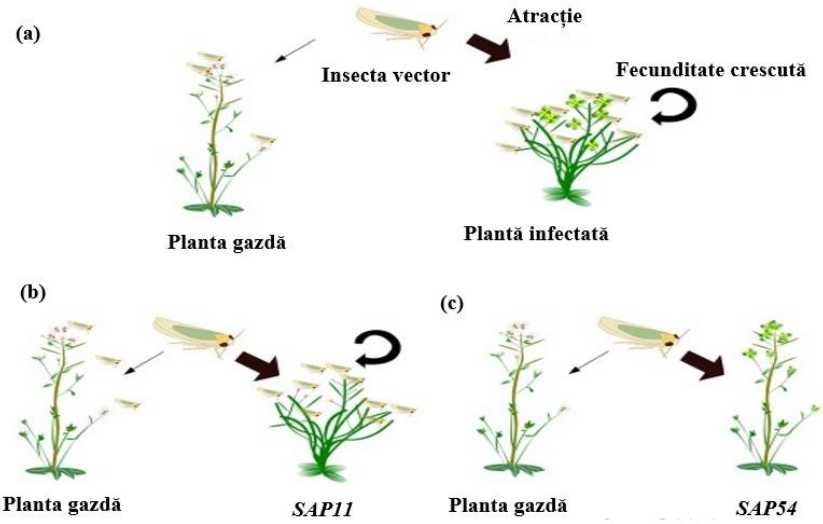


Figura 1.5. Influența efectorilor *SAP11* și *SAP54* asupra plantelor și insectelor vector [130]

(a) Insectele sunt mai atrase de plantele infectate cu fitoplasme și au o fecunditate crescută pe acestea. (b) Cicadele au o fecunditate crescută și sunt mai atrase de plantele transgenice *SAP11*. (c) Cicadele sunt mai atrase de plantele transgenice *SAP54*

Efectorul *SWP16* inhibă ARN de silențiere în plante, iar *PM19_00185* supresează apărarea bazală a plantelor. Necătând la diversitatea efectorilor studiați până în prezent, există încă multe lacune în cunoașterea virulenței fitoplasmei [136, 124].

1.7. Simptomele infecției fitoplasmice '*Ca.* P. solani' la tomate

Agentul patogen '*Ca.* P. solani' la tomate provoacă maladia denumită stolbur cu numeroase simptome specifice [20]. Datorită perioadei mai îndelungate de incubație, stolburul apare în culturile de tomate la mijlocul sau sfârșitul lunii iulie [1]. Primele simptome se manifestă la frunze care devin de o culoare verzui-gălbuie, în special la margini și se pot răsuci [133]. Frunzele noi sunt de dimensiuni mai mici. Tulpinile devin subțiri la apex, iar la nivelul infecției tulpina se îngroașă din cauza dezvoltării anormale a floemului. Aceasta se manifestă ca benzi de 1-2 mm lățime îmbibate cu apă, care se extind spre xilem. Dezvoltarea lăstarilor laterali conferă un aspect tufos plantei. Mugurii florali se dezvoltă în mod anormal, sepalele pot deveni de nuanță violetă de-a lungul nervurilor. Sepalele se lungesc semnificativ și în unele cazuri concresc într-un caliciu de formă tubulară [109], [1].

Florile deja formate în momentul când a avut loc infecția devin erecte și deseori pot fi sterile. Petalele lor devenind verzi în loc de galbene deoarece are loc transformarea cromoplastelor

în cloroplaste. Simptome caracteristice se observă la flori, care prezintă pedunculi îngroșați, alungiți și cu o poziție aproape verticală [96]. Ovarul prezintă o mărire în volum și o extindere a axei care separă punctul de fixare al petalelor și al sepalelor [1]. Formarea fructelor se oprește la momentul infecției. Fructele verzi deja formate se solidifică, se usucă concomitent cu apariția petelor. La fructele tinere are loc necroza embrionului. Pedunculii fructelor sunt mai groși decât cei ale plantelor sănătoase, în ciuda dimensiunii neobișnuit de mici a fructelor [19, 132]. Pagubele produse de stolbur la tomate sunt considerabile îndeosebi la soiurile tardive [111].

Astfel, rezumând, simptomele tipice ale plantelor infectate includ îngălbenirea frunzelor, aspectul tufos, răsucirea frunzelor, creșterea anormală a florilor și nanismul. Cu toate acestea, mecanismele moleculare care stau la baza majorității modificărilor raportate rămân în mare parte enigmatice [18].

1.8. Distribuția '*Ca.* P. solani'

Fitoplasma '*Ca.* P. solani' are o distribuție extinsă (Figura 1.6) fiind întâlnită în special în zona euro-mediteraneeană. De asemenea, este prezentă în Africa de Nord (Maroco și Egipt), în Asia mică și Estul Apropiat (Turcia, Azerbaidjan, Armenia, Iordania, Israel, Uzbekistan, Cipru, Liban). A fost detectată în Ucraina și în vestul Rusiei și a fost raportată prezența în numeroase culturi în Iran. La fel, unele rapoarte mai vechi ne indică prezența infecției fitoplasmice în Arabia Saudita (1968) și Niger (1988) [39].

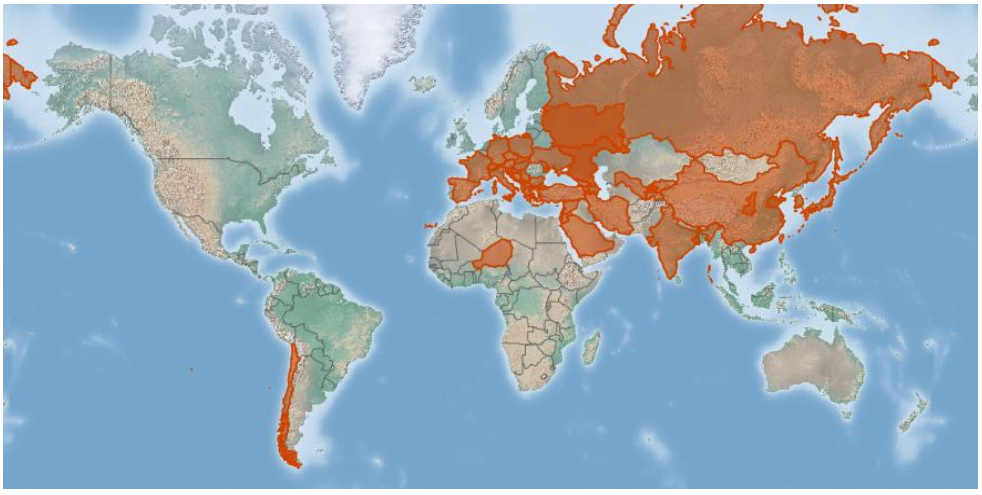


Figura 1.6. Distribuția '*Ca.* P. solani' în lume [39]

Apariția locală a fitoplasmei a fost detectată în Chile și China. Însă, cel mai des se întâlnește în regiunea europeană în Austria, Grecia, Polonia, Bulgaria. De asemenea, a fost identificată în unele regiuni a Republicii Cehe, Franței, Ungariei, Italiei și României. Cu toate că infecția a fost raportată în Belgia și Cipru, aceasta nu a fost stabilită în aceste țări sau considerată eradicată [19].

În Asia acest patogen are o răspândire majoră, cu *Hyalestus obsoletus* ca principalul vector de transmitere. Astfel, infecția este prezentă în Azerbaidjan, Armenia, Kîrgîstan, Tadjikistan, Turcia, India și Uzbekistan. La fel, infecția a fost identificată atât în America de Nord (SUA, Canada), în unele țări din Africa cât și Australia. Aceste observații demonstrează răspândirea globală a '*Ca.* P. solani', transformând-o într-o problemă de amploare mondială[39].

1.9. Controlul infecției fitoplasmice

Controlul răspândirii fitoplasmei reprezintă un obiectiv important în numeroase țări cea ce va duce la minimizarea efectelor negative produse de aceasta. Măsurile de control se realizează pe mai multe direcții, inclusiv distrugerea infecției bacteriene în plante și\sau insectele vector și în final creșterea rezistenței plantelor [11].

Pentru controlul fitoplasmelor, se utilizează antibioticele, insecticidele și a alte substanțe chimicale [50]. Nimicirea fitoplasmelei are loc cu utilizarea antibioticilor, până în prezent se utilizează patru cele mai răspândite antibiotice tetraciclina, oxitetraciclina, streptomicina, eritromicina, Aceste antibiotice sunt capabile de a reduce simptomele aparente ale infecției fitoplasmice, dar nu pot stopa complet boala [26]. Totuși, ele au unele dezavantaje sunt costisitoare și sunt interzise pentru culturile agricole în multe țari, inclusiv în Uniunea Europeană [9]. De asemenea, se utilizează numeroase microorganisme simbionte care, deși influențează negativ asupra fitoplasmei, nu afectează gazda. Printre caracteristicele importante ale acestor bacterii este ocuparea aceluiași organ ca și agentul patogen cât și efectele negative ale bacteriei sau a produselor metabolice a acestuia contra fitoplasmei [17]. Aceste microorganisme pot fi modificate genetic pentru obținerea obiectivelor propuse. Astfel, odată cultivate și modificate acestea pot periclita dezvoltarea fitoplasmelor prin: reducerea competențelor de vector, expresia genelor ce pot ucide fitoplasma, inducerea incompatibilității citoplasmatice, crearea unei competențe cu bacteria patogenă [115].

Datorită caracteristicilor ciclului biologic al fitoplasmelor - principalele strategii de control nu sunt direcționate împotriva agentului patogen și includ distrugerea obligatorie a plantelor infectate și a insectelor vectori prin tratamentele insecticide, parazitoizi ș.a. În unele cazuri, barierele fizice, cum ar fi plasele anti-insecte sau ecranele, pot proteja eficient plantele de vectori [12].

Principalele plantele rezervoare sunt *Convolvulus arvensis, Urtica dioica* și *Calystegia sepium*. Pentru aceasta se utilizează erbicidele concomitent minimizând populația de insecte vector care iernează în rădăcinile acestora [31]. Unele studii au raportat metode pentru eliminarea

fitoplasmelor din plantele infectate folosind cultura calusului, terapia termică și tratarea cu apă fierbinte [25].

Utilizarea insecticidelor nu este întotdeauna eficientă, deoarece infectarea are loc mai devreme până când insecticidul începe a acționa și în consecință fitoplasma se dezvoltă în continuare [86]. La fel, insecticidele posedă unele limitații, deoarece nu pot combate insectele care migrează constant din alte regiuni. Totuși, insecticidele au un efect pozitiv legat de reducerea transmiterii bolii în cadrul aceleași culturi. De asemenea, un alt mod ce permite reducerea populației de insecte vector este utilizarea capcanelor [9].

O metodă modernă de combatere cu fitoplasma este crearea plantelor transgenice care expresează anticorpi împotriva majorității proteinelor membranare ale fitoplasmelor. De asemenea, se utilizează inductorii de rezistență care cresc rezistența nespecifică prin eliberarea elicitorilor [141]. În prezent, există o varietate de elicitori comerciali care au numeroși adjuvanți ce acționează ca promotori ai rezistenței nespecifice. De exemplu, benzotiodiazol care poate proteja aproximativ 75 % din plantele stropite comparativ cu doar 35% la plantele control, care nu au fost tratate. Totuși studiile privind eficiența utilizării elicitorilor cât și a altor substanțe este limitat și este necesar de mai multe informații despre interacțiunea gazdă-patogen [16]. Sanchez-Rojo și colaboratorii (2011) au studiat efectul acidului salicilic asupra plantelor de cartof și au constatat o reducere semnificativă a expresiei simptomelor [117]. Wu şi colaboratorii (2012) au demonstrat că pre-tratamentul cu două aplicații de acid salicilic la 2 și 4 zile înainte de inocularea fitoplasmei de către insecte, a redus semnificativ simptomele bolii la plantele de tomate [143].

Un studiu important a fost realizat privind utilizarea fungilor endofiți care habitează în interiorul plantei fără a provoca daune semnificative. Acești fungi au arătat numeroase efecte pozitive inclusiv eliberarea numeroșilor metaboliți care se utilizează în biotehnologie, cum ar fi antibiotice și substanțe antitumorale [115]. La fel, Linguao și alții [70] au studiat plantele de tomate infectate cu stolbur, tratate cu fungi care au demonstrat o creștere a rezistenței față de fitoplasmă, prin formarea unei bariere proteice, prezența depozitelor fenolice în vacuole și în lumenul elementelor conducătoare.

Implementarea bunelor practici agricole este esențială pentru reducerea incidenței și răspândirii fitoplasmei. Practicarea rotației culturilor poate întrerupe ciclul de viață al vectorilor și a reduce numărul rezervoarelor de fitoplasme [97]. Utilizarea materialului de plantare certificat liber de boli este crucială, în special pentru culturile perene și cele propagate vegetativ [77]. Acest lucru asigură că noile plantări sunt libere de fitoplasme și alți patogeni. Curățarea uneltelor și tehnicii pentru a preveni transferul de fitoplasme de la plantele infectate la cele sănătoase, poate ajuta la reducerea răspândirii, mai ales în pepiniere și în timpul plantării [21].

Utilizarea unei combinații dintre strategiile de mai sus, într-o manieră integrată, adaptată culturii specifice, speciilor locale de vectori și a condițiilor de mediu, este cea mai eficientă modalitate de a gestiona bolile cauzate de fitoplasme. Managementul integrat al dăunătorilor se concentrează pe gestionarea sustenabilă a dăunătorilor cu cel mai mic risc posibil pentru om și mediu [85].

1.10. Detectarea fitoplasmei

Acuratețea și precizia reprezintă două condiții esențiale în diagnosticul și identificarea agenților patogeni pentru caracterizarea și controlul acestora. Detectarea fitoplasmei a fost comparativ mai dificilă decât la alți fitopatogeni datorită imposibilității cultivării *in vitro* până în 2012 [134, 9]. În diagnosticul fitoplasmei se utilizează diverse metode, incluzând tehnici tradiționale bazate pe proprietățile biologice ale acestora și tehnici microscopice. O metodă specifică și sensibilă o constituie reacția de polimerizare în lanț în special bazată pe studiul asupra genei 16S ARNr. Alte metode alternative sunt *Real-time* PCR (RT-PCR), *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) și *nested*-PCR [92].

În tabelul de mai jos (Tabelul 1.4) sunt prezentate unele caracteristici ale diferitor metode de detecție a fitoplasmei (microscopia optică, microscopia electronică, ELISA și PCR). Alegerea metodei adecvate în funcție de obiectivelor propuse reprezintă un element esențial în realizarea unei cercetări reușite.

Tabelul 1.4. Compararea diferitor metode de detectare a fitoplasmei [93]

	Microscopul	**Microscopia electronică**	**ELISA**	**PCR**
Specificitatea	Universală	Universală	Metoda universală nu a fost elaborată.	Poate fi universală sau specifică.
Distingerea fitoplasmei de materialul vegetal	Poate fi dificilă	Poate fi dificilă	Posibilă cu un bun antiser	Simplă cu o pereche sigură de primeri
Sensibilitatea	Moderată	Moderată	Moderată	Foarte înaltă
Validitatea	Moderată	Înalt moderată	Foarte înaltă	Înalt moderată
Productivitatea	Necesită timp	Necesită timp	Nu necesită timp îndelungat	Nu necesită timp îndelungat
Costul echipamentului	3.000 Euro (microscopul fluorescent)	100.000 Euro (microscop electronic, ultramicrot)	1.000 Euro (cititor ELISA)	3.000 Euro (amplificator, electroforeza)
Comentarii	Necesită personal antrenat	Necesită personal antrenat	Dificil de a elabora noi teste de detecție a unor specii de fitoplasmă	Pericol de contaminare încrucișată

Metode morfologice

Metodele morfologice se axează pe stabilirea bolii pe baza simptomelor morfologice la plante (îngălbenire, nanism, etc). Dezavantajul metodei constă că adesea este imposibil să se identifice plantele infectate cu patogenul în stadiile incipiente ale infecției, deoarece simptomele pot fi confundate cu regimul mineral sau hidric insuficient. De asemenea, în cazul bolilor mixte simptomele infecției pot fi camuflate. Această metodă de determinare a fitoplasmei a fost pe larg utilizată înainte de apariția microscopiei electronice [156].

Metode microscopice

Metodele microscopice constau în identificarea fitoplasmei la microscopul electronic de transmisie, optic, DAPI etc. Doar datorită dezvoltării metodelor microscopice de analiză a fost posibilă descoperirea fitoplasmei și determinarea localizării ei în floemul plantei gazdă [9]. După descoperirea fitoplasmelor în întreaga lume, au început studii electrono-microscopice active ale agenților patogeni ai îngălbenirii plantelor și a terapiei lor cu tetraciclină. Numărul lucrărilor dedicate fitoplasmelor a început să crească progresiv: în 1967 au fost publicate 4 lucrări, în 1968 - 29, în 1969 - 61, în 1970 - 90, iar până în 1974, numărul fitoplasmelor descoperite la plante a ajuns până la 50 [13]. În decursul a 30 de ani microscopia electronică a fost una din cele mai des folosite tehnici de detecție și caracterizare a fitoplasmei [105]. La fel, această metodă a fost folosită nu doar în detectarea acestea dat și în studiul interacțiunii dintre plantă-gazdă și fitoplasmă. Totuși, această tehnică prezintă numeroase dezavantaje ca de exemplu: necesită timp și personal calificat, este costisitoare, datorită pleomorfismului fitoplasmei este complicat de a fi identificată [121].

Metode serologice

Metodele de diagnostic în special cele bazate pe tehnica ELISA prin utilizarea anticorpilor monoclonali sau policlonali, au fost aplicate încă de la începutul anilor 80 ai secolului trecut. Anticorpii au fost produși împotriva întregii celule fitoplasmice, purificate de la plantele infectate, împotriva proteinelor membranare imunodominante (IMP) și proteinele membranare SecA [140]. Aceste inovații au facilitat la apariția testelor serologice pentru detecția și caracterizarea fitoplasmei. Cu toate acestea, metodele serologice nu au fost pe larg utilizate în identificarea fitoplasmei datorită pierderii specificității și sensibilității în producerea unui titru înalt de antiseră policlonală. Producția lor este restrânsă și titrul nu poate sa ajungă la valori înalte, în special la plantele erbacee ca saschiul. Din cauza că fitoplasma este dificilă de a fi cultivată *in vitro* producerea anticorpilor necesită timp. datorită reacției de încrucișate cu proteinele gazdă a plantelor și a reactivității nespecifice de fond. La fel, se confruntă cu probleme legate de reacțiile încrucișate cu proteinele gazdă a plantelor și de reactivitatea nespecifică în fond [92].

RFLP

Primele aplicații ale RFLP pentru identificarea și clasificarea fitoplasmelor au fost combinate cu analiza Southern blot. Similitudinea dintre organizarea genomică a PWB fitoplasma și CP fitoplasma a fost identificată cu ajutorul hibridizării dot și RFLP [33]. La fel, un moment important îl constituie ca odată cu dezvoltarea tehnicii RFLP a fost posibil nu doar detecția lor, dar și determinarea speciei de fitoplasmă ce infectează planta gazdă [118]. Odată cu apariția PCR în studiul fitoplasmei, RFLP analiza a 16S ARNr a fost pe larg utilizată pentru identificarea și clasificarea fitoplasmei. Astfel unsprezece 16S ARNr grupe și mai mult de douăzeci și cinci subgrupe au fost identificate folosind această metodă. Totuși, fitoplasmele strâns apropiate nu pot fi diferențiate cu ajutorul 16S ARNr datorită naturii lor înalt conservative [134].

Analiza RFLP s-a dovedit indispensabilă în elucidarea diversității genetice, evoluției și dinamicii de transmitere a '*Ca*. P. solani'. Această tehnică continuă să fie un instrument valoros în arsenalul de unelte moleculare pentru studiul bolilor induse de fitoplasme, contribuind la dezvoltarea unor strategii țintite pentru gestionarea și controlul bolilor în context agricol [118].

PCR

Metodele de diagnostic bazate pe PCR s-au dezvoltat la sfârșitul anilor 80 și la începutul anilor `0 ai secolului trecut, iar mai apoi a fost larg folosită în diagnosticul fitoplasmei. Analiza PCR asigură o detecție mult mai veridică comparativ cu testele serologice sau alte metode biologice de diagnostic. Inițial detecția fitoplasmei s-a realizat pe fragmentele clonate de fitoplasmă. Detectarea fitoplasmei se realizează în special cu primeri generali pe baza secvenței înalt conservative 16S ARNr [22]. Totuși, în ultimul deceniu, mai multe studii au arătat că numeroase tulpini de fitoplasme strâns legate nu pot fi ușor diferențiate prin analiza secvențelor 16S ARNr. De aceea, mai multe gene mai puțin conservate incluzând *rpsV (rpl22), rpsC (rps3), rplP, rpmC, rplE, rpsN, rpsH, rplF, rplR, rpsE, rpmD, Nus, vmp1, stamp, groEL, rpoB, potC* și 23S și secvențele de regiune de distanțiere 16S-23S ARNr au fost utilizate ca marcheri moleculari suplimentari pentru diferențierea mai fină a speciilor strâns legate, precum și a tulpinilor derivate de la o anumită specie [75].

Apariția și utilizarea tehnologiilor bazate reacția de polimerizare în lanț a permis realizarea unui salt în studiu fitoplasmei. Pentru prima dată a fost posibil detectarea și studiul întregului spectru de secvențe fitoplasmice asociate cu plantele sau insectele vector în lume. La fel, aceasta metodă permite identificarea și studiul fitoplasmei într-un timp relativ scurt, nu este costisitoare și cel mai important oferind rezultate sigure [22, 122].

Nested-PCR

Metoda *nested* -PCR a fost elaborată pentru a spori sensibilitatea și specificitatea detectării agenților patogeni. Aceasta este una din cele mai des folosite metode în identificarea fitoplasmei la plantele cu concentrații scăzute de patogen [46]. Aceasta metodă constă în utilizarea unui set de primeri localizați între alți doi primeri. Inițial se realizează reacția de polimerizare în lanț cu utilizează primerilor externi, urmată de a doua amplificare cu primerii interni. Fragmentul amplificat cu primeri externi reprezintă matriță pentru amplificarea altui fragment mai scurt, sporind astfel sensibilitatea prin creșterea probabilității de ampificare a regiunii de interes [120].

Alegerea seturilor de primeri pentru diagnosticul fitoplasmei prin *nested*-PCR depinde în mare măsură de fitoplasma căutată. Utilizarea unei combinații de primeri universali poate îmbunătăți diagnosticul fitoplasmei necunoscute, prezente în titru scăzut în gazde. Inițial se folosesc primeri ribozomali urmați de primeri specifici pentru grupuri, ceea ce este extrem de util atunci când fitoplasma ce trebuie diagnosticată aparține unui grup taxonomic bine definit [32]. Metoda dată prezintă numeroase avantaje fiind de circa 100 ori mai sensibila decât doar PCR. De asemenea, s-a demonstrat eficiența reamplificării produselor primei reacții la o diluare de 1:60000 [61]. Aceasta poate fi folosită cu succes în cazul detecției fitoplasmei la plantele lemnoase, unde concentrația fitoplasmei este joasă și infecția fitoplasmică nu poate fi detectată prin metode care nu sunt bazate pe analiza PCR [138].

Real-Time PCR

Această metodă de detecție este utilizată pe scară largă în diagnosticul fitoplasmei datorită sensibilității sale, veridicității rezultatelor, automatizării înalte, ce permite analiza unui eșantion mare de probe [44]. Principiul tehnicii constă în adăugarea unor marcaje fluorescente în amestecul de reacție, permițând determinarea cantității de ADN amplificat în timp real [81]. În timpul realizării amplificării acumularea noilor ampliconi la fiecare ciclu este vizualizată la monitor, eliminând necesitatea efectuării electroforezei la final. Metoda *real-time* a fost dezvoltată atât pentru detectarea specifică, cât și nespecifică a fitoplasmei [44]. Obiectivul elaborării metodei a constat în identificarea sensibilă și sigură a unei specii de fitoplasme sau a unui grup specific de fitoplasme. De exemplu, TaqMan și SYBR green au fost aplicate în diferite teste diagnostice pentru grupul 16SrX, 16SrV și –XII, 16SrI și 16SrVI fitoplasme. Cu toate acestea, mai multe dintre aceste teste specifice reacționează încrucișat cu fitoplasmele din alte grupuri. Cea mai reușită încercare de a dezvolta un test complet universal a fost un test TaqMan, care a demonstrat capacitatea de a amplifică toate grupurile 16Sr, cu excepția 16SrIV, 16Sr XIII și 16Sr XIV, care nu au fost testate [49].

Secvențierea ADN-ului

Importanța secvențierii fitoplasmelor este în identificarea rapidă și precisă a tulpinilor de fitoplasme ce ajută la diagnosticarea bolilor plantelor și la implementarea strategiilor de management adecvate. Această tehnologie avansează înțelegerea noastră despre biologia fitoplasmelor, inclusiv interacțiunile lor cu plantele gazdă și insectele vector. De asemenea, analiza diversității genetice a fitoplasmelor îmbunătățește înțelegerea noastră despre evoluția și adaptarea lor la diferite gazde și medii [139].

Inițial secvențierea fitoplasmei era dificilă din cauza necesității separării ADN-ului patogenului de ADN-ul plantei sau al insectei gazdă. Această problemă separă fitoplasmele de majoritatea altor proiecte de secvențiere a genomului bacterian, iar abordările metodologice se concentrau pe utilizarea țesuturilor puternic colonizate și pe îmbogățirea ADN-ului fitoplasmei. Au fost utilizate o serie de metode de izolare a ADN-ului fitoplasmei din țesuturile gazdă ale plantelor și insectelor [129]. Impactul acestei situații a fost sever pentru primele proiecte de genom, care au folosit secvențierea Sanger. În timp ce cele mai recente proiecte de genom de fitoplasmă au încercat să depășească problema prin cantități uriașe de citiri derivate din abordări de secvențiere de generație următoare, permițând astfel generarea de secvențe de schiță sau chiar genomi fitoplasmatici compleți [64]. Totuși secvențierea completă a fitoplasmei a fost dificilă din cauza unui număr mare de secvențe repetitive în genomul fitoplasmei, ducând la secvențierea incompletă a genomului. [27, 42, 145].

Inițial, accentul în caracterizarea genotipică se punea pe gena 16S ARNr, care servea ca coloană vertebrală pentru taxonomia fitoplasmei. În multe genuri bacteriene, gena 16S ARNr nu este suficientă pentru a diferenția speciile, fiind necesară analiza secvenței multi-locus ale altor gene pentru studii filogenetice [84,73]. Deși secvențele schiță ale genomului oferă perspective asupra biologiei fitoplasmei, natura fragmentată ale acestor date limitează posibilitățile de analiză genomică comparativă [113].

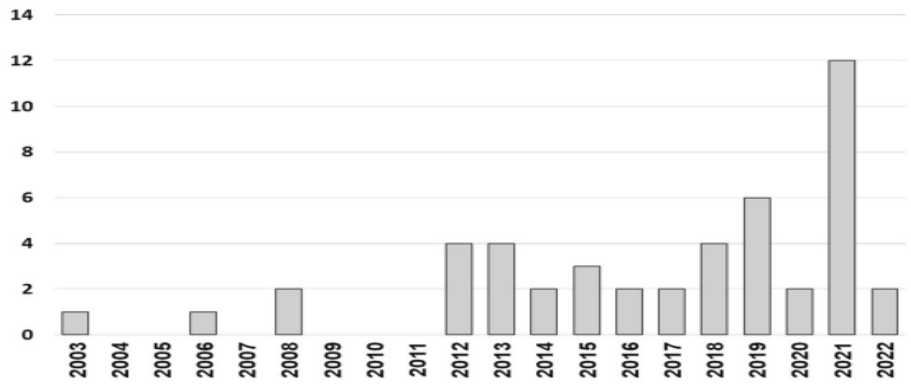


Figura 1.7. Numărul de genomuri ai fitoplasmei secvențiate anual din 2003 [139]

În 1994, în Japonia a început secvențierea întregului genom al fitoplasmei și s-a finalizat în 2004. Primul genom complet al fitoplasmei *OY-M* a fost publicat în 2004. Până în anul 2021, 47 de genomi al fitoplasmelor au fost secvenționați (35 schițe și 12 genomi compleți, implicând 13 grupe și 29 subgrupe (Figura 1.7), [103, 139].

În ultimii ani, identitatea medie de nucleotide a întregului genom a apărut ca o metodă robustă pentru evaluarea limitelor speciilor și estimarea înrudirii genetice dintre doi genomi. Fără îndoială, secvențierea genomului fitoplasmei va continuă să aducă noi date esențiale pentru studiul multilateral al fitoplasmei [57,112].

1.11. Concluzii la capitolul 1

1. *'Ca.* P. solani' este un agent patogen ce afectează o gamă largă de specii vegetale incluzând multe culturi agricole. Cele mai expuse culturi la fitoplasmă se enumeră tomatele, vița de vie, ardeiul, etc.
2. Fitoplasmele habitează floema plantelor, extrăgând nutrienți și provocând astfel o scădere în calitatea și cantitatea produselor agricole. În Republica Moldova, infecția '*Ca*. P. solani' a fost frecvent observată la tomate și vița de vie, având potențialul de a reduce producția agricolă cu până la 90%.
3. Infecția este predominant răspândită de insectele din familiile Psyllidae, Cicadelidae și Cixiidae. De asemenea, fitoplasma se transmite prin plante perene, care servesc drept locuri de iernare pentru aceste insecte. Speciile de plante perene care sunt rezervoarele de bază a patogenului în zona europeană și includ în special *Convolvulus arvensis*, *Costygela sepium* și *Urtica dioica*.
4. Un rol important în răspândirea infecției '*Ca*. P. solani' este influența condițiilor climatice și de practicile agrotehnice inadecvate.
5. Agentului patogen este complicat de a fi controlat din cauza caracterului sistemic al bolii. Printre metodele de a reduce răspândirea patogenului se numără folosirea insecticidelor, erbicidelor și al unor soiuri rezistente.
6. Evoluția tehnicilor moleculare, în special PCR, a revoluționat fundamental diagnosticul fitoplasmei.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Obiectul de studiu

Pentru cercetare, au fost utilizate plantele speciei *Solanum lycopersicum*. Tomatele sunt plante monoice, care fac parte din familia *Solanacee*, genul *Solanum*. Au fost folosite următoarele genotipuri de tomate: Elvira, Cerasus, Mary Gratefully, Deșteptarea, create în cadrul laboratorului Genetica aplicată a Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP), oferite cu amabilitate de dr. hab. Mihnea Nadejda. Experimentele au fost desfășurate în condiții de laborator, utilizând material vegetal crescut în câmp, solariu și în termostat.

2.2. Caracteristica speciilor și soiurilor de tomate analizate

2.2.1. Elvira

Plantă determinantă fără ştamb, relativ compactă, cu înfrunzire și ramificaţie medie (Figura 2.1B). Fructele sunt de dimensiuni mari (125-130 g), cu o formă rotundă-aplatizată. Fructele necoapte sunt de un verde palid cu o pată verde la bază slab pronunţată, iar când devin coapte devin roşii cu o suprafaţă netedă și un vârf rotund. Compoziția fructelor include: masa uscată (5,0-5,7%), zahăr total (3.5-4.0%), vitamina C (25,0-30,0 mg/%) și un pH de 4,0-4,3. Soiul este timpuriu având o perioadă de vegetaţie cuprinsă între 95-104 zile, cu o producție generală de 54-70 t/ha și o producție comercială de 52-68 t/ha. Avantajul acestui soi constă în rezistenţă sporită la frig (84,4%).

2.2.2. Mary Gratefully

Soiul a fost dezvoltat pe baza hibridizării compuse a Potoc x F1 (Gruntovâi gribocschii x *L. chilense*), utilizând metoda embriocallusului și o selecție de lungă durată (Figura 2.1C). Este un soi mediu timpuriu, cu o perioadă de vegetație între 106-113 zile, când este cultivat prin răsad. Fructele sunt rotunde, de dimensiuni medii, cu o greutate ce variază între 80-100 g. Acestea conțin masa uscată (4,6-5,3%), zahăr total (3,9-4,21%), vitamina C (24,9-30,3 mg/%) și au o aciditate de 0,28-0,38%. În cultură de răsad, soiul oferă o producție totală de 58,0-66,0 t/ha și o producție comercială de 53,0-61,0 t/ha. Avantajul soiul este că dispune de o rezistenţă sporită la frig (85-90%).

2.2.3. Deșteptarea

Această soi de tomate se caracterizează printr-o tufă compactă, cu o ramificare și înfrunzire abundentă, atingând o înălțime cuprinsă între 44 și 57 cm (Figura 2.1D). Fructele sunt netede, de o culoare roșie intensă și rotunde. La baza fructului se observă o pată verde de dimensiuni medii, în timp ce vârful este neted, cu o mică pată punctiformă. Greutatea fructelor variază între 100 și 166 g. Cultivate prin răsad, perioada de vegetație, de la răsărirea în masă până

la începutul coacerii fructelor, durează 114 zile. Fructele conțin 5,9-6,2% de masă uscată, zahăr total (5,3-5,9%), vitamina C (22-26 mg/%) și o aciditate de 0,45-0,55%. Producția totală variază în limitele a 44,0-50,0 t/ha, iar producția comercială 43,0-45,0 t/ha. Avantajul acestui soi constă în rezistența sporită la arșiță.

2.2.4. Cerasus

Plantă determinantă, tufă compactă, bine ramificată și înfrunzită, cu o înălțime de 46-50 cm. Frunzele sunt semi-erecte, cu o lungime de până la 20-23 cm și o lățime de 15-17 cm, având o textură mediu gofrată și o culoare verde, sectarea limbului bipenată (Figura 2.1A). Floarea este de dimensiuni medii, având un diametru de 2,0 cm. Fructele sunt de formă circulară, cu o suprafață ușor muchiată și culoare roșie. Baza fructului are o pată verde slabă, iar vârful este neted, cu o mică pată sub formă de punct. Greutatea fructului variază între 30,0 și 41,0 g. În cazul cultivării prin răsad, perioada de vegetație durează aproximativ 104 zile. Fructele conțin masă uscată (5,2-5,8%), zahăr total (5,8-6,8%) și vitamina C (25,7-26,8 mg/%). Producția totală este de 33,4-76,7 t/ha și cu o producție comercială de 89,0-93,3%. Unul dintre avantajele acestui soi este rezistența sa ridicată la arșiță, fiind recomandat de a se cultiva fie prin semințe, fie prin răsad.



Figura 2.1. Soiurile de tomate autohtone analizate

A. Cerasus, B. Elvira, C. Mary Gratefully, C. Deșteptarea.

2.2.5. Caracteristica formelor spontane de tomate analizate

Solanum habrochaites

Este o specie din genul *Solanum,* cunoscută anterior sub denumirea *Lycopescicum hirsutum var. glabratum*. Această specie spontană se caracterizează prin fructe mici de culoare verde închisă, cu perişori glandulari pronunţaţi, având o masă medie de 1,5-2,5g (Figura 2.2A). Înălțimea plantei variază între 90-120 cm. Frunzele sunt de dimensiuni mari, de 34-49 cm lungime și 20-28 cm lățime, cu o culoare verde deschis pe partea superioară și albicioasă pe partea inferioară, fiind pubescente pe ambele fețe, cu peri denși și scurți. Inflorescența este de dimensiuni

medii de 15-20 cm lungime, fiecare ramură a inflorescenței având 10-15 flori dens aranjate. Florile au în diametru 3-4 cm, sunt situate pe pedicele lungi pubescente. Fructele sunt mici (0,8-3 g), rotunde, cu pereții subțiri, de 1,5-2 cm înălțime și un diametru de 1-1,8 cm. Acestea sunt dens acoperite cu peri lungi, verzi sau puțin albicioși, mai rar maro. Fructele sunt necomestibile, cu gust amar ce conțin glicoalcaloizi. Semințele sunt de culoare maro închis, netede, cu excepția unei porțiuni apicale înguste. Perioada de maturare este de aproximativ 69-80 de zile. Specia este rezistentă la maladii.

Solanum pimpinellefolium

Planta este erbacee cu un miros puternic, având tulpini târâtoare, puternic ramificate care pot atinge până la 2 m lungime. Frunzele sunt mici (11-12 cm lungime și 7-9 cm lățime) sau medii (15-18 cm lungime și 11-15 cm lățime), penate intermitent. Pseudostipulele sunt cel mai adesea absente. Frunzele sunt de culoare verde închis pe partea superioară și verzi-gălbui pe partea inferioară. Inflorescența este simplă, lungimea variază, de la 10-12 cm la 24-40 cm lungime. Pedunculul este scurt 5-30 mm, de obicei 15 mm. Florile sunt mici, de aproximativ 1,4-2 cm în diametru. Corola este galben strălucitoare sau ușor portocalie. Fructele sunt foarte mici roșii, roz sau galbene (Figura 2.2B). Semințele sunt mai mici decât la tomatele de cultură de 3 mm lungime, 1,5-2 mm lățime, cu mici depresiuni și sunt numeroase în fructe.

Solanum peruvianum

Plantele sunt târâtoare, cu tulpini multiple. Tulpinile sunt cenușii, semi-oblice, subțiri, acoperite cu peri albi și scurți. Frunzele sunt disecate penat, închise la culoare, cu un pețiol scurt, și ușoară pubescență. Antocianina se observă de-a lungul nervurii mediane. Frunzele au o lungime de 14-22 cm și o lățime de 8-14 cm. Inflorescențele se formează după 2-3 frunze. Florile sunt cu cinci membri, pe pedicele lungi segmentate, mai întâi aplecate și apoi devin erecte. Corola are 2-3,5 cm în diametru, galben portocaliu sau galben deschis cu dungi albe. Fructul este rotund sau rotund comprimat, cu un diametru de 1,5-2,0 cm, de culoare verde, verde închis sau albicios. Pubescența este rară (Fig.2.2 D). Semințele sunt cu sau fără aripi apicale, netede, cu o greutate medie de 0,5-0,8 g. *S. peruvianum* este utilizat pe scară largă în programele de reproducere pentru rezistența sa la diferite boli și îmbunătățirea compoziției chimice a fructelor. Această specie permite transferul rezistenței la nematozi, făinare și alte boli.

Solanum chilense

Plantele nu depășesc 100-120 cm, cu excepția unor lăstari individuali care pot atinge 180 cm lungime. Se caracterizează prin tulpini subțiri, fragile, drepte, având o grosime de 1,2-1,4 cm. Tulpinile sunt de culoare verde deschis, acoperite cu peri mici și denși. Frunzele sunt penate, de 19-21 cm lungime și 11-12,5 cm lățime, de culoare cenușiu-verzui cu nuanță albăstruie.

Inflorescențele este bifurcată, lungă de 13-25 cm, cu puține flori (6-15) flori. Corola este de un galben-portocaliu strălucitor, cu cinci petale, mai rar, cu șapte, având un diametru de 2,5-3,3 cm. Înflorește foarte abundent, din a doua jumătate a lunii iunie până la începutul lunii septembrie. Fructele sunt verzi, cu o nuanță gălbuie cu o ușoară manifestare de culoare antocianică la maturitate, puternic pubescente, cu peri lungi albi (Figura 2.2 C). Plantele acestei specii se caracterizează prin vărsare puternică de flori și un procent scăzut de fructe. Semințele sunt maro închis, sunt puține la număr în fructe. Specie este apreciată pentru genele de rezistență la virusul mozaicul tutunului, agentul cauzal al bolii ofilirii [155].



Figura 2.2. Formele spontane de tomate analizate

A – *S. habrochaites*, B – *S. pimpinellifolium*, C – *S. chilense*, D – *S. peruvianum*.

2.3. Experiențe în câmp

Diagnosticul molecular al '*Ca.* P. solani' a fost efectuat pe plantele de tomate cultivate în câmp. S-a efectuat analiza comparativă a rezultatelor obținute în trei ani de vegetație evaluați – 2018, 2019 și 2020. Schema experimentală a fost, în general similară în toate sezoanele. Au fost analizate 4 soiuri de tomate: Elvira, Cerasus, Mary Gratefully și Deșteptarea, create în Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor. În sezoanele 2019 și 2020, designul experimental a inclus adăugarea formei spontane de tomate *Solanum habrochaites*, ca posibil martor. Pentru analiza de la începutul sezonului de vegetație, în câmp, au fost selectate în ordine aleatorie și numerotate a câte 20 plante (2018) sau 12 plante (2019 și 2020) din fiecare genotip. Studiile au fost realizate la trei etape de dezvoltare a plantelor: în iulie – la etapa începutului maturării fructelor, în august – la etapa de coacere în masă a fructelor, și în septembrie - la sfârșitul sezonului de creștere după recoltarea unei părți semnificative a fructelor.

2.4. Colectarea insectelor

Colectarea cicadelor s-a realizat pe parcursul perioadei de vegetație: În solariu – în a doua jumătate a lunii mai, după plantarea tomatelor în câmp (iunie), la etapa de coacere a tomatelor

(iulie –august) și la sfârșitul perioadei de vegetație (septembrie). Insectele au fost colectate în câmp și seră cu ajutorul capcanelor lipicioase (Figura 2.3) sau cu fileul entomologic.



Figura 2.3. Capcană lipicioasă utilizată în colectarea insectelor

2.5. Germinarea semințelor de tomate

Un obiectiv al cercetării a constituit investigarea posibilității transmiterii fitoplasmei prin semințe, care în prezent reprezintă un aspect incert din literatura științifică. Pentru acest scop s-a crescut a câte 15 semințe în cutii Pietri. Germinarea a decurs la o temperatură de 25-26°C timp de 20 zile cu o umiditate relativă a aerului. Pentru analiză au fost luați a câte 12 germeni pentru fiecare probă (Figura 2.4).



A **B**

Figura 2.4. Germinarea semințelor de tomate în condiții controlate

A. Ziua a 3-a de germinare, B. Ziua a 20-a de germinare.

2.6. Izolarea ADN-ului

În cadrul cercetării am utilizat numeroase metode de izolare a ADN-ului, inclusiv metoda de izolare cu DNA-zol, K-acetat, prin fierberea în soluție alcalină și cu microunde.

2.6.1. Izolarea ADN-ului din tomate cu DNA-zol

Pentru izolarea ADN-ului se prelevează aproximativ 100 mg de material vegetal (semințe, germeni, secțiuni din pedunculul fructului, etc.), care ulterior se majorează în 300 µl de DNA-zol. Acesta se transferă într-un tub eppendorf de 1,5 ml. Amestecul rămas pe mojar se spală cu 200 µl de DNA-zol și apoi încă cu 100 µl. Volumul total de DNA-zol fiind de 600 µl. Amestecul se lasă la temperatura camerei peste noapte. Urmează, centrifugarea probelor la 10000 rpm pe 10 minute. La supernatantul extras se adaugă 500 µl etanol 96% și se lasă în decurs a 5 minute la temperatura camerei. Se centrifughează la 4000 rpm timp de 4 minute. Precipitatul se purifică prin adăugarea a 800 µl de etanol 75%. și se centrifughează la 4000 rpm timp de 2 minute. La precipitat se mai adaugă 800 µl de etanol 75% și se centrifughează la 4000 rpm timp de 1 minut. Sedimentul se usucă la temperatura camerei, după care se adaugă 200 µl de apă distilată și se lasă peste noapte la temperatura de 4°C. ADN-ul se solubilizează și se centrifughează la 10000 rpm timp de 10 minute. Pentru o amplificare se ia 2 µl din soluția obținută.

2.6.2. Confirmarea calității ADN-ului izolat din tomate

Determinarea calității ADN-ului extras se realizează cu ajutorul PCR cu primerii ribozomali n65-n66 [35]. Pentru reacție se ia câte 1µl de ADN.

2.6.3. Izolarea ADN-ului din cicade cu DNA-zol

Pentru izolarea ADN-ului din cicade, se ia 20 µl de DNA-zol și se majorează în tub eppendorf. La masa omogenă obținută se mai adaugă 30 µl de DNA-zol și se lasă la temperatura camerei peste noapte. Ulterior, se centrifughează la 16000 rpm la 5°C timp de 15 minute. Supernatantul se transferă în alt tub eppendorf și se adaugă etanol 96% într-un volum echivalent cu jumătate din volumul supernatantului. Amestecul se omogenizează încet și se lasă la temperatura camerei timp de 5 minute. După, se centrifughează la 8000 rpm timp de 5 minute. Precipitatul se purifică cu 2 volume de amestec în proporție de 70% etanol și 30% DNA-zol, apoi se centrifughează la 8000 rpm timp de 3 minute. Se purifică precipitatul cu 2 volume de etanol 96% și se centrifughează din nou la 8000 rpm timp de 3 minute. Etanolul se înlătură și se usucă precipitatul la temperatura camerei timp de o oră. La precipitat se adaugă 20 µl apă distilată și se lasă peste noapte la temperatura de 4°C. Pentru amplificare se ia aproximativ câte 1 µl de ADN.

2.6.4. Izolarea ADN-ului cu K-acetat

Pentru izolarea ADN-ului, aproximativ 100 mg de material vegetal se majorează în 100 µl soluție-tampon de extracție (200 mM TrisHCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS). Apoi se mai adaugă încă 300 µl de soluție-tampon de extracție, obținându-se un volum final de 400 de µl. Amestecul se agită timp de 5 minute la Vortex, apoi probele se incubează la

temperatura de 65°C timp de 15 minute. După răcirea extractul se adaugă 200 µl de K-acetat 5M. Se amestecă minuțios și se incubează la baia rece timp de 15 minute. Apoi, probele se centrifughează la 14000 rpm timp de 20 minute. La supernatant se adaugă 800 µl de etanol și se centrifughează la 4000 rpm timp de 5 minute. Sedimentul se purifică prin adăugarea a 200 µl de etanolul 96 % și odată de 70 %. Fiecare etapă de purificare este urmată de centrifugare la 4000 rpm timp de 2 minute și respectiv 1 minut. În final la precipitat se adaugă 50 µl de apă distilată și se solubilizează. ADN-ul nu este destinat păstrării pe un termen îndelungat.

2.6.5. Izolarea ADN-ului prin fierbere în soluție alcalină (metoda expres)

Principiul acestei metodei este bazat pe localizarea fitoplasmei în țesuturile floemice ale plantei și lipsa peretelui celular. Materialul vegetal se taie în secțiuni fine, la care de se adaugă 10 µl 0.3N NaOH. După ce se pune la fiert la 100°C, pe 5 minute, se adaugă 10 µl 0.3 N HCl și se pipetează bine. Ulterior, se centrifughează la 10000 rpm timp de 3 minute. Pentru analiză se prelevează 1 µl de soluție.

2.6.6. Izolarea ADN-ului cu utilizarea microundelor

La secțiunile fine din peduncul fructului se adaugă 10 µl H_2O, apoi se pune în cuptorul cu microunde la 360 W timp de 5 minute. Apoi se centrifughează la 10000 rpm timp de 3 minute. Pentru analiză se preleviază câte 2 µl de soluție.

2.7. PCR

Reacţia de polimerizare în lanţ constă în amplificarea *in vitro* a unor secvenţe de ADN datorită activităţii enzimei *Taq*-polimeraza utilizând primerii specifici *Forward* și *Revers*. Reacţia conţine următorul amestec de soluţii cu un volum de 25µl: soluție-tampon x1 pentru *Taq*-polimeraza; 0,2 mM dNTP; 2 mM $MgCl_2$; 0,5mM F primer; 0,5mM R primer; *Taq*-polimeraza 1 U; ADN 100-200 ng, apă distilată.

Pentru identificarea specifică a '*Ca.* P. solani' în plante de tomate, plante ruderale și insecte au fost utilizate numeroase perechi de primeri pentru *nested-PCR* pe baza genei *chaperonin* (Tabelul 2.1).

Reacția e decurs în termociclu *MultiGene II Personal Thermal Cycler* sau în *MiniAmp Thermal Cycler* (Figura 2.5A) conform următorului program pentru PCR: Predenaturarea (I) – 5 minute la 94°C; Denaturarea – 30 secunde la 94°C, Atașarea primerilor – 30 secunde la 58°C, Elongarea (II) – 30 secunde la 72°C x n (30; 35; 40; 45); Elongarea finală (III) 10 minute la 72°C și se răcea până la 4 °C (IV). Numărul ciclurilor de amplificare (n) variază în funcție de obiective și materialul de cercetare.

Tabelul 2.1. Primeri utilizați pentru diagnosticul '*Ca.* P. solani'

Nr	Primer	F/R	5'-3' secvenţa	Lung. pb	T_m C°
1	P1	F	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	25	72
2	P7	R	CGTCCTTCATCGGCTCTT	18	67
3	R16F2n	F	GAAACGACTGCTAAGACTGG	20	57
4	R16R	R	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	25	70
5	16Sr396F	F	TAGGGAAGAGCTTGCGTCAC	20	61
6	16Sr396R	R	CGTTGAGCGTTGCACTTAGA	20	60
7	16Sr245F	F	GTAATGGCCTACCAAGACGATG	22	61
8	16Sr245R	R	TTAGCCGGGGCTTATTCAT	19	61
9	cpn421F	F	AGCGCAAAGTATGATTCATCGTGG	24	60
10	cpn421R	R	AAGAGGTAAAATTTCTTGGATCGTGC	26	61
11	cpn200F	F	TTAAAGAAGGGATCGAACTTGC	22	59
12	cpn200R	R	AAAACTTTTGGACTCATCGACA	22	60
13	ps1	F	GCTGCTCAAACAGTTGCACA	20	60
14	ps2	F	TGCCGGTAGTGGAGAAATTGG	21	60
15	ps3	F	ACGGCGTGATTAATGTCGATGA	22	60
16	ps4	R	AAGACTCCCAAAACTTCGTTTTCA	24	59
17	ps5	R	TGACTTGTTGCAGCCCCTAC	20	60
18	ps6	R	TCGACTAATGCCTTACCGCC	20	60
19	qfys5		CAGGAGCAAATCCGATGCTAGTT	23	61
20	qfys6		CGCCGTTTTTGCCCACTTTT	20	61
21	qfys7		GGATCGAACTTGCTGCTCAAAC	22	60
22	qfys8		CCGTTTTTGCCCACTTTTTCCAT	23	61

2.8. *Nested*-PCR

Reacția *nested*- PCR reprezintă o modificare a reacției de amplificare tipice. Aceasta constă în reamplificarea fragmentului de interes cu ajutorul unei perechi de primeri adiționale. Reacția pentru *nested*-PCR a decurs conform următorului program:

Pentru runda I: Predenaturarea 5 minute 94°C; Denaturarea 30 secunde 94°C; Atașarea primerilor 30 secunde 58°C; Elongarea 30 secunde 72°C; x 30; Elongarea finală 10 minute 72°C și se răcea până la 4°C.

Pentru runda II: Predenaturarea 5 minute 94 °C; Denaturarea 30 secunde 94 °C; Atașarea primerilor 30 secunde 58°C; Elongarea 30 secunde 72 °C x 35; Elongarea finală 10 minute 72 °C și se răcea până la 4 °C.

2.9. Electroforeza

Electroforeza este o metodă utilizată pentru separarea fragmentelor de ADN, bazată pe migrare diferenţiată a fragmentelor cu diferite mărimi sub acţiunea câmpului electric. Aceasta permite determinarea calitativă şi cantitativă a produsul amplificat. În această cercetare, electroforeza s-a realizat în gel de agaroză de 1%, 1,5%, 2%. Pentru pregătirea gelului de agaroză de 2 % sunt necesare 2 g de agaroză și 100 ml de soluție-tampon (40mM Tris; 1mM EDTA; acid boric 30mM; H_2O).

Acest amestec se supune temperaturilor înalte și se formează gelul. Suspensia de agaroză se încălzește în cuptorul cu microunde până la fierbere și se răcește la temperatura camerei aproximativ 5 min. În gelul răcit (30-50°C) se adaugă 5 µl bromură de etidiu. Soluţia se toarnă în cuvă cu pieptene si se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute. După, gelul este acoperit cu soluţie tampon în camera de electroforeză. Tamponul de încărcare conține doi coloranți (albastru de bromfenol și xilencianol), care permite vizualizarea frontului de migrare, glicerină pentru a asigura o vâscozitate corespunzătoare la aplicarea probelor. Tamponul de încărcare x10 conține xilen cianol 0.1%, bromfenol albastru 0.1%, EDTA 0.1M (pH 8.0), glicerol 50% și H_2O.

Benzile sunt vizualizate cu compuşi fluorescenţi (bromura de etidiu) prin iradiere cu lumină UV folosind transilluminatorul *Clearview* UV (*CleaverScientific*) la 250-280 nm (Figura 2.5 D). Bromura de etidiu cu concentrația stoc de 10mg/ml soluție se păstrează la întuneric. Se adaugă 5µl de bromură de etidiu până la concentrația finală de 0,5µl/ml. Sensibilitatea variază între 100 pg şi 1 ng/bandă. Camera de electroforeză se acoperă cu capacul şi se conectează la sursa de curent, stabilindu-se tensiunea de 4-5 V/cm (distanţa dintre electrodul pozitiv şi cel negativ). În cercetare dată am folosit o tensiune de 80-100V. Lungimea fragmentelor s-a determinat folosind marcherii 100 bp DNA *Ladder Plus O'Gene Ruler* sau 100 bp *Ladder O'Gene Ruler* (*Thermo Scientific*).

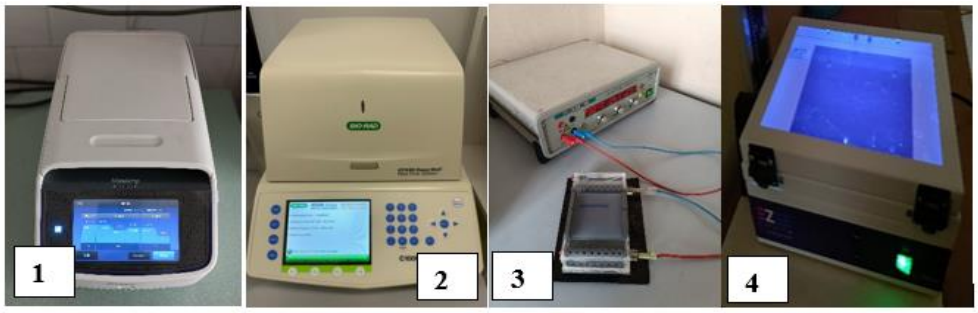


Figura 2.5. Echipament științific utilizat în realizarea experiențelor

1 – *MiniAmp Thermal Cycler*; 2 – *Real-Time* PCR CFX96 *Touch Deep Well* BIO-RAD; 3– aparatul de electroforeză; 4 – *Clearview* UV transilluminator (*Cleaver Scientific*).

2.10. Schema elaborată pentru diagnosticul molecular al fitoplasmei la tomate

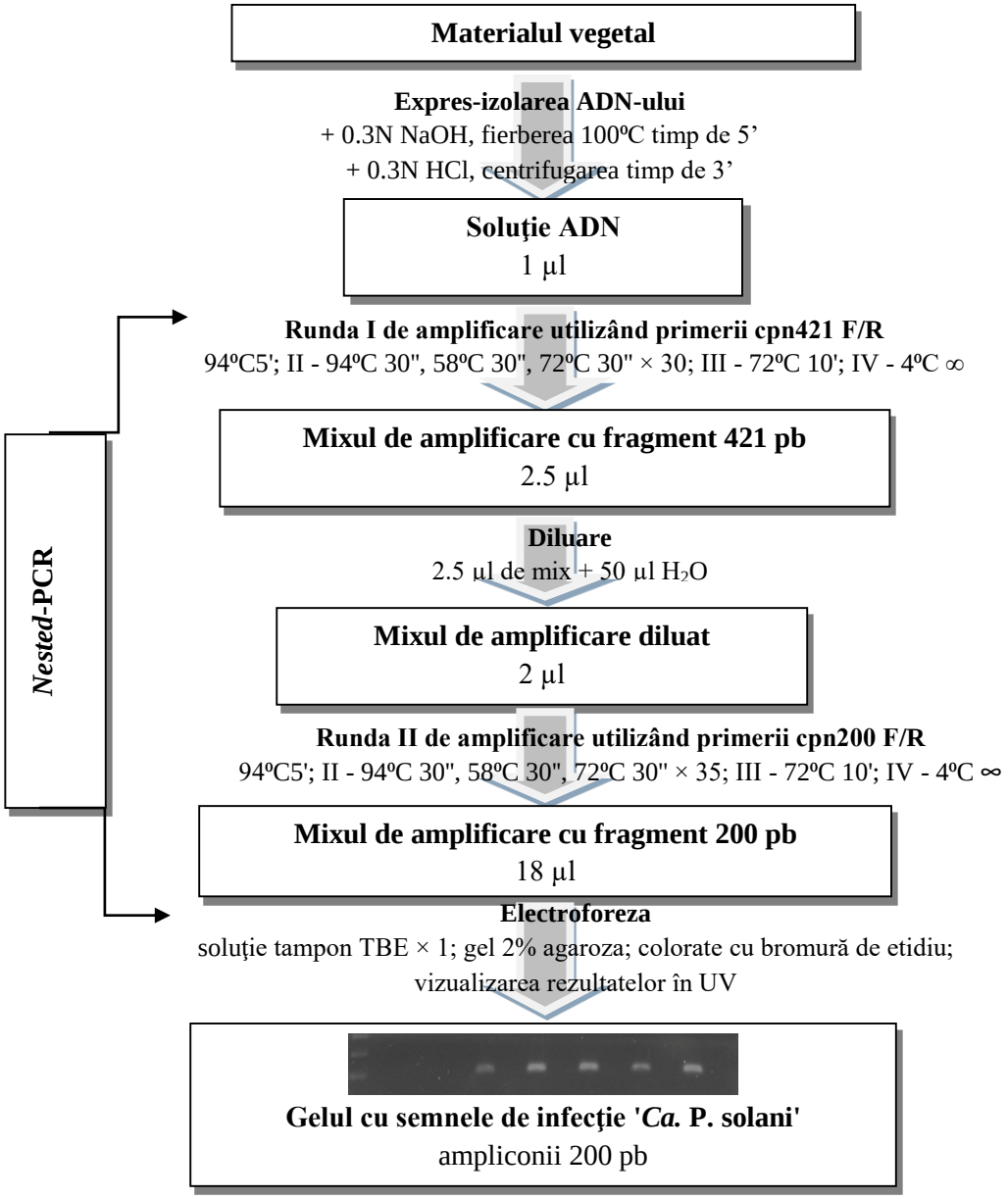


Figura 2.6. Schema diagnosticului molecular al fitoplasmei la tomate

2.11. *Real-Time* PCR

Reacția de amplificare în timp real (sinonime *RT*-PCR, qPCR sau *Real-Time PCR*), s-a efectuat cu scopul de a cuantifica patogenul '*Ca*. P. solani' în plantele a patru soiuri de tomate analizate. Pentru aceasta au fost creați patru primeri folosind secvența oligonucleotidică a genei chaperonin a '*Ca*. P. solani'. Primerii au fost creați utilizând programa *Primer 3* și ținând cont de parametrii specifici: Temperatura de aliniere de 60-65ºC; Temperatura de topire de 60-68 ºC;

Raportul de GC fiind între 35-65%; Auto-complementaritate nu ai mult de 5 și perechile de primeri să nu fie complimentari mai mult de 5.

Condițiile pentru RT-PCR au fost cele recomandate de producătorul *SybrGreen* (*Applied Biosystems*) – Incubarea inițială 2 minute 50°C; Predenaturarea 2 minute 95°C, Denaturarea 15 secunde 95°C, Atașarea primerilor 1 minută 60°C, Elongarea la 30 secunde la 72°C, x 40.
Reacțiile au fost efectuate pe plăci cu 96 de godeuri în *Real-Time* PCR CFX96 *Touch Deep Well* BIO-RAD (Figura 2.5B). Detectarea a fost făcută pe canalul SYBR. Eficiența primerilor a fost calculată folosind calculatorul de eficiență qPCR.

2.12. Analiza statistică

În lucrare au fost investigate în principal trăsăturile calitative, și anume prezența sau absența infecției fitoplasmice la plante. Având în vedere acest fapt, precum și dimensiunea redusă a eșantionului pentru analiza metodelor moleculare, pentru prelucrarea statistică a plantelor individuale obținute a fost ales testul Fisher. Testul Fisher permite evaluarea semnificației statistice a diferențelor între variante în studiul trăsăturilor calitative la eșantioane de dimensiuni reduse. Analiza a fost realizată cu ajutorul soft-ului Excel, folosind o funcție specială-criteriul Fisher.

2.13. Concluzii la capitolul 2

1. Patru genotipuri de tomate: Elvira, Cerasus, Mary Gratefully, Deșteptarea, din colecția IGFPP au fost utilizate în diagnosticul molecular al '*Ca.* P. solani'.
2. Determinarea stolburului s-a efectuat la patru forme spontane de tomate : *S. habrochaites, S. pimpinellifolium,* S. *chilense* și *S. peruvianum*.
3. Experimentele s-au realizat în condiții de laborator utilizând materialul vegetal crescut în câmp, solariu și condiții controlate.
4. Studiile s-au efectuat în trei ani, la trei perioade de dezvoltare a plantelor: iulie – la etapa începutului maturării fructelor, în august – la etapa de coacere în masă a fructelor, și în septembrie - la sfârșitul sezonului de creștere, după recoltarea unei părți semnificative a fructelor.
5. Pentru diagnosticul '*Ca.* P. solani' sau utilizat patru metode de izolare a ADN-ului: prin fierberea în soluție alcalină (metoda expres), K-acetat, DNAzol și cu utilizarea *microundelor*. Diagnosticul molecular al patogenului s-a efectuat prin PCR, *nested*-PCR sau *RT*-PCR utilizând 22 primeri. Ampliconii au fost separați cu ajutorul electroforezei în gel de agarozăă, colorați cu bromura de etidiu și vizualizați sub lumina UV.

6. Germinarea semințelor a decurs timp de 20 zile în condiții controlate. În evaluluare au fost luați câte 12 germeni la fiecare probă.
7. Insectele au fost colectate în câmp și în seră cu ajutorul capcanelor lipicioase sau cu fileul entomologic în apropierea loturilor experimentale a IGFPP.

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

Necesitatea elaborării și optimizării procedeului de determinarea 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 RT-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 realizat în următoarele etape:

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

3.1.1. Selectarea și 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 efectuat folosind extragerea ADN-ului din peduncul prin metoda alcalină expres. Această metoda este rapidă și are un cost redus per probă și permite evaluarea unui eșantion mare de plante. Utilizarea volumelor mai mari decât 10 µl nu oferă rezultate atât de bune. După centrifugarea amestecului obținut, 1 µl de supernatant poate fi adăugat la reacția PCR. Volumul de 2 µl conține mai mulți inhibitori, care pot afecta realizarea PCR.

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 a 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 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
Utilizând K-acetat	fructul	10	8	80
Utilizând DNA-zol	fructul	10	8	80

3.1.2. Eficiența metodei de extracție e a ADN-ului cu microunde

Metoda de extracție a ADN-ului cu microunde este foarte rapidă și nu prevede utilizarea reagenților. Această metodă implică adăugarea apei distilate la materialul vegetal și încălzirea acestea în cuptorul cu microunde timp de 5 minute. Este important de menționat ca această metodă poate fi folosită în izolarea ADN fitoplasmei datorită caracteristicilor sale morfo-stucturale și a localizării în planta gazdă. Inițial au fost determinate condițiile optimale de extragere a ADN prin metoda cu microunde. Ne-am concentrat pe trei parametri: regimul (360 și 600 W), volumul de apă adăugat (10 și 20 µl) și volumul tubului eppendorf (0.5 ml și 1,5 ml). În urma realizării expermentelor, am constat că la puterea de 600 W, evaporarea se produce mai rapid a apei, indiferent de volumul inițial al apei adăugate la materialul vegetal. Totuși, la adăugarea a 20 de µl de apă are loc un proces de evaporare mai rapid. De asemenea, volumul tubului eppendorf a influiențat în procesul de izolarea a ADN-ului, în cazul izolării ADN-ului fitoplasmei în tubul eppendorf de 1,5 ml, volumul final al soluției era mai mic. Astfel, volumul optimal de apă este de 10 µl la un regim de 360W, iar volumul eppendorfului de 0,5 ml, pentru izolarea ADN-ului patogenului '*Ca*. P. solani' din tomate.

Apoi, au fost analizate plantele de tomate cu un grad diferit de infectare cu fitoplasmă utilizând această metodă. Datele primite s-au comparat cu cele obținute prin extragerea ADN-ului prin metoda de fierbere în soluție alcalină. În cercetarea au fost folosit ADN-ul extras din pedunculul fructelor de tomate (soiurile Elvira și Deșteptarea). Metoda alcalină a permis să stabilim prezența fitoplasmei în probele 30 și 32 după runda I și, adăugător, în probele 22 și 28 după runda II a *nested*-PCR

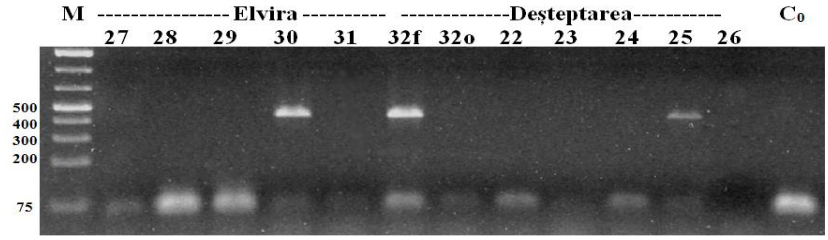


Figura 3.1. Rezultatul analizei PCR cu primerii cpn 421F/R pe baza ADN-ului izolat prin metoda alcalină din plantele soiurilor Elvira și Deșteptarea la etapa coacerea în masă a fructelor. M- Marcher, C_o- Control negativ

Astfel, cercetările eficienței metodei cu microunde au fost realizate pe baza materialului vegetal al acestor probe. După cum se observă în figura 3.5 că infecția '*Ca*. P. solani' în cazul extragerii ADN-ului din peduncul, utilizând metoda cu microunde, nu a fost detectată prin analiza PCR, doar prin *nested*-PCR a fost demonstrat că probele de tomate sunt infectate cu '*Ca*. P. solani'.

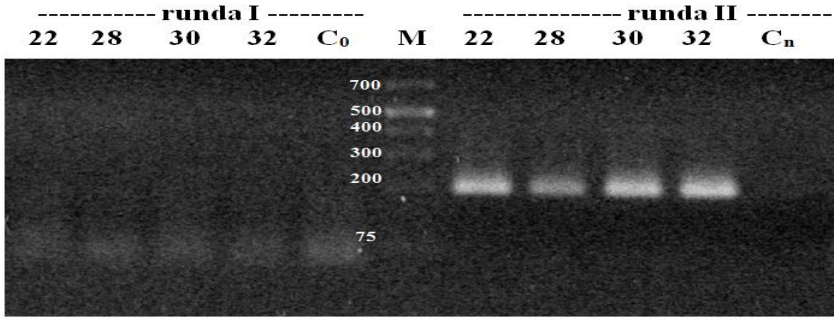


Figura 3.2. Rezultatul analizei PCR și *nested*-PCR cu primerii cpn 421F/R și cpn 200 F/R pe baza ADN-ului izolat prin metoda cu microunde din plantele soiurilor Elvira și Deșteptarea la etapa coacerea în masă a fructelor. M – Marker, Cn – Control negativ

Astfel, sensibilitatea metodei de izolare a ADN-ul prin fierbere în soluție alcalină este mai înaltă în comparație cu cea a metodei cu microunde. La fel, s-a constat că metoda permite diagnosticul sigur doar în cazul unui titru înalt al patogenului. La fel, un dezavantaj al acestei metode este că ADN-ul extras nu poate fi conservat pe un timp îndelungat.

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 3.3 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 3.3 A). În schimb, analiza *nested*-PCR a relevat 8 plante infectate în ambele moduri de izolarea ADN-ului (Figura 3.3 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.

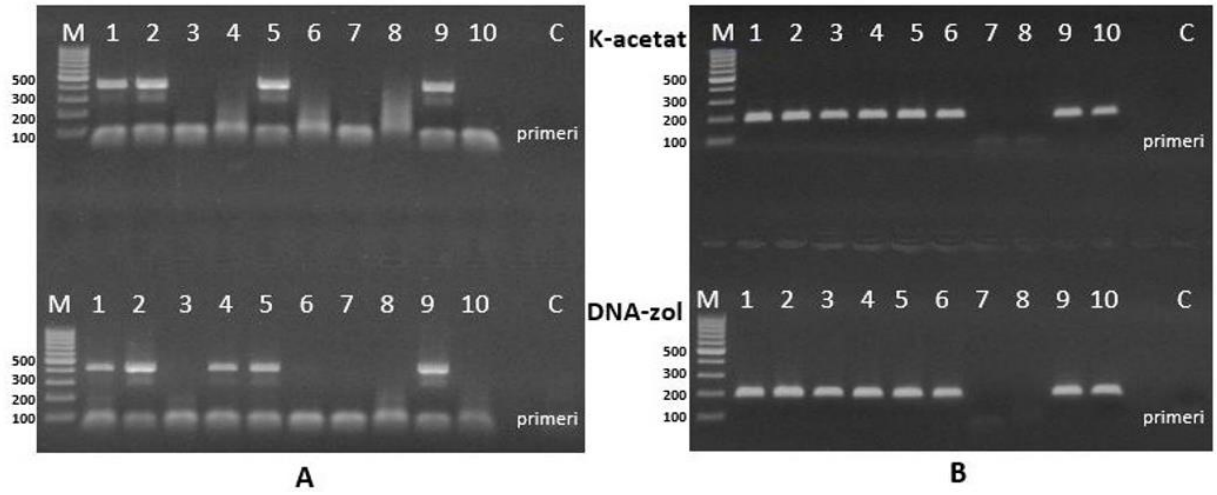


Figura 3.3. Rezultatele PCR și *nested*-PCR pe bază ADN-ului izolat din tomatele soiului Elvira prin metoda K-acetat sau DNA-zol (**A** – fragmentul 421 pb, primeri chaperonine specifici pentru '*Ca*. P. solani') (**B** – fragmentul 200 pb obținut în runda II, primeri chaperonine specifici pentru '*Ca*. P. solani'), M – marcherul de lungime a fragmentelor de ADN „*GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus*”; C – control negativ de amplificare

A fost efectuată selectarea numărului ciclurilor 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 a 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 amestecului 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 perechilor de primeri chaperonine ps specifici pentru 'Ca. P. solani' în analiza nested-PCR

În continuare s-a realizat testarea diferitor seturi de primeri chaperonine pentru *nested*-PCR pe baza a 4 probe de ADN cunoscute ca fiind infectate cu '*Ca*. P. solani'. Figura 3.4 ilustrează rezultatele analizei *nested*-PCR a probelor ADN ale soiului de tomate Elvira la prezența fitoplasmei în timpul fazei de coacere în masă a fructelor. Pentru a evalua performanța fiecărei perechi de primeri, numărul de rezultate pozitive obținute cu o pereche de primeri testate a fost comparat cu numărul de rezultate pozitive obținute anterior cu perechea de primeri validă chaperonine.

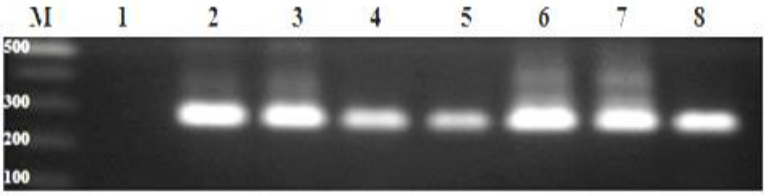


Figura 3.4. Rezultatele *nested*-PCR cu primerii ps, pe baza ADN-ului izolat din plantele soiului de tomate Elvira la prezența '*Ca*. P. solani'. Benzile 1-4, perechea de primeri ps1-ps6 pentru I rundă și ps3-ps4 pentru II rundă; benzile 5-8, perechile de primeri ps2-ps5 pentru I rundă și ps3-ps4 pentru a II rundă

Prima pereche de primeri (ps1-ps6 și ps3-ps4) a dat 3 semnale pozitive din patru, în timp ce a doua pereche de primeri (ps2-ps5 și ps3-ps4) a dat patru semnale pozitive din patru. Astfel, primul set de primeri a produs un rezultat fals-negativ (Figura 3.4).

Figura 3.5 prezintă rezultatele analizei *nested*-PCR a probelor de ADN ale soiului de tomate Elvira pentru detectarea infecției '*Ca*. P. solani', cu un set diferit de primeri: ps2-ps6 pentru prima rundă și ps3-ps4 pentru a doua rundă.

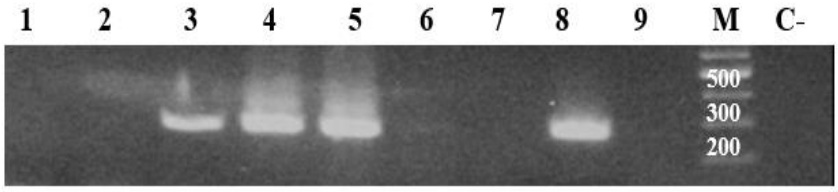


Figura 3.5. Rezultatele *nested*-PCR cu primerii ps, pe baza ADN-ului izolat din plantele soiului de tomate Elvira la prezența '*Ca*. P. solani'. Perechea de primeri ps2-ps6 pentru prima rundă și ps3-ps4 pentru a doua rundă. M – Marker, C- – Control negativ

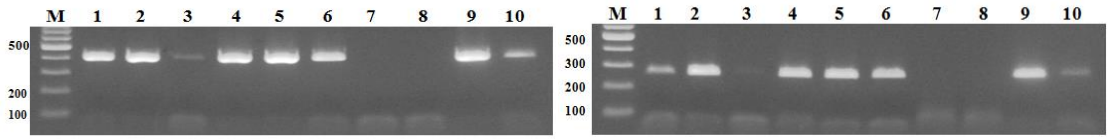
Astfel, setul de primeri pentru *nested*- PCR mai potrivit pentru identificarea fitoplasmei a fost considerat ps2-ps5 pentru prima rundă și ps3-ps4 pentru a doua rundă de amplificare.

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

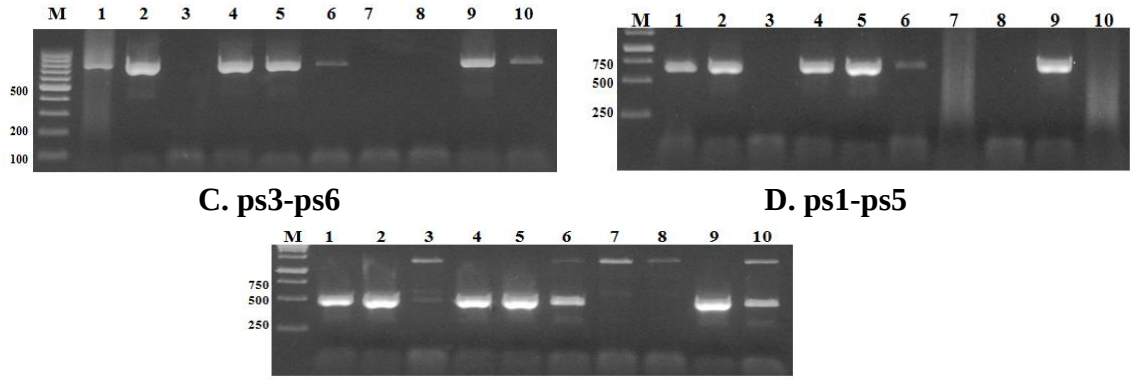
Pentru a dezvolta o nouă tehnică de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă, este important să existe metode moleculare veridice de detectarea a '*Ca*. P. solani' la plante. Anterior, am dezvoltat o metodă sigură pentru identificarea infecția '*Ca*. P. solani' prin *nested*-PCR la plante. La această 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 3.3 prezintă rezultatele sumare ale analizei PCR la aceleași probe ca și în figura 3.6 (ADN-ul extras prin metoda DNA-zol) cu diferite combinații de primeri ps.



A. ps1-ps4 **B. ps3-ps4**



C. ps3-ps6 **D. ps1-ps5**

E. ps3-ps5

Figura 3.6. Rezultatele analizei PCR cu perechile de primeri ps, pe baza ADN-ului extras din plantele soiului de tomate Elvira la prezența fitopatogenului '*Ca*. P. solani'

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

În acest caz, în loc de analiza *nested*-PCR, am folosit PCR cu perechea de primeri ps1-ps4. Dimensiunea așteptată a fragmentului fiind de 416 pb (Figura 3.6 A). După cum se poate observa din figură, această pereche de primeri este potrivită pentru analiza PCR. Toate probele care au fost determinate ca fiind pozitive pentru '*Ca*. P. solani' în *nested*-PCR (Figura 3.3) au fost, de asemenea, pozitive atunci când au fost analizate prin PCR cu această pereche de primeri. Totuși, cea de-a treia probă (banda 3) a generat o bandă slabă, dar distinctă, de dimensiunea preconizată, ceea ce se datorează probabil cantității reduse de ADN a '*Ca*. P. solani' prezent în probă (titru scăzut al infecției).

Figura 3.6 B ilustrează rezultatele analizei la aceleași probe de ADN (metode DNA-zol) prin PCR cu perechea de primeri: ps3-ps4. Dimensiunea așteptată a fragmentului fiind de 271 pb. După cum se poate observa, această pereche de primeri determină sinteză unei benzi comparativ mai slabe din cea de-a treia probă decât în cazul utilizării perechilor de primeri ps1-ps4.

Figura 3.6 C prezintă rezultatele analizei PCR cu perechea de primeri: ps3-ps6 (lungimea fragmentului preconizat de 745 pb), la aceleași probe de ADN. După cum se observă, performanța acestei perechi este mai mică decât la perechile de primeri analizate anterior (ps3-ps4 și ps1-ps4). Nici un fragment specific nu este detectat în cea de-a treia probă (Figura 3.6 C, banda 3), rezultatul fiind fals-negativ, iar probele 6 și 10 au un semnal slab de amplificare a fragmentului de ADN preconizat (Figura 3.6 C, benzile 6 și 10)

Figura 3.6 D arată rezultatele analizei la aceleași probe de ADN izolate prin metoda DNA-zol, prin analiza PCR cu perechea de primeri: ps1-ps5, cu lungimea preconizată a fragmentului de 647 pb. După cum se observă, perechea de primeri ps1-ps5 a generat câteva rezultate negative (Figura

3.6 D, benzile 3 și 10). Testarea cu perechea de primeri ps3-ps5, lungimea preconizată a fragmentului de 502 pb, a dat unele semnale nespecifice (Figura 3.6 E).

Astfel, 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.

3.3. Selectarea condițiilor optimale pentru realizarea electroforezei în gel de agaroză a fragmentelor amplificate specifice pentru '*Ca.* P. solani'

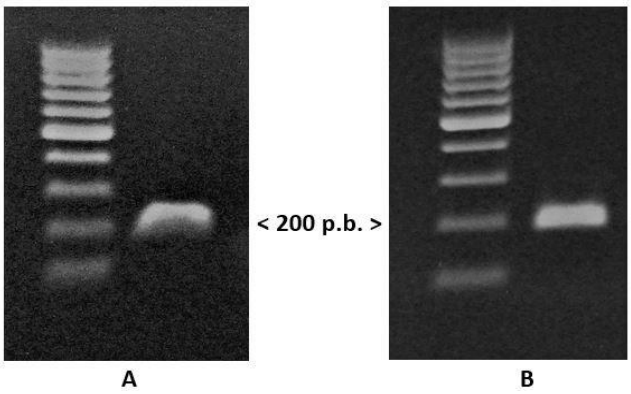


Figura 3.7. Rezultatele electroforezei fragmentului amplificat cu mărimea 200 pb

A – 1% agaroză; B –1,5 % agaroză

Rezultatele obținute a gelurilor de agaroză cu diferite concentrații (1% și 1,5%) au fost comparate. Gelul cu concentrația de 1,5% agaroza permite vizualizarea unui rezultat mai precis. Pentru înregistrarea ampliconului cu mărimea 200 pb s-a realizat prin comparația cu marcherul de lungime a fragmentelor de ADN *GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus*. Diferența între cele două concentrații este demonstrată în figura 3.7. Soluţia tampon recomandată este de 0.5x TBE.

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 de *nested*-PCR. Aceste procedee au fost comparate, selectate și optimizate.

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. În cazul extragerii alcaline, semnalul pozitiv al amplificării nu a fost obținut în nici o probă. Astfel, se recomandă utilizarea metodei de extragere a ADN-ului cu DNA-zol din cicade. Această metodă a fost utilizată în toate cercetările ulterioare în determinarea insectelor infectate cu fitoplasmă.

Nested-PCR (ambele runde de amplificare) trebuie să elaboreze în amestecul cu volumul de 25µl ce conțin: soluție bufer pentru *Taq*-polimerază×1, 2U *Taq*-polimerază (runda I) sau 1U *Taq*-polimerază (runda II), 0.25 µM F primer, 0.25 µM R primer, 0.2 mM dNTP, apă ultrapură şi 1µl ADN în runda I sau 1µl amestecului 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" × 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 ∞. Perechile de primeri chaperonine specifici pentru '*Ca*. P. solani' utilizate în runda I: cpn421F/R pentru runda II: cpn200F/R.

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 au fost obținute în cazul utilizării 30 ciclurilor de amplificare în runda I și 45 sau 50 cicluri în runda II. Acest aspect este ilustrat în figura 3.8, unde sunt comparate rezultatele electroforezei fragmentelor obținute cu diferite programe de amplificare.

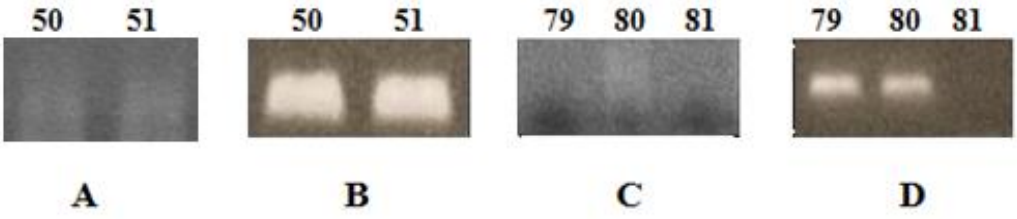


Figura 3.8. Rezultatele *nested*-PCR pe bază ADN-ului izolat din cicade

A – 30 cicluri de amplificare în runda I; 45 cicluri de amplificare în runda II.

B, D – 45 cicluri de amplificare în runda I; 35 cicluri de amplificare în runda II.

C – 30 cicluri de amplificare în runda I; 50 cicluri de amplificare 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 [82].

Soiurile de tomate Elvira, Cerasus, Mary Gratefully și Deșteptarea au fost utilizate în acest studiu. S-a raportat că soiul Elvira posedă o sensibilitate mai mare la infecția fitoplasmică comparativ cu soiul Cerasus. Pentru extracția ADN-ului, au fost colectate 12 plante din fiecare soi. ADN-ul a fost izolat prin metoda DNA-zol (*Thermofisher*), conform protocolului recomandat de producător. 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-60 (cpn60) a '*Ca*. P. solani'

Condițiile PCR au fost cele recomandate de producătorul SybrGreen (*Applied Biosystems*) - 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 pe plăci cu 96 de godeuri (*BIORAD*) în sistema 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* PCR:

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

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 a fragmentului purificat a fost determinată cu ajutorul unui spectrofotometru Nanodrop. Având în vedere dimensiunea fragmentului 160 pb, s-a determinat numărul de copii în 1 ng de fragment ADN, utilizând calculatorul *on-line*:

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

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. Figura 3.9 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 3.9A, B) și 400 nM (Figura 3.9C, D) din

fiecare primer, atât fără diluție (Figura 3.9A, C), cât și cu o diluție de 10 ori (Figura 3.9B, 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 3.9C), indicând un singur vârf pronunțat. Totuși, această pereche de primeri nu a reușit să amplifice fragmentul dintr-un șablon mai diluat (Figura 3.9B, D)

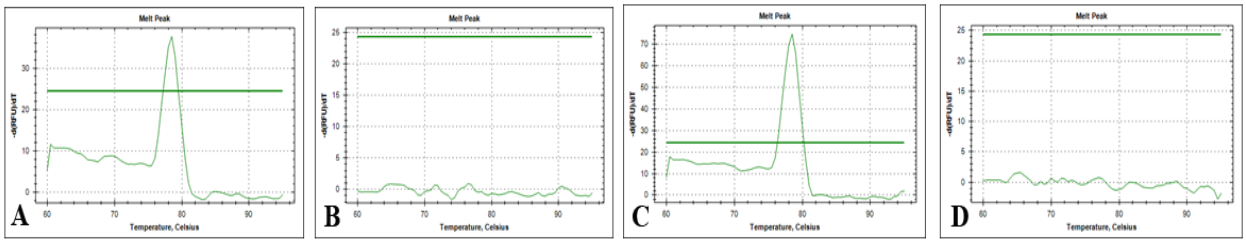


Figura 3.9. Curba de disociere a fragmentului, amplificată de perechea de primeri qfys5-qfys6. Concentrația primerului: 200 nM fiecare (A, B); 400 nM fiecare (C, D). Diluții șablon: nediluat (A, C), diluție de 10 ori (B, D)

Figura 3.10 prezintă curba de disociere a fragmentului, amplificată de perechea de primeri qfys7-qfys8, utilizând ADN-ul de tomate infectat cu '*Ca*. P. solani' ca șablon. Pentru testarea concentrației optime de primeri și ADN, la fel, fragmentul a fost amplificat conținând 200 nM (Figura 3.10 A, B) și 400 nM (Figura 3.10 C, D) din fiecare primer și fără diluare (Figura 3.10 A, C) și diluție de 10 ori (Figura 3.10 B, D) a ADN-ului șablon. Concentrația mai mare a primerului a dus la o fluorescență mai mare și nu a provocat formarea dimerilor primerului (Figura 3.10 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 3.10 B, D). Deci, această pereche de primeri a fost utilizată pentru analize suplimentare, la o concentrație de 400 nM fiecare.

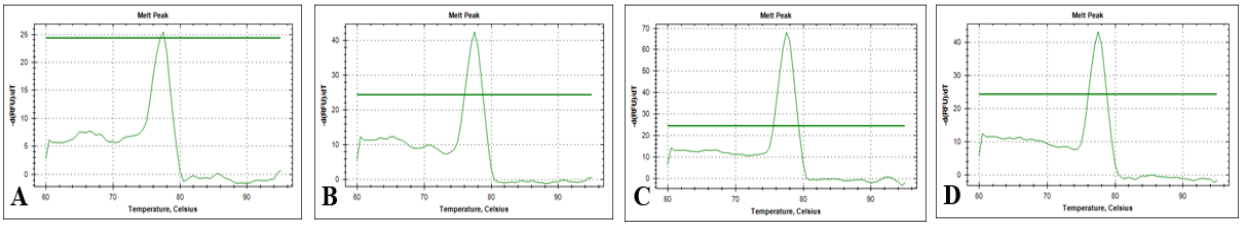


Figura 3.10. Curba de disociere a fragmentului, amplificată de perechea de primeri qfys7-qfys8. Concentrația primerului: 200 nM fiecare (A, B); 400 nM fiecare (C, D). Diluții șablon: nediluat (A, C), diluție de 10 ori (B, D)

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 *Real-Time* 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 3.11a. Panta de -3.3183 indică o eficiență de aproape 100% primer, ceea ce sugerează că această pereche de primeri poate fi utilizată în teste PCR în timp real pentru măsurarea concentrațiilor a '*Ca*. P. solani'.

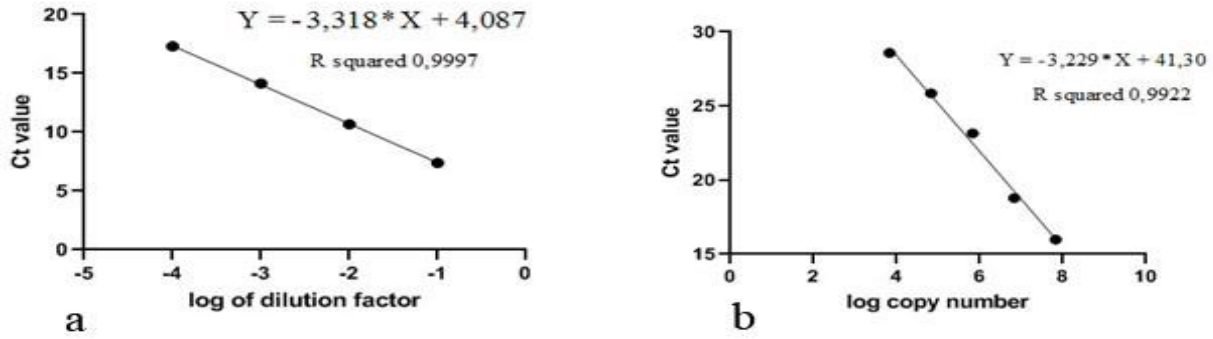


Figura 3.11. Graficul eficienței perechii de primeri qfys7-qfys8 (a) și corelația între valoarea Ct și numărul copiilior inițiale ale șablonului în reacție (b)

Astfel, perechea de primeri qfys7-qfys8 a fost utilizată pentru cuantificarea ADN -ului '*Ca*. P. solani' în probele de tomate. În aceast scop, au fost realizate diluții în serie a ADN-ului cu numărul de copii cunoscut și apoi cercetate cu qPCR. Elaborarea unei curbe standard s-a efectuat pe baza valorilor Ct înregistrate. Figura 3.11b ilustrează dependența valorii Ct de numărul inițial de copii ale șablonului din reacție.

3.6. Concluzii la capitolul 3

1. Metodele de extragere a ADN--ului prin DNA-zol, K-acetat și fierbere în soluție alcalină au prezentat o eficiență similară în diagnosticul molecular al infecției fitoplasmice.
2. Metoda de izolare a ADN-ului cu microunde posedă o sensibilitate mai redusă în comparație cu alte metode analizate. Metoda permite obținerea unor rezultate valide în cazuri de infectare semnificativă.
3. Condițiile pentru realizarea *nested*-PCR, care permit obținerea datelor stabile și corecte în diagnosticul molecular al infecției fitoplasmice la tomate, au fost stabilite. În rezultatul a unei serii de experiențe, au fost selectate 30 cicluri de amplificare pentru prima rundă și 35 cicluri pentru a doua rundă.

4. Testarea perechilor de primeri chaperonine ps pentru analiza *nested*-PCR a infecției fitoplasmice a stabilit că setul de primeri mai potrivit pentru identificarea fitoplasmei este ps2-ps5 pentru prima rundă și ps3-ps4 pentru a doua rundă de amplificare.
5. Perechile de primeri ps1-ps4 și ps3-ps4 pot fi utilizate în analiza PCR. Cu toate acestea, eșantioanele cu titru de infecție scăzut pot duce la o bandă slabă pe gel și la rezultate neconcludente, care necesită analize suplimentare prin *nested*-PCR.
6. Gelul cu concentrația de 1,5% agaroza permite vizualizarea unui rezultat mai clar pentru înregistrarea ampliconului cu mărimea 200 pb și comparația acestuia cu marcherul de lungime a fragmentelor de ADN *GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus*.
7. Pentru diagnosticul veridic al fitoplasmei la insecte, s-a constatat că metoda cosirii cu fileul entomologic în apropierea câmpului oferă rezultate mai variate în ceea ce privește diversitatea speciilor și a numărul de insecte capturate.
8. Toate rezultatele pozitive în detectarea infecției fitoplasmice la insecte au fost obținute utilizând metoda izolării cu DNA-zol. Programul de amplificare recomandat include: runda I × 45; runda II × 35, diferit față de cel utilizat la tomate.

4. DIAGNOSTICUL MOLECULAR A '*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: la etapa de începere a maturării fructelor - Iulie, la etapa de coacere în masă a fructelor - în august, și la sfârșitul sezonului de vegetație după colectarea unei părți semnificative din recolta de fructe - în 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 peduncule colectate 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 din figura 4.1 și tabelul 4.1, 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%.

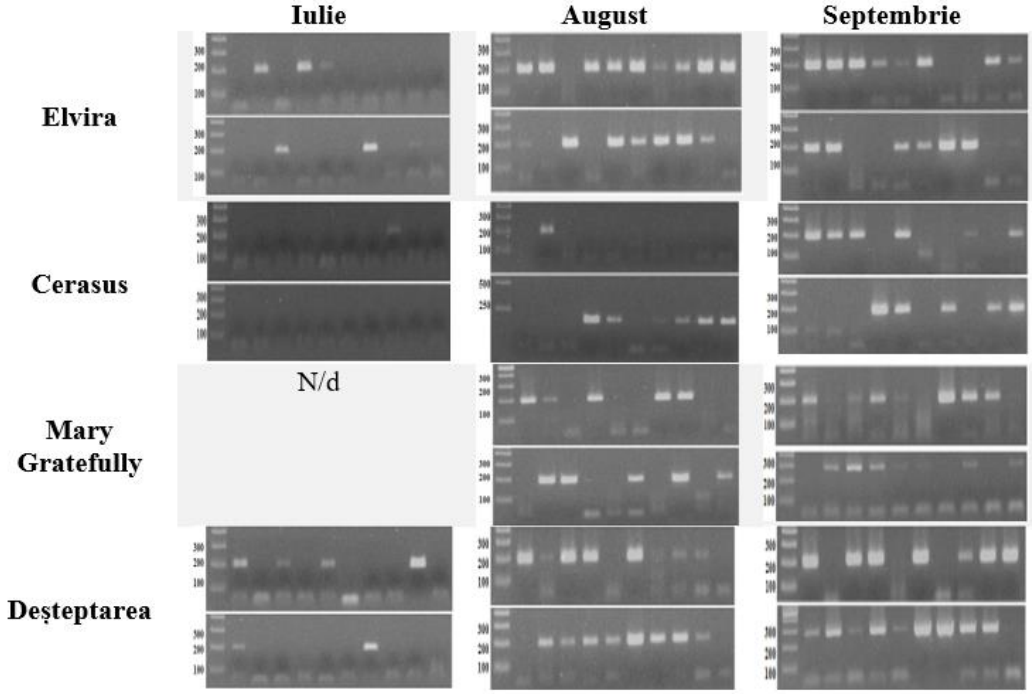


Figura 4.1. Rezultatele analizei *nested*-PCR pentru identificarea '*Ca.* P. solani′ pe baza ADN-ului izolat din pedunculul a patru soiuri de tomate în diferite perioade de dezvoltare a plantelor (sezonul de vegetație 2018)

Tabelul 4.1. Distribuția infecției '*Ca.* P. solani' la diferite soiuri de tomate în anul 2018

Luna	Numărul plantelor analizate	Numărul plantelor							
		Elvira		Cerasus		Mary Gratefully		Deșteptarea	
		Inf.	Neinf.	Inf.	Neinf.	Inf.	Neinf.	Inf.	Neinf.
Iulie	20	6	14	1	19	-	-	6	14
August	20	17	3	7	13	10	10	16	4
Septembrie	20 (10)	17	3	11	9	8	2	8	2

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 4.2).

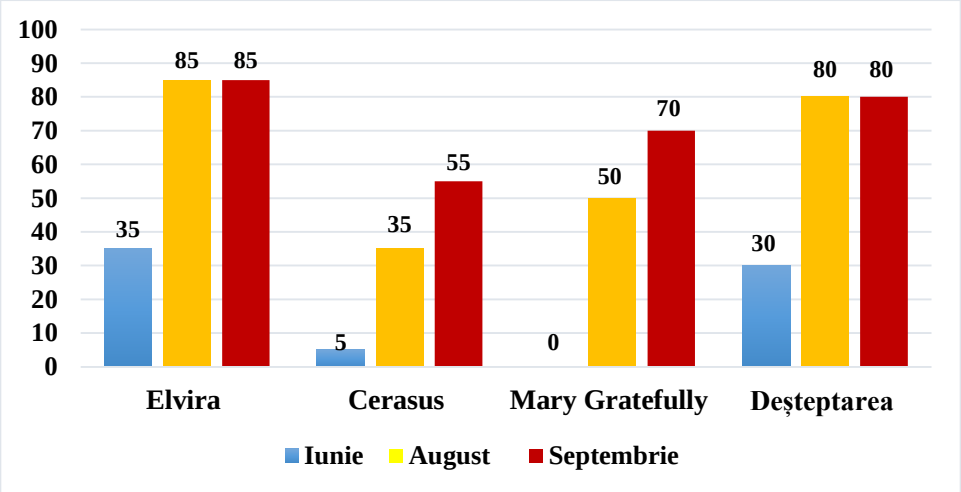


Figura 4.2. Răspândirea infecției fitoplasmice la diferite soiuri de tomate în anul 2018

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

În prima decadă a lunii iulie, a fost realizat diagnosticul molecular al infecției fitoplasmice în câmpurile de tomate, vizând patru soiuri de tomate pentru a evalua prezența sau absența '*Ca*. P. solani' în plante, la etapa de înflorire-începutul formării fructelor. Probele de ADN (mixuri izolate utilizând metoda de extragere cu DNA-zol din 12 plante ale soiurilor de tomate Elvira, Cerasus, Deșteptarea, Mary Gratefully) au fost testate la calitatea ADN-ului și analizate prin tehnica *nested*-

PCR la prezența infecției fitoplasmice. Infecția a fost identificată numai la plantele ale unui soi de tomate, Deșteptarea (Figura 4.3). Concluzionăm, că infectarea tomatelor cu '*Ca.* P. solani' începe la etapa de înflorire, dar nu este abundentă.

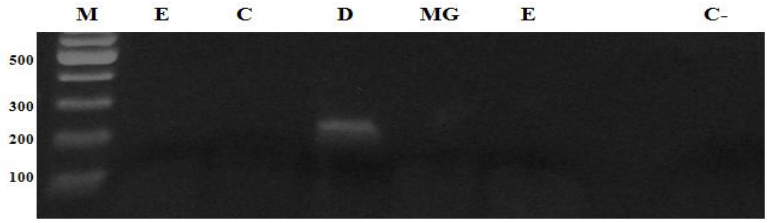


Figura 4.3. Rezultatele *nested*-PCR a '*Ca.* P. solani' cu primeri chaperonine pe bază ADN-ului extras din tomate ale soiurilor Elvira, Cerasus, Mary Gratefully și Deșteptarea la etapa de înflorire. M - marcherul ADN; C- – control negativ de amplificare. Fragmentul 200 pb

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 şi cpn200 F/R specifici pentru '*Ca.* P. solani'. Probele de ADN au fost izolate din peduncul fructului de tomate folosind metoda alcalină expres.

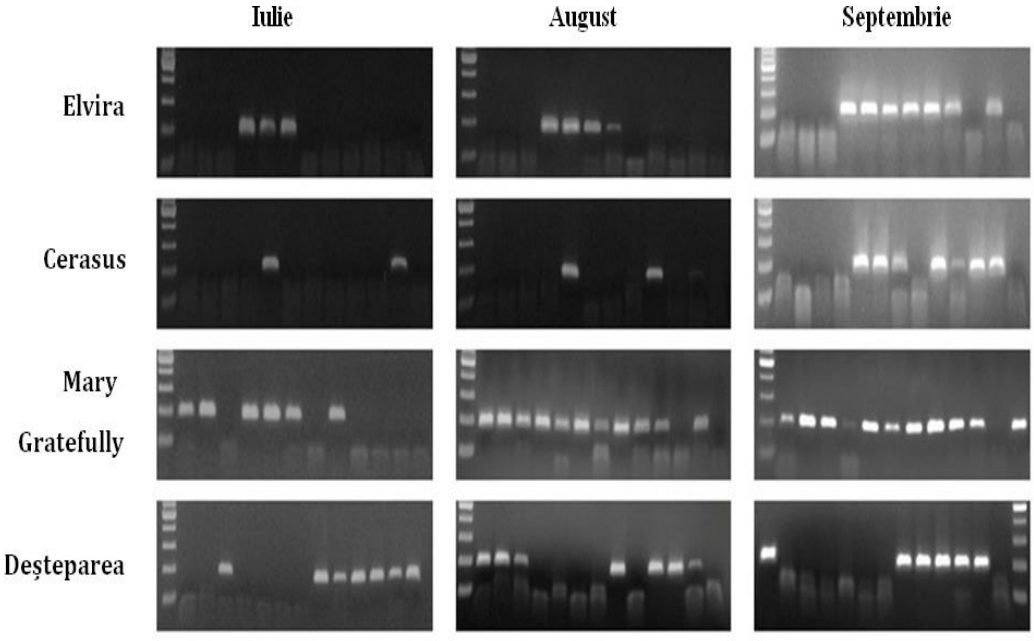


Figura 4.4. Răspândirea infecției '*Ca.* P. solani' la diferite soiuri de tomate în anul 2019

Rezultatele diagnosticului molecular al infecţiei fitoplasmice la plantele de tomate ale celor patru soiurilor crescute în câmp sunt prezentate în tabelul 4. 2 şi figurile 4.4 și 4.5. Compararea datelor obținute a fost efectuată utilizând prelucrarea statistică conform criteriului Fisher.

Tabelul 4. 2. Distribuția infecției fitoplasmice la diferite soiuri de tomate în anul 2019

Luna	Numărul plantelor analizate	Plantele infectate							
		Cerasus		Deșteptarea		Mary Gratefully		Elvira	
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Iulie	12	3	25	6	50	6	50	3	25
August	12	3	25	7	58	11	92***	6	50
Septembrie	12	7	58	7	58	11	92	7	58

- diferența semnificativă (în comparație cu rezultate obținute la soiul Cerasus) este marcată cu *** ($P \leq 0.001$).

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.

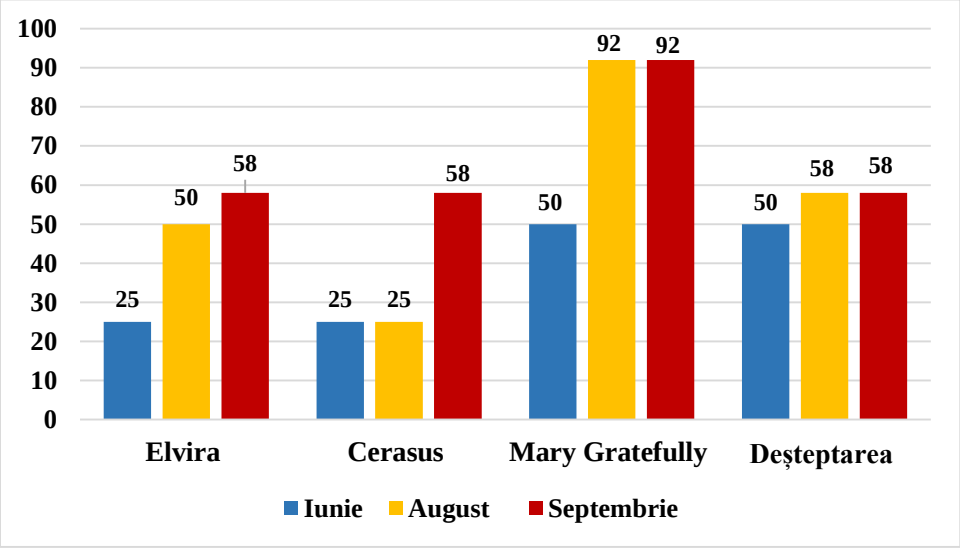


Figura 4.5. Răspândirea '*Ca.* P. solani' în câmpul de tomate în anul 2019

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 plante 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 câmp 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 diagnosticul molecular la prezența infecției '*Ca.* P. solani' la soiurile autohtone de tomate în condițiile sezonului de vegetație 2020 a fost similară ca în anii 2019 și 2018. Astfel, au fost recoltate fructele de la 12 plante din fiecare dintre cele patru soiuri. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 4.6.

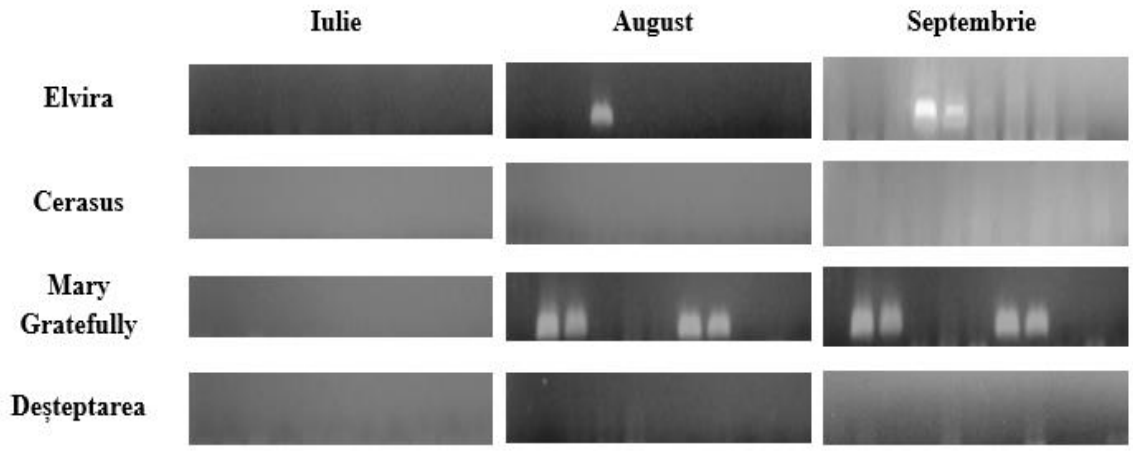


Figura 4.6. Rezultatele analizei *nested*-PCR pentru diagnosticul '*Ca.* P. solani′ pe baza ADN-ului izolat din pedunculul a patru soiuri de tomate în diferite perioade de dezvoltare a plantelor (sezonul de vegetație 2020). Fragment de 200 pb

Conform rezultatelor înregistrate se observă răspândirea scăzută a infecției fitoplasmice în câmp (Figura 4.7). 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%.

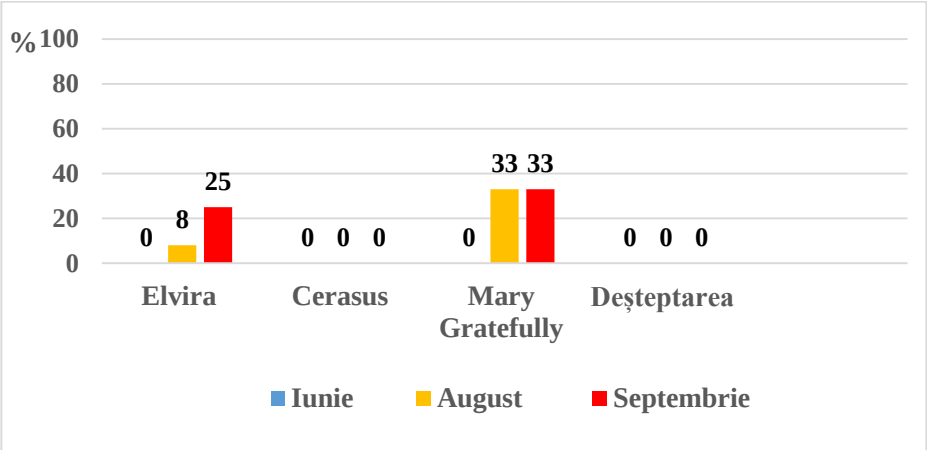


Figura 4.7. Răspândirea infecției '*Ca.* P. solani' la diferite soiuri de tomate în anul 2020

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 soiul este 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 în decursul a trei ani de vegetație

Analiză detaliată a distribuției stolburului între 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 4.8).

Tabelul 4.3 prezintă datele obținute în urma identificării moleculare a infecției '*Ca*. P. solani′ în plante de tomate a 4 genotipuri analizate, la diferite etape a sezoanelor de vegetație din anii 2018, 2019 și 2020.

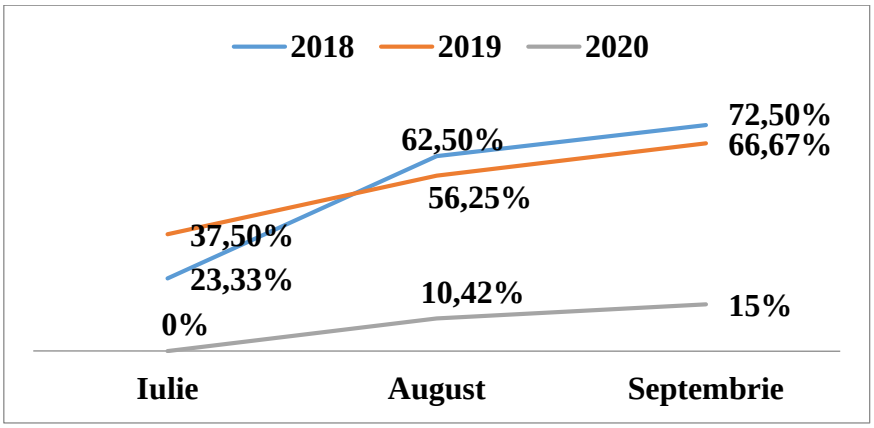


Figura 4.8. Datele sumare privind răspândirea '*Ca*. P. solani' pe câmpul de tomate în anii 2018, 2019 și 2020

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 4.3. Rezultatele ale 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
Desteptarea	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 4.3, Figura 4.9).

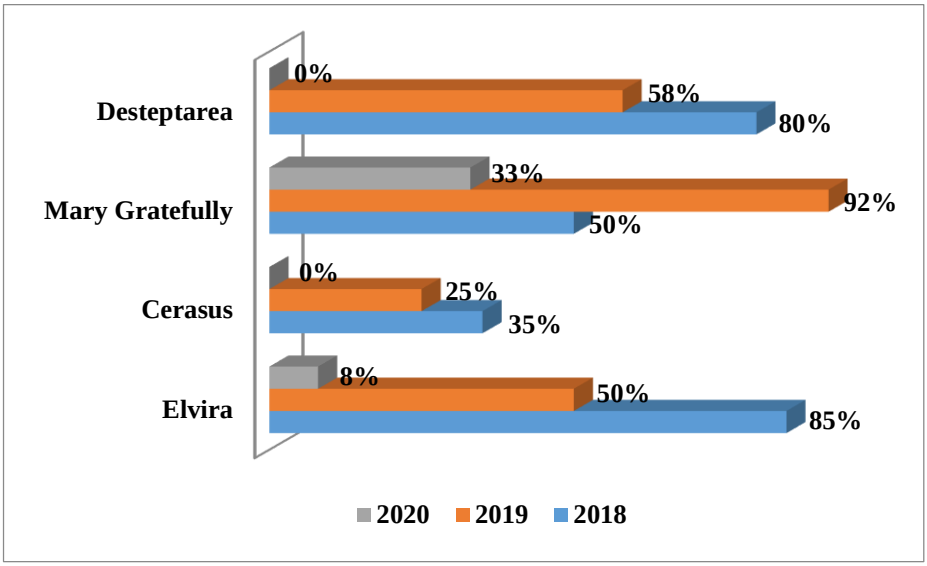


Figura 4.9. Distribuția '*Ca*. P. solani' în câmpul de tomate în perioada de coacere în masă a fructelor în anii 2018, 2019 și 2020 (luna august)

În 2018, soiurile Elvira și Deșteptarea au fost mai afectate de infecția fitoplasmică, procentul plantelor infectate a atins valorea de 85% și respectiv 80%. Soiul de tomate Mary Gratefully a prezentat indici mai mici de infestare comparativ cu 2019, doar jumătate din plante au fost infectate cu '*Ca*. P. solani'. Un procent redus de infecție a plantelor cu fitoplasmă a fost observat și la soiul Cerasus (35%). În august 2019, la etapa de coacere în masă a fructelor, numărul plantelor infectate cu fitoplasmă la soiului Deșteptarea a crescut ușor față de 2018, ajungând la 58%. În anul 2020, prezența infecției fitoplasmice la acest soi nu a fost identificată. La soiul Elvira, procentul de plante infectate s-a dublat în august 2019, ajungând la 50%, ce a fost, de asemenea, mai mic decât în 2018. Pe când, în august 2020, procentul plantelor soiului Elvira infectate cu '*Ca*. P. solani' a fost nesemnificativ, constituind aproximativ 8%. Astfel, dinamica răspândirii infecției între plantele soiurilor Deșteptarea și Elvira a coincis, iar condițiile meteorologice ale anului (sezonul de creștere) au influențat la răspândirea fitoplasmei în aceste soiuri în același mod. În același timp, procentul plantelor de tomate infectate cu fitoplasma la soiul Mary Gratefully a crescut brusc în condițiile nefavorabile a anilor 2019 și 2020, ajungând peste 90% ($P \leq 0,05$) și 33% respectiv. Numai la soiul Cerasus, numărul plantelor infectate a rămas practic neschimbat: ca și în iulie, doar un sfert din plantele soiului Cerasus au fost afectate cu stolbur în luna august a anului 2019. Astfel, soiul Cerasus a arătat o rezistență mai mare la infectarea cu '*Ca*. P. solani' în comparație cu alte soiuri de tomate în decursul tuturor sezoanelor de vegetație analizate.

La sfârșitul perioadei de vegetație, în septembrie, nivelul infecției cu fitoplasma la soiurile de tomate Elvira și Deșteptarea a rămas aproape neschimbat, atingând aceleași valori de 58% în 2019 și aproximativ 80-85% în 2018. La același nivel de 58%, dar mai mult decât dublu față de lunile iulie și august, a crescut infestarea plantelor soiului Cerasus în septembrie 2019. În 2018, s-a înregistrat o rată similară de infestare pentru acest soi de aproximativ 55%. Până la sfârșitul perioadei de vegetație din 2019, procentul plantelor afectate de fitoplasmoză la soiul Mary Gratefully a rămas la același nivel înalt ca și în etapa de maturare în masă (92%). În condițiile anului 2018, procentul de plante infectate la soiul de tomate Mary Gratefully a crescut la 85% în luna septembrie. În vara anului 2020, temperatura medie a aerului a fost cu 2-3ºC peste norma obișnuită, un fenomen care apare, în medie, o dată la 10-15 ani. Cele mai ridicate temperaturi au fost înregistrate în luna august, când media lunară a fost cu 3-4ºC mai mare decât norma, un eveniment ce se întâmplă, de asemenea, o dată la aproximativ 15 ani [79]. Toate acestea au influiențat la minimizarea răspândirii infecției *'Ca*. P. solani și la sfârșitul sezonului de vegetație. Procentul plantelor infectate cu fitoplasmă la soiul Mary Gratefully a rămas la valoarea de 33 %. O ușoară creștere a nivelului de infecție s-a semnalat la soiul Elvira care a atins 25%. La soiurile Cerasus și Deșteparea s-a determinat lipsa fitopatogenului și la sfârșitul sezonului de vegetație a anului 2020.

Deci, diagnosticul molecular al răspândirii infecției '*Ca*. P. solani*'* pe câmpul de tomate în condițiile unei veri calde și uscate a anului 2019 a arătat că la trei din cele patru soiuri studiate (Elvira, Deșteptarea și Mary Gratefully), valorile maxime al nivelului de infecție au fost înregistrate la etapa de maturare a fructelor în masă, în august, și nu au crescut până la sfârșitul sezonului de creștere (mijlocul lunii septembrie). Rezultate similare au fost obținute pentru soiurile Elvira și Deșteptarea în vara anului 2018, când temperaturile ridicate s-au combinat cu o cantitate de precipitații normale. Rezultatele diagnosticului molecular al soiul Cerasus, care s-a dovedit a fi mai puțin sensibil la infecția fitoplasmică în lunile iulie și august a anilor 2018 și 2019, a arătat o ușoară creștere a numărului de plante infectate până la sfârșitul sezonului de creștere, dar aproape jumătate din plantele din câmp au rămas neinfectate. Cu toate acestea, după etapa de coacere în masă și recoltare a fructelor, care a avut loc în august, infecția plantelor din soiul Cerasus în septembrie nu a putut agrava în mod semnificativ productivitatea. Fără îndoială, soiul Cerasus poate fi recomandat pentru includerea în programele de ameliorare a soiurilor și hibrizilor de tomate rezistente la fitoplasmă.

Rezumând rezultatele obținute putem afirma că diagnosticul molecular al răspândirii fitoplasmozei în câmpul de tomate a arătat că gradul de infecție a genotipurilor studiate la *'Ca*. P.

solani' a variat în decursul sezonului de vegetație. Cele mai semnificative diferențe în infestarea soiurilor au fost observate în luna august, la etapa de coacere în masă a fructelor.

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, s-a 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 economic rentabil pentru producătorii 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 pe parcursul 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 (Anexa 4). Totuși, sumând datele obținute în decursul anilor studiați putem afirma că aceste două soiuri au arătat o sensibilitate mult mai mare la infecția cu fitoplasma în comparație cu soiul Cerasus, diferența de răspândire a infecției la etapa de coacere în masă a fructelor a fost foarte evidentă (anii 2018 și 2019). Se poate concluziona că gradul de rezistență al soiurilor Elvira și Deșteptarea la '*Ca*. P. solani' este comparativ mai mic decât la soiul Cerasus.

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', pe când cu ridicarea temperaturii climatice nivelul infestării plantelor soiului scădea [152].

Rezumând datele de mai sus, putem concluziona că diagnosticul molecular este un instrument util în procesul de ameliorare a soiurilor sau hibrizilor de tomate rezistenți la infecția cu fitoplasmă. La fel, analiza moleculară oferă rezultate valide ce au fost confirmate în analiza plantelor cu simptome morfologice ale stolburului (Figura 4.10)

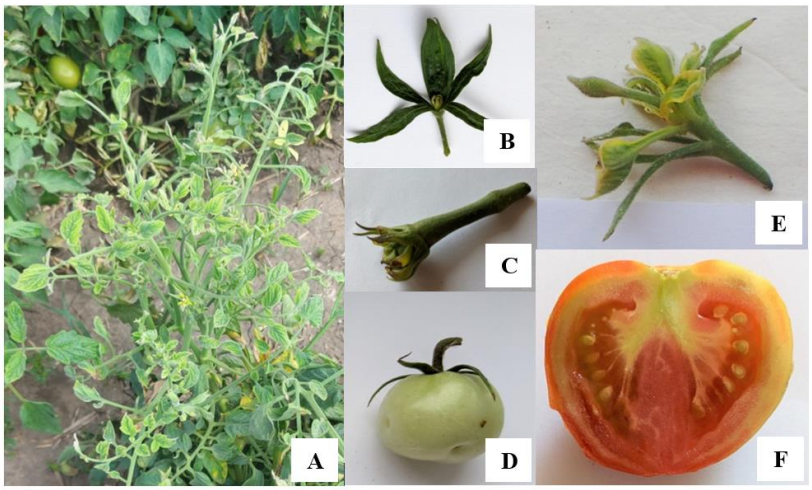


Figura 4.10. Simptomele fitoplasmozei la tomate

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 în anul 2019 a fost realizată pe 10 plante individuale în decursul întregului sezon de vegetație: în luna iulie, august și septembrie. Analiza moleculară nu a identificat prezența patogenului '*Ca.* P. solani' în forma spontană *S. harochaites* în decursul întregului sezon de vegetație în câmp (Figura 4.11).

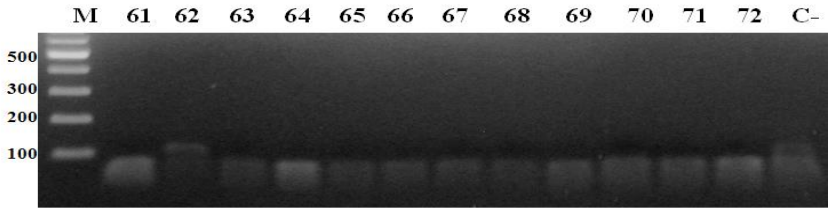


Figura 4.11. Determinarea '*Ca.* P. solani' la *Solanum habrochaites* în luna septembrie a anului 2019. M – Marker, C- – Control negativ

În condițiile anului 2020 analiza prezenței infecției fitoplasmice s-a realizat în luna august și începutul lunii septembrie pentru cercetare au fost luate câte 10 plante crescute în condiții de solariu. Extragerea ADN-ului a fost realizată prin metoda expres. Determinarea moleculară cu primerii cpn 200F/R a demonstrat lipsa infecției în plantele analizate în decursul perioadei de vegetație (Figura 4.12). Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele analizei moleculare din anul 2019. Astfel putem face o concluzie despre rezistența înaltă a plantelor de *S. habrochaites* la stolbur în condițiile anilor de studiu.

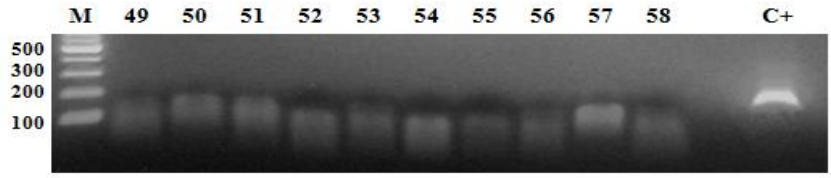
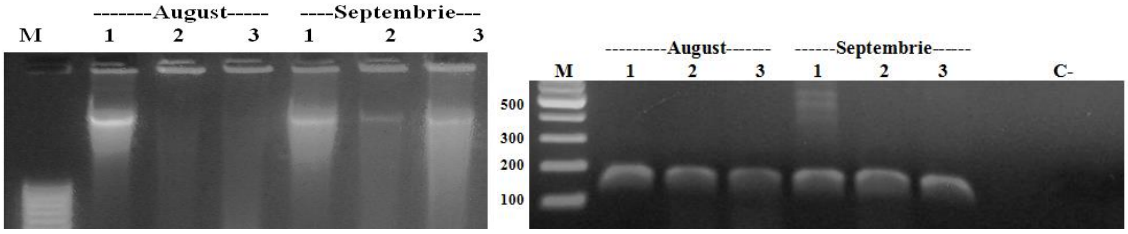


Figura 4.12. Diagnosticul '*Ca*. P. solani' la *S. habrochaites* în luna septembrie a anului 2020.

M – Marker, C+ – Control pozitiv

Rezistența plantelor de tomate a formei spontante la infecția fitoplasmică se poate datora atât caracteristicilor morfo-fiziologice, cum ar fi pubescența densă a tulpinilor și frunzelor, care este o barieră mecanică pentru insectele vectori și posibila producție de repelenți specifici de către plante pentru aceste insecte. De aceea, în viitor, *S. habrochaites* poate fi utilizat pentru a evalua sensibilitatea soiurilor de tomate și hibrizilor la '*Ca*. P. solani' în calitate de control. De asemenea, acest genotip poate fi utilizat de către amelioratori ca material pentru hibridizare în scopul creării soiurilor rezistente la fitoplasmă.

Adiacent în anul 2020 au fost luate în studiu alte 3 forme spontane de tomate: *S. pimpinellifolium, S. chilense* și *S. peruvianum.* Izolarea ADN-ului s-a realizat cu ajutorul kitului DNAzol. Pentru cercetare au fost studiate plantele crescute în condiții de seră, au fost luate a câte 8-10 fructe din fiecare specie în lunile august și septembrie. Inițial a fost efectuată determinarea calității ADN-ului total izolat. În figura 4.13A este prezentată rezultatul electroforezei ADN-ului total izolat (5 µl soluție de ADN per probă). După care a fost stabilită calitatea înaltă ADN-ului extras cu ajutorul primerilor ribozomali conservative de plante (Figura 4.13B)



A **B**

Figura 4.13. Analiza ADN-ului izolat la trei forme spontane tomate. 1 – *S. pimpinellifolium*, 2 – *S. chilense* și 3 – *S. peruvianum*

A. Electroforegrama ADN-ului total izolat B. Rezultatul analizei calitative a ADN-ului din plante de tomate cu primerii n65-n66. M – Marker, C- – Control negativ

Analiza moleculară cu primerii cpn 200 F/R nu a identificat prezența patogenului '*Ca*. P. solani' în plantele speciilor de tomate analizate în decursul sezonului de vegetație (Figura 4.14).

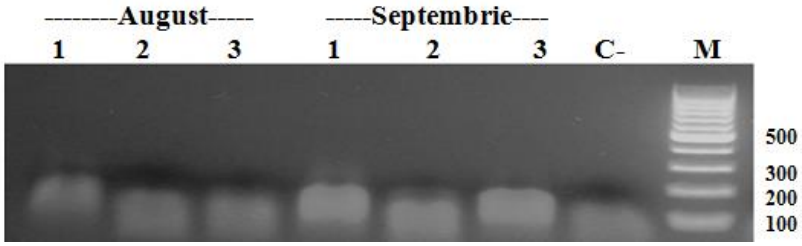


Figura 4.14. Diagnosticul molecular al formelor spontane de tomate la prezența '*Ca*. P. solani'. 1 – *S. pimpinellifolium*, 2 - *S. chilense* și 3 - *S. peruvianum*

M – Marker, C- – Control negativ

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. Acest lucru ar trebui să fie reținut de selecționeri pentru crearea soiurilor de tomate rezistente la stolbur.

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 4.15). 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 [150].

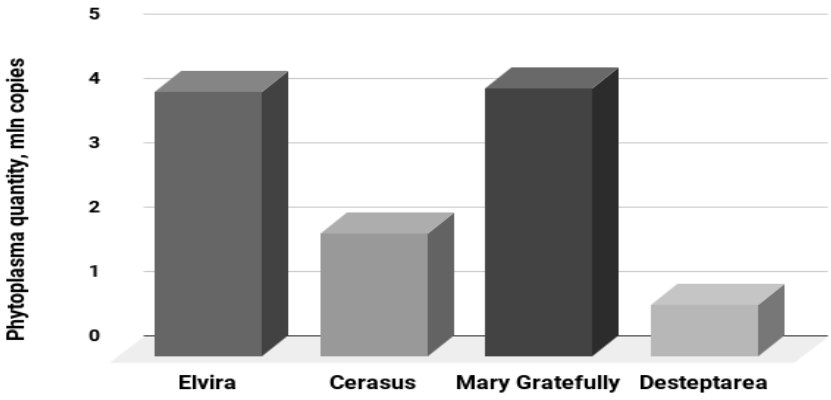


Figura 4.15. Cuantificarea a '*Ca*. P. solani' la patru soiuri de tomate prin qPCR

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. Proporția 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 proporția plantelor infectate a fost scăzută la soiul Cerasus și ridicată 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 o proporție relativ mare de plante infectate în câmp.

Astfel, deși o proporție 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 plante cu concentrație scăzută de agent patogen sunt de o bună calitate (Tabelul 4.4), [146].

Tabelul 4.4. 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

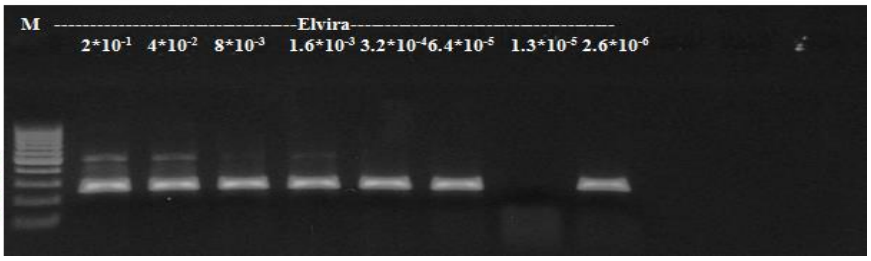
la fitoplasmă și, în consecință, calitatea fructelor acestora a fost mai joasă. O corelație puternică între concentrația scăzută a fitoplasmei în fructe și randamentul fructelor de calitate a fost observată la soiul Deșteptarea. Analiza corelațională a fost realizată cu ajutorul programei Excel. Proporția fructelor comercializabile a fost cea mai mare la acest soi, în ciuda răspândirii largi a infecției în câmpul experimental.

Ca rezultat al acestei lucrări, s-a folosit 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 serială 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 tomate. ADN-ul a fost izolat prin metoda DNA-zol din fructele de tomate în luna august a anului 2019. Din zece probe, au fost luate câte 2 µl de ADN, mixul a fost bine omogenizat după ce s-a luat câte 10 µl pentru diluarea consecutivă. La prima diluare se adaugă 40 µl de H_2O bidistilată după care se pipetează bine și se ia 10 µl si de pipetează în eprubeta următoare. O etapă de diluare a implicat o diluție de 1/5. În total au fost realizate a câte 8 diluări consecutive. Soluțiile primite s-au folosit ca matrice pentru analiza *nested*-PCR. În cazul probei Mary Gratefully au fost luate 10 µl din volumul total.

Rezultatele analizei *nested*-PCR au ilustrat că, în urma a 8 diluări consecutive, semnalul de amplificare este prezent în toate probele, ceea ce releva că titrul patogenului este ridicat la soiurile analizate (Figura 4.16).



A

B

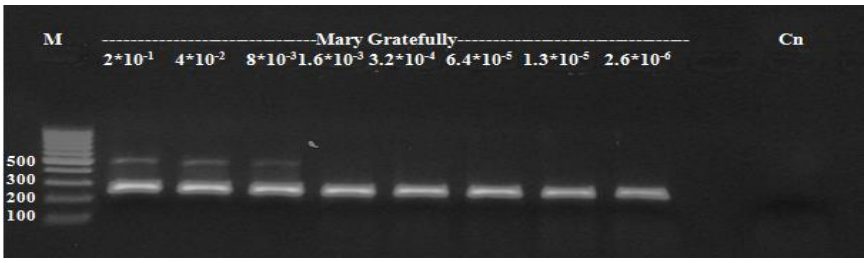


Figura 4.16. Rezultatele analizei PCR prin diluarea serială a ADN-ului la prezența '*Ca.* P. solani' la tomate. A – Elvira; B – Mary Gratefully. M – Marker, Cn – Control negativ

Asfel, în continuare au mai realizat încă 5-10 diluări consecutive pentru a determina pragul de detecție a patogenului '*Ca.* P. solani'. Figura 4.17 prezentă rezultatele analizei *nested*-PCR la soiul de tomate Elvira. Pragul de detecție a fitoplasmei constituie de 2,6 *10^4, după care semnalul deja nu mai era vizibil.

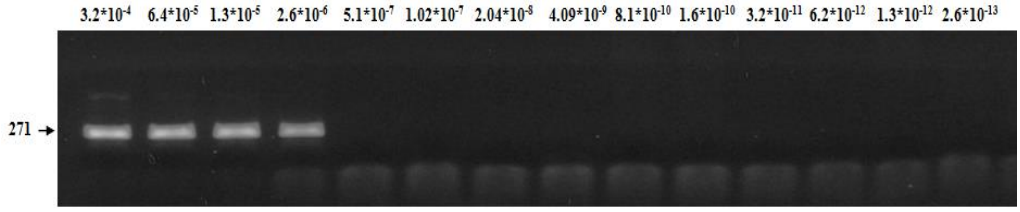


Figura 4.17. Rezultatele analizei PCR prin diluarea serială a ADN-ului la prezența '*Ca.* P. solani' la soiul de tomate Elvira

În figura 4.18 sunt prezentate rezultatele analizei a soiului Mary Gratefully. În baza rezultatelor obținute anterior am decis de a minimiza numărul de diluări până la 5 ori. Conform rezultatelor obținute pragul de detecție la proba Mary Gratefully pragul de detecție este la valoarea de 5,1*10^7.

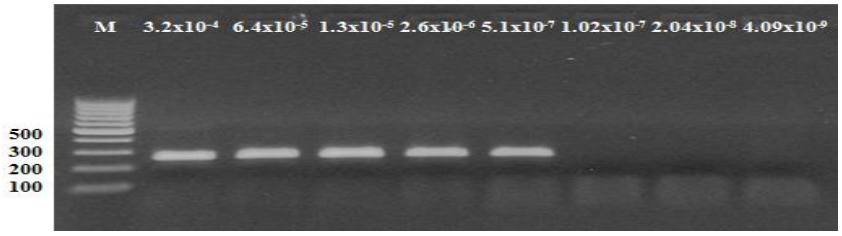


Figura 4.18. Rezultatele analizei PCR prin diluarea serială a ADN-ului la prezența '*Ca.* P. solani' la soiul de tomate Mary Gratefully. M – Marker

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. Au fost selectate diluții a ADN-ului variind de la $3x10^{-4}$ până la $4x10^{-9}$ și parametrii utilizați pentru *nested*-PCR pentru aceasta. Astfel, putem concluziona că analiza cu ajutorul PCR prin diluarea serială 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

Observațiile vizuale au fost efectuate în lunile august a anilor 2018, 2019 și 2020, fructele de la trei plante simptomatice din sezonul de vegetație a anului 2018 și cinci plante simptomatice (Vezi figura 4.10) în sezonul de creștere 2019 au fost colectate, congelate și folosite pentru a verifica prezența fitoplasmei utilizând testări moleculare. ADN-ul a fost extras din 80-100 mg din partea bazală a fiecărui fruct folosind kit-ul DNA-zol (*Thermo Fisher Scientific*) conform instrucțiunilor producătorului.

Inițial, a fost realizată testarea colecția tomatelor infectate la prezența '*Ca*. P. solani' cu primerii R16F2n\R16R pentru prima rundă și 16R396F/R pentru a doua rundă (Figura 4.19).

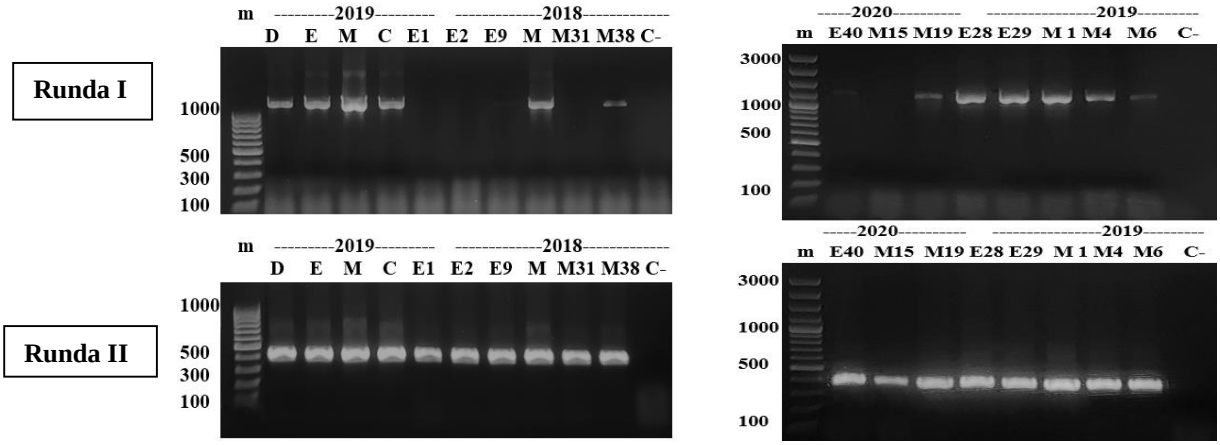


Figura 4.19. Testarea ADN-ului din colecția tomatelor infectate la prezența '*Ca*. P. solani'

Apoi, a fost realizată selectarea condițiilor ale *nested*-PCR cu scopul de a primi secvențe ale genei 16S ARNr cu concentrații necesare pentru secvențierea cu primerii P1\P7 și primerii R16F2n\R16R pentru a doua rundă, urmând condițiile de amplificare raportate (Figura 4.20). Ampliconii au fost separați prin electroforeză în gel de agaroză de 1%, colorați cu bromură de etidiu și analizate sub lumină UV folosind transiluminator *Clearview* UV. Marcherul molecular *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* a fost utilizat în determinarea fragmentelor de interes.

Rezultatele PCR au arătat produse de amplificare cu lungime de aproximativ 1.2 kb în toate probele analizate de tomate, colectate în 3 sezoane de vegetație.

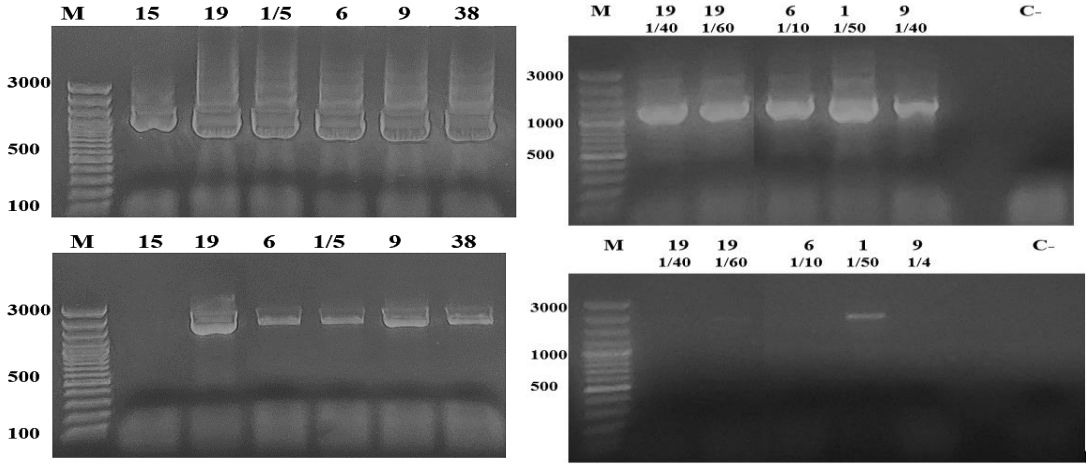


Figura 4.20. Selectarea condițiilor analizei *nested*-PCR pentru obținerea fragmentelor ale genei ribozomale 16S ARNr cu concentrații necesare

În urma analizei datelor obținute, au fost selectate 3 probe de ADN cu concentrații necesare pentru realizarea secvențierii (Figura 4.21). Produsele PCR amplificate din cele trei probe colectate în decursul a trei ani de studiu, 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.

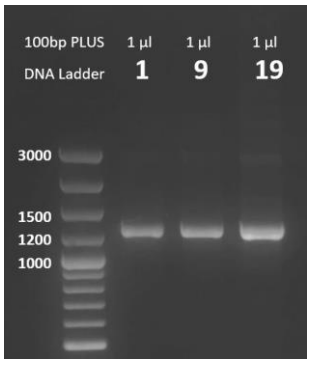


Figura 4.21. Probele de ADN cu concentrații optimale pentru realizarea secvențierii

Secvențele de ampliconi ale probelor pentru cei trei ani (numere de acces OQ275003, OQ275004) 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 (Anexa 1). Compararea a dezvăluit că secvența genei ribozomale al 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' (Figura 4.22).

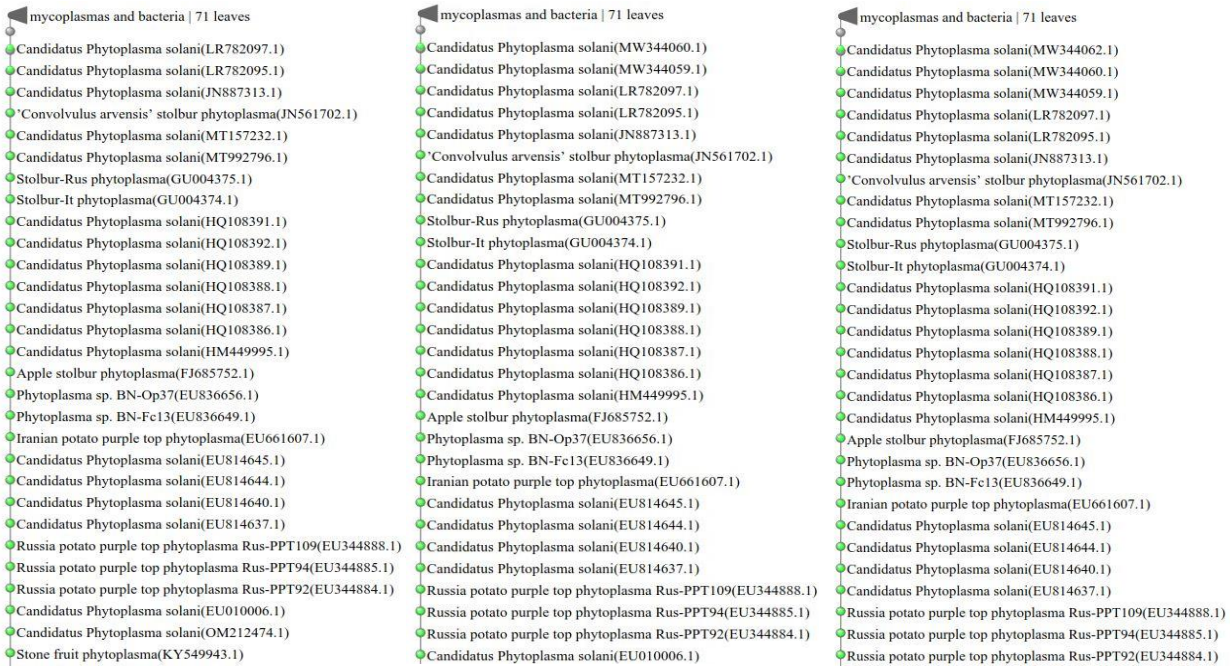


Figura 4.22. Dendrograme pentru probele s19(2020), s1 (2019) și s9 (2018)

Aceste secvențe complet identice au fost identificate în plante cultivate și ruderale infectate precum și în insectele vector, în principal în Europa și Orientul Mijlociu, în apropierea relativă de teritoriul Moldovei (Tabelul 1). 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) [146].

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, dat cel mai probabil din Turcia, în contextul importurilor mari de produse agricole.

4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Studiile efectuate au permis identificarea genotipurilor mai sensibile și mai rezistente la infecția *'Ca*. P. solani' în anii 2018, 2019 și 2020.
2. Soiul Cerasus a demonstrat cea mai mare rezistență la infestarea cu '*Ca*. P. solani' dintre soiurile studiate, un nivel relativ mai mare de daune aduse plantelor de către infecția fitoplasmică a fost observat doar la sfârșitul perioadei de vegetație.
3. Soiul Cerasus poate fi recomandat amelioratorilor ca material genetic pentru crearea genotipurilor rezistente la fitoplasmă (hibrizi și soiuri).

4. Soiul Elvira a prezentat o sensibilitate mai înaltă la infecția fitoplasmică în toți anii de cercetare, indiferent de condițiile climatice.
5. Soiul Deșteparea a demonstrat indici asemănători cu soiul Elvira în sezoanele de vegetație ale anilor 2018 și 2019. Pe când, în condițiile anului 2020, caracterizat prin temperaturi înalte și secetă pedologică, acest soi a demonstrat o imunitate completă la infecția fitoplasmică.
6. Aceste două soiuri au manifestat o sensibilitate mult mai mare la infecția cu fitoplasma în comparație cu soiul Cerasus, diferența de răspândire a infecției la etapa de coacere în masă a fructelor a fost foarte evidentă (anii 2018 și 2019).
7. Genotipurile care au fost susceptibile la infecția '*Ca*. P. solani' în funcție de condițiile climatice ale sezonului de vegetație, s-au dovedit a fi Mary Gratefully și Deșteparea.
8. Prezența infecției fitoplasmice nu a fost determinată în plantele a celor patru forme spontane de tomate. Considerăm, că formele spontane de tomate au sensibilitate redusă la fitoplasmă în comparație cu plantele de cultură.
9. Compararea datelor privind cuantificare a '*Ca*. P. solani' în fructele diferitor soiuri de tomate și distribuția fitoplasmei în câmp au demonstrat o corelație parțială a rezultatelor. Aceste caracteristici au fost concomitent scăzute la soiul Cerasus și ridicate la Mary Gratefully în care a fost detectată o corelație.
10. Rezultatele PCR prin diluarea serială a ADN-ului poate fi utilizat ca metodă alternativă pentru cuantificarea '*Ca*. P. solani' în plante de tomate.
11. În urma secvențerii fragmentelor genei ribozomale 16S ARNr a fost stabilită tulpina '*Ca*. P. solani' care infestează tomatele în Republica Moldova.
12. Compararea secvențelor fitoplasmice de ADN stabilite au arătat o identitate de 100% cu 97 de secvențe '*Ca*. P. solani' din baza de date NCBI.

5. 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: Elvira, Cerasus, Deșteptarea, Mary Gratefully. Inițial, identificarea infecției cu '*Ca*. P. solani' a fost realizată în semințele de tomate din colecția anului 2015. Apoi, fitoplasma a fost detectată în tomatele crescute în condiții controlate la +26°C, timp de 20 de zile fără posibilitatea de a fi expuse la insectele vector. Volumul eșantioanelor a constat din 7-17 probe analizate (semințe sau plantule). ADN-ul pentru diagnosticul molecular a fost izolat prin metoda DNA-zol dintr-un mix de plantule sau semințe de tomate. Este important de menționat că ADN-ul pentru analiza *nested*-PCR a fost extras doar din frunzulițele și tulpinițele plantelor crescute în termostat, epiderma semințelor nu a fost luată pentru studiu. Puritatea probelor izolate cu DNA-zol a fost confirmată prin PCR cu primeri pe baza secvențelor conservative ale genelor ribozomale vegetale. Semințele de tomate au fost analizate individual folosind ADN-ului extras prin metoda expres.

Identificarea infecției '*Ca*. P. solani' în semințe a permis determinarea prezenței acestui patogen în semințele tuturor soiurilor de tomate studiate. În total, aproximativ jumătate din semințele de tomate analizate colectate în 2015 au fost infectate cu fitoplasmă, cu excepția soiului Cerasus, la care indicele a fost mai mic. Totuși, această diferență nu a fost semnificativă, probabil din cauza volumului mic de eșantionare.

'*Ca.* P. solani' nu a fost prezentă în plantulele crescute în termostat: nici în unul din cele patru soiuri de tomate. Deci, s-a constatat lipsa transmiterii stolburilor prin semințele soiurilor de tomate studiate (Figura 5.1).

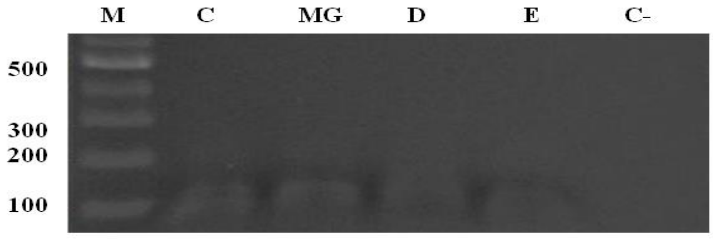


Figura 5.1. Diagnosticul '*Ca.* P. solani' în plantule de tomate crescute în condiții controlate

În continuare s-a realizat analiza adițională privind posibilitatea transmiterii fitoplasmei prin semințele de tomate mărind volumul eșantionului analizat. La fel, pentru studiu au fost

crescute semințele a patru soiuri de tomate: Elvira, Cerasus, Mary Gratefully și Deșteptarea colectate în anul 2017. Adiacent, acestor probe au fost analizate semințele extrase din fructul nr. 41 a soiului Elvira infectat cu fitoplasma, colectat în 2020. În studiu au fost luate câte 20 de semințe din fiecare genotip și tratate în prealabil într-o soluție slabă de $KMnO_4$ timp de 20 min. Ulterior, semințele au fost plasate în cutii Pietri și incubate în termostat la o temperatură constantă de 25°C. După 20 de zile, s-a realizat diagnosticul prezenței '*Ca*.P. solani' (Figura 5.2). Pentru analiză s-a prelevat câte 20 µg de material din fiecare germene. Ectoderma seminței nu a fost luată în cercetare pentru a evita apariția rezultatelor fals-pozitive.

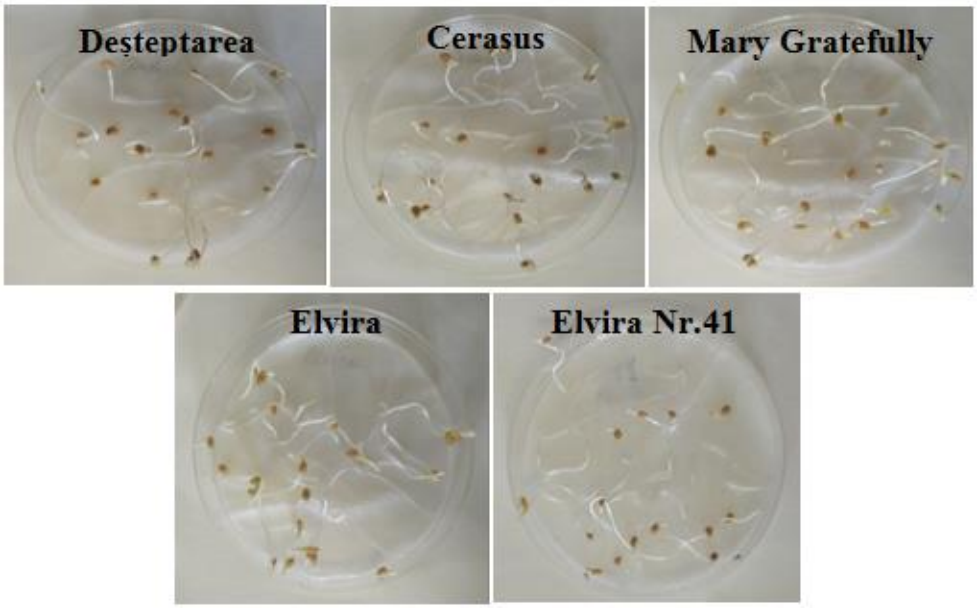


Figura 5.2. Plantule a patru genotipuri de tomate, crescute în condiții controlate din semințele colectate în anii 2017 și 2020

Izolarea ADN-ului din semințe și plantule s-a realizat prin metoda DNA-zol. Pentru fiecare probă, au fost luate câte 15 semințe. În continuare, a fost realizat diagnosticul semințelor și a plantulelor de tomate crescute în termostat la prezența fitoplasmei. 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. 5.3).

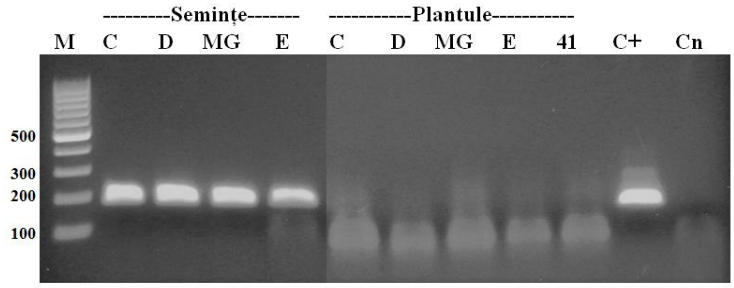


Figura 5.3. Rezultatele *nested*-PCR la prezența infecției '*Ca.* P. solani' în semințe și plantule de tomate. M – marcher molecular; C- – control negativ al amplificării

Principala concluzie a acestui studiu este că, în decursul a doi ani stolburul nu este transmis prin semințele soiurilor de tomate analizate [147], (Tabelul 5.1).

Tabelul 5.1. Diagnosticului molecular al '*Ca.* P. solani' în semințe și germeni de tomate

Soiul	Semințe		Germeni (termostat)	
	volum	'*Ca.* P. solani'	volum	'*Ca.* P. solani'
Elvira	7 *ind*	3	17 *mix*	nu
Cerasus	7 *ind*	2	17 *mix*	nu
Deșteptarea	7 *ind*	4	12 *mix*	nu
Mary Gratefully	0	*XX*	12 *mix*	nu

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: 1 – la sfârșitul lunii mai, în solar, unde răsadul de tomate a fost crescut; 2 – în primele zile a lunii iunie după transplantarea plantelor; 3 – în lunile iulie și august (etapa de maturare a fructelor de tomate); 4 – în mijlocului decadei a doua a lunii septembrie, la finalul sezonului de creștere a plantelor de tomatelor în câmp (Tabelul 5.1) [3].

La început, analiza moleculară a fost realizată pe baza insectelor capturate în luna mai în apropierea solarului. Doar 5 insecte potențiali vectori au fost prinse pe parcursul a 7 zile, folosind plăci adezive, galbene. Analiza moleculară la prezența sau lipsa '*Ca*. P. solani' în insectele capturate nu a determinat infecția (Tabelul 5.2). La fel, infecția fitoplasmică nu a fost detectată la răsadul de tomate din solar. Această observație poate fi atribuită absenței dovezilor privind transmiterea fitoplasmei prin semințele de tomate ale soiurilor cercetate [147].

Tabelul 5.2. Determinarea patogenului '*Ca.* P. solani' la insecte pe parcursul sezonului de vegetație a tomatelor [3]

Faza	Luna / Etapa de vegetație	Numărul insectelor		% insectelor infectate	% tomatelor infectate
		Analizate	Infectate		
I	Mai, răsad (seră)	5	0	0	0
II	Iunie, începutul perioadei de vegetație	25	0	0	0
III	Iulie-august, maturarea fructelor	48	7	14.6	44.9
IV	Septembrie, sfârșitul perioadei de vegetație	12	7	58.3	69.6

Ulterior, a fost realizată o analiză pentru a detecta infecția '*Ca*. P. solani' la posibile insecte transmițători ai patogenului după transplantarea plantulelor de tomate pe câmpurile experimentale ale institutului. Inițial, la începutul sezonului de vegetație a tomatelor în câmp, s-a observat o răspândire numerică mică a insectelor (potențiali vectori). Analiza *nested*-PCR nu a determinat patogenul în insectele colectate (Tabelul 5.2). La fel, diagnosticul molecular al '*Ca*. P. solani' pe baza materialului vegetal din tomate la începutul lunii iunie nu a identificat prezența patogenului. Prin urmare, se poate concluziona lipsa infecției '*Ca*. P. solani' pe parcelele experimentale ale IGFPP după transplantarea răsadului de tomate în câmp.

Analiza moleculară a fitoplasmei la 36 insecte prinse în lunile iulie și august a facilitat determinarea inițială a patogenului doar la 3 insecte (Figura 5.4).

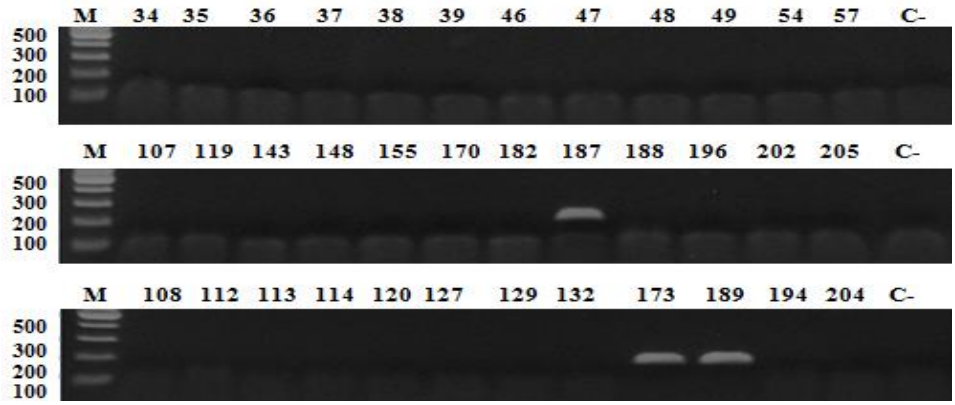


Figura 5.4. Diagnosticul molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din insectele colectate în lunile iulie și august; M – marcher molecular; C- – control negativ al amplificării

Adițional a fost realizat diagnosticul molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' cu cu scopul de a identifica prezența infecției fitoplasmice în insectele prinse în lunile iulie și august.

Rezultatele sunt ilustrate în figura 5.6 și tabelul 5.2. S-a stabilit că la 4 din 12 insectele testate au fost infectate cu '*Ca*. P. solani'. Analiza moleculară a plantelor de tomate colectate în perioada lunilor iulie și august a indicat prezența infecției fitoplasmice la 44,9% din plante examinate.

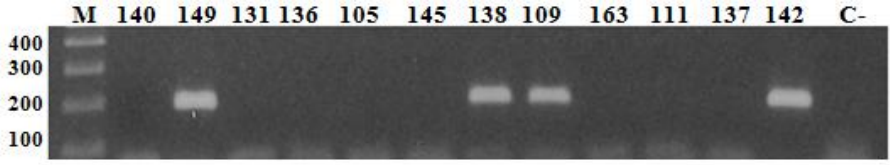


Figura 5.5. Diagnosticul molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din insectele colectate în lunile iulie și august.
M – marcher molecular; C- – control negativ al amplificării

În Figura 5.6 sunt ilustrate cicadele la care s-a diagnosticat că sunt putători ai infecției fitoplasmice în perioada de analiză iulie și august și care coincide cu etapa de dezvoltare și coacere a fructelor de tomate. Cifra care însoțește fiecare fotografie a insectei se potrivește cu identificatorul de bandă corespunzătoare de pe electroferogramă (Figurile 5.4 și 5.5).



Figura 5. 6. 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 (Figura 5.7, Tabelul 5.2). Diagnosticul molecular a permis determinarea unui nivel procentual ridicat de infecție cu stolbur și la plantele de tomate în perioada studiată, care a atins valoarea de 69,6%.

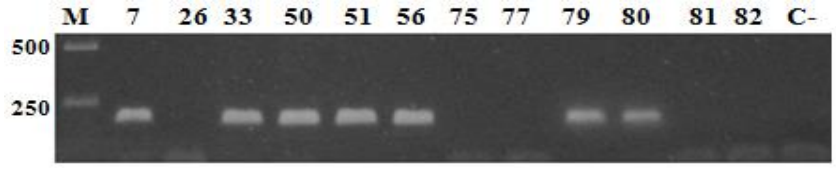


Figura 5.7. Diagnosticul molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului izolat din insectele colectate în mijlocul lunii septembrie. M – marcher molecular; C- – control negativ al amplificării

Insecte din ordinul Hemiptera, infectate cu '*Ca*. P. solani' în septembrie, sunt prezentate în figura 5.8.



Figura 5.8. 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. Datele obținute confirmă descoperirile noastre anterioare privind răspândirea stolburului la plantele de tomate crescute pe loturile experimentale. Insectele din ordinul Hemiptera în care a fost determinată molecular cu primeri specifici pentru '*Ca*. P. solani' prezența patogenului, pot fi privite ca potențiali transmițători ai acestui patogen.

5.3. Analiza plantelor ruderale la prezența fitoplasmei

O importanță deosebită în studiul fitoplasmei îl constituie analiza tuturor elementelor în lanțul de transmitere a fitoplasmei. Un rol esențial îl constituie identificarea speciilor de plante perene pe rădăcinile cărora iernează insectele vector, cu scopul minimizării răspândirii infecției fitoplasmice. Unul din principalii vectori ai '*Ca.* P. solani' în regiunea europeana este *Hyalestus obsoletus* care iernează pe rădăcinile *Convolvulus arvensis* după care în decursul sezonului de vegetație colonizează vița de vie, tomatele ș.a. Astfel, un obiectiv al cercetării la constituit inclusiv determinarea patogenului '*Ca*. P. solani' în plantele de *C. arvensis*.

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* (Figura 5.9). Materialul vegetal s-a colectat în apropierea câmpurilor de studiu ale institutului și lângă seră, în principal după data de 20 a lunii

august. Selecția acestor specii s-a bazat pe faptul că sunt cunoscute ca gazde naturale a '*Ca*. P. solani' în regiunile adiacente[17].

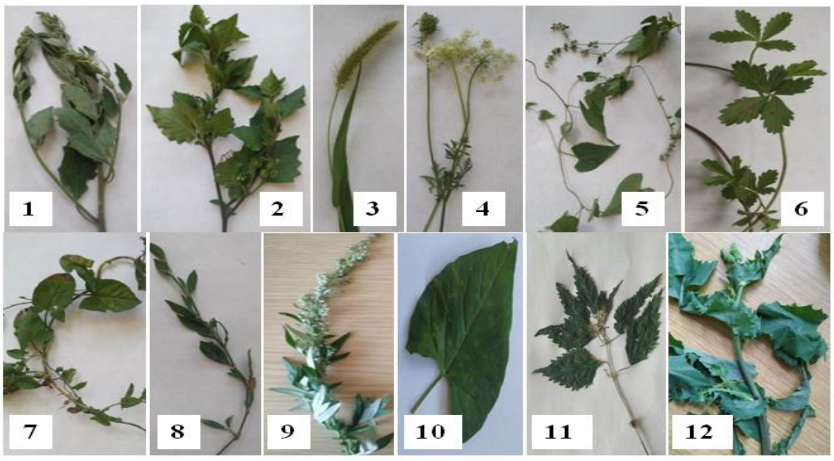


Figura 5.9. Speciile de buruieni cercetate la prezența '*Ca.* P. solani'
1 – *C. album*, 2 – *S. nigrum* 3 – *D. carota*, 4 – *S. viridis*, 5 – *P. convolvulus*, 6 – *P. reptans*, 7 – *C. arvensis*, 8 – *P. aviculare*, 9 – *A. vulgaris*, 10 – *C. sepium*, 11 – *U. dioica*, 12 – *S. oleraceus*

Extragerea ADN-ului s-a efectuat cu ajutorul a diferitor metode inclusiv utilizând DNA-zol, Na-acetat, K-acetat, și prin metoda expres.

Pentru diagnosticul molecular al prezenței sau lipsei patogenului '*Ca*. P. solani' la buruieni s-a realizat cu ajutorul metodei *nested*-PCR. Pentru identificarea fitoplasmei în cercetare s-au utilizat primeri ribozomali și/sau chaperonine specifici patogenului studiat. S-au optimizat condițiile pentru determinarea moleculară a '*Ca*. P. solani' la plantele erbacee (buruieni). Reacția de amplificare s-a efectuat în corespundere cu programul următor: I – 5 min la 94°C; II – 30 sec la 94° C, 30 sec la 58°C, 30 sec la 72°C * n (n=30,35, 45 prima rundă) și × 35 (a doua rundă); III – 10 min la 72° C; IV - ∞ la 4°C.

La etapa inițială, analiza moleculară a '*Ca*. P. solani' s-a realizat la plantele speciei *C. arvensis* colectate la începutul lunii octombrie în anul 2017, în proximitatea loturilor de cultivare a tomatelor. ADN-ul s-a extras de la baza tulpinii a 6 plante folosind metodele de izolare Na-acetat și fierberea în soluție alcalină. Metoda Na-acetat este similară izolării ADN-ului prin K-acetat. Determinarea moleculară a patogenului '*Ca*. P. solani' s-a efectuat cu ajutorul analizei *nested*-PCR prin utilizarea primerilor 16Sr396F/R și 16Sr245F/R. Infecția fitoplasmică nu a fost diagnosticată în probele studiate necătând la metoda de izolare a ADN-ului. Este posibil că numărul redus plantelor cercetate, a fost insuficient de a detecta patogenul '*Ca*. P. solani'. În continuare, s-a stabilit de a mări volumul numeric al plantelor studiate pentru a crește șansele de detectare a infecției.

Apoi, s-a efectuat diagnosticul molecular al '*Ca*. P. solani' din plantele de *C. arvensis*. Probele au fost colectate în vecinătatea loturilor de cultivare a viței de vie, tomatelor, și a grâului.

Cercetarea s-a realizat la începutul sezonului de vegetație a anului 2019, ultima decadă a lunii mai. În acest studiu, eșantionul al probelor cercetate a crescut și numeric până la 13. Materialul vegetal a fost recoltat în regiunea bazală a tulpinii. ADN-ul s-a extras cu ajutorul metodei DNA-zol. Diagnosticul molecular a fost efectuat cu primerii specifici cpn421 F/R și cpn200 F/R, incluzând unele modificări: în cadrul primei runde a *nested*-PCR au fost realizate 45 de cicluri. Rezultatele analizei *nested*-PCR nu au determinat infecția fitoplasmică la plantele studiate (Figura 5.10).

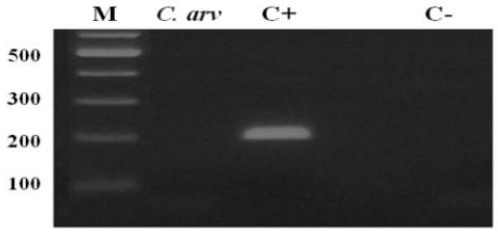


Figura 5.10. Diagnosticul molecular al plantelor speciei *C. arvensis* cu primeri cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras cu Na-acetat
M – Marker, C- – Control negativ, C+ – Control pozitiv

Diagnosticul molecular al prezenței infecției fitoplasmice nu a determinat prezența acesteia în plantele de *C. arvensis* pe parcursul întregului sezon de vegetație. Din acest motiv s-a stabilit de a extinde analiza și a altor specii de buruieni care ar putea fi gazde naturale a '*Ca*. P. solani' în regiune. Deci, douăsprezece specii de plante au fost selectate pentru ca potențiale gazde naturale ale patogenului. Plantele au fost colectate în a doua decadă a lunii august în anul 2021. ADN-ul a fost extras cu ajutorul metodei K-acetat. Apoi, s-a realizat determinarea calității ADN-ului extras folosind primerii ribozomali vegetali (Figura 5.11). Eficiența acestor primeri a fost stabilită anterior în analiza calitativă a ADN-ului extras prin reacția de amplificare într-o rundă.

Evaluarea datelor primite a indicat o calitate bună a ADN-ului izolat de la 4 specii de plante, care v-or fi apoi utilizate în diagnosticul fitoplasmei. În cazul, când probelor în care nu s-a produs semnalul pozitiv, acestea vor fi testate pe viitor cu utilizarea a diferitor metode de extracție a ADN-ului.

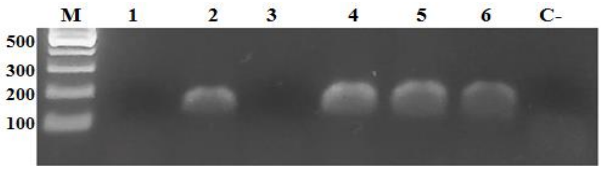


Figura 5.11. Diagnosticul molecular calitativ al ADN-ului extras cu K-acetat din buruieni
1 – *C. arvensis,* 2 – *C. sepium,* 3 – *D. carota,* 4 – *C. album,* 5 – *S. viridis,* 6 – *S. nigrum.*M – Marker, C- – Control negativ

S-a stabilit prezența patogenul '*Ca*. P. solani' la specia *S. nigrum* în urma analizei moleculare a 4 probe ce au prezentat o calitate înaltă a ADN-lui (Figura 5.12). Prima și a doua rundă de *nested*-PCR au fost formate din 30 cicluri. Semnalul de amplificare fiind neaccentuat.

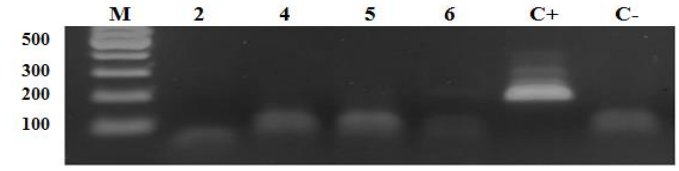


Figura 5.12. Diagnosticul molecular al unor specii de buruieni cu primerii cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras cu K-acetat

2 – *C. sepium*, 4 – *C. album*, 5 – *S. viridis*, 6 – *S. nigrum*. M – Marker, C+ – Control pozitiv, C- – Control negativ

Ulterior, a fost reevaluată prezența infecției '*Ca*. P. solani' la unele buruieni folosind metoda de extracție prin fierbere în soluție alcalină. Pentru extracția ADN-ul s-au utilizat porțiuni fine ale tulpinii. În cazul izolării ADN-ului din planta *U. dioica* materialul s-a prelevat din pețiol. Figura 5.13 ilustrează datele analizei moleculare specifice cu primerii cpn200 F/R pentru infecția fitoplasmică. Diagnosticul molecular a '*Ca*. P. solani' a stabilit prezența patogenului la specia *S. nigrum* (Tabelul 5.3). Semnalul de amplificare a fost mai puternic, decât în cazul izolării ADN-ului prin metoda K-acetat.

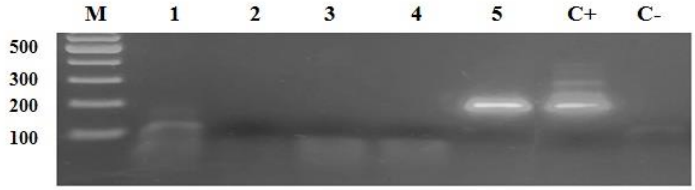


Figura 5.13. Diagnosticul molecular al unor specii de buruieni cu primerii cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras prin fierbere în soluție alcalină

1 – *U. dioica*, 2 – *P. aviculare*, 3 – *P. convolvulus*, 4. – *S. oleraceus*, 5 – *S. nigrum*. M – Marker, C+ – Control pozitiv, C- – Control negativ

De asemenea, suplimentar au fost testate patru specii de buruieni *P. reptans*, *A. vulgaris*, *C. arvensis* și *D. carota*. ADN-ul din probe s-a extras cu ajutorul metodei de fierbere în soluție alcalină. S-a efectuat din nou testarea prezenței fitoplasmei la specia *U. dioica* utilizând porțiuni fine din tulpina pentru extragerea materialului genetic. Eșantionul de plante studiate într-o probă generală s-a extins până la 27 (Anexa 3) [4].

În urma acestei analize, utilizând metoda de izolare a ADN-ului în soluție alcalină, s-a identificat prezența patogenului la specia perenă *C. arvensis* (Figura 5.14, Tabelul 5.3).

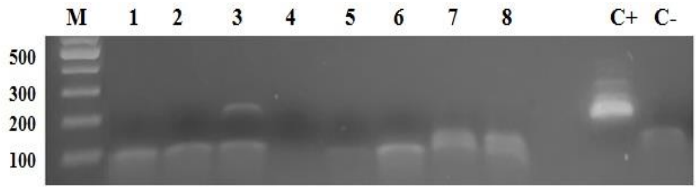


Figura 5.14. Diagnosticul molecular al unor specii de buruieni cu primeri cpn200 F/R specifici pentru '*Ca*. P. solani' pe baza ADN-ului extras prin fierbere în soluție alcalină

1 – *U. dioica*, 2 – *D. carota*, 3 – *C. arvensis*, 4 – *A. vulgaris*, 5 – *P. reptans*, 6 – *C. sepium*, 7 – *C. album*, 8 – *S. veridis.* M – Marker, C+ – Control pozitiv, C- – Control negativ

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 dignosticat 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. Astfel diagnosticul molecular al 12 specii de buruieni a stabilit prezența infecției '*Ca*. P. solani' la *C. arvensis* și *S. nigrum*. S-a constatat, de asemenea, că pentru a preveni apariția rezultatelor fals-negative este necesar de a crește numărul de cicluri de amplificare în cadrul PCR.

Tabel 5.2. Rezultatele analizei moleculare a fitoplasmei la unele specii de buruieni [4]

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	-

5.4. Concluzii la capitolul 5

1. Stolburul nu este transmis prin semințele soiurilor de tomate autohtone analizate.
2. Creșterea semnificativă a numărului insectelor din ordinul Hemiptera infectate cu fitoplasmă s-a observat la sfârșitul perioadei de vegetație a tomatelor în câmp.
3. Insectele în care s-a diagnosticat prezența fitoplasmei, pot fi considerate ca posibili transmițători ai stoburului.
4. Identificarea moleculară a fitoplasmei din plantele perene a determinat prezența patogenului la specia *Convolvulus arvensis și Solanum nigrum.*

CONCLUZII GENERALE

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 a 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 *Solanum habrochaites* poate fi utilizată ca martor, deoarece plantele speciei date nu au fost afectate cu '*Ca*. P. solani' pe parcursul a doi ani de studiu.
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 în serie 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 *Convolvulus arvensis* fiind plantă perenă, poate fi considerată ca rezervoar al infecției.
10. Secvențele nucleotidice obținute pe baza ADN-ului 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.

RECOMADĂRI PRACTICE

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. Perioada de maturare în masă a fructelor este cea mai potrivită pentru estimarea rezistenței soiurilor de tomate la infecția '*Ca*. P. solani'.
3. Metoda de izolare a ADN-ului în soluție alcalină poate fi utilizată în evaluarea rapidă și sigură a rezistenței tomatelor la stolbur.
4. Diagnosticul molecular a 12 probe din cadrul unui soi permite obținerea datelor statistic veridice. 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. BADEA R., ŞTEFĂNESCU S. L., DUMITRAŞCU M. Îndrumar de practici tradiționale şi ecologice în legumicultura ecologică. Bucureşti: Esfalia, 2005, 153 p, ISBN 973-87290-4-1.
2. **BAHȘIEV, 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.
3. **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.
4. **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.
5. BAI, X. et al. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of Their Insect and Plant Hosts. In: *Bacteriology*. 2006, vol. 188, nr. 10, pp. 3682-3696.
6. BĂDĂRĂU, S. Fitopatologie generală. Curs de prelegeri. Chișinău: "Print-Caro" SRL, 2010, 352 p, ISBN 978-9975-4044-0-2.
7. BENEDETTI, F., CURRELI, S., ZELLA D. Mycoplasmas-host interaction: mechanisms of inflammation and association with cellular transformation. In: *Microorganisms.* 2020, vol. 8, pp. 1–21.
8. BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. In: *Frontiers in Bioscience*. 2007, vol. 12, pp. 673–689.
9. BERTACCINI, A. Plants and phytoplasmas: when bacteria modify plants. In: *Plants*. 2022, vol. 11, nr. 1425, pp. 1–20.
10. BERTACCINI, A., Duduk B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. In: *Phytopathologia Mediterranea*. 2009, vol.48, pp. 355–378.
11. BIANCO, P. A. et al. Integrated Management of Phytoplasma Diseases. In: Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – II. Singapore: Springer, 2019. pp. 237–258. ISBN: 978-981-1328-32-9.
12. BIANCO, P. A., BULGARI, D., CASATI, P., QUAGLINO, F. Conventional and novel strategies for the phytoplasma diseases containment. In: *Patologia Vegetale, Università degli Studi di Milano. Phytopathogenic Mollicutes*. 2011, vol.1, pp. 77–82.

13. BOGOUTDINOV, D.Z. et al. Phytoplasma diseases: a review of 50 year history and current advances. In: *Selskokhozyaistvennaya Biologyia*. 2019, vol. 54, nr. 1, pp. 3–18.
14. BOLLER, T., HE, S.Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. In: *Science*. 2009, vol. 324, pp. 742–744.
15. BOTNARI, V. Simptomatica degradărilor fiziologice și a bolilor infecțioase la tomate. Chișinău: "Print-Caro" SRL, 2021. 95 p, ISBN 978-9975-56-882-1.
16. BRESSAN, A., PURCELL, A.H. Effect of benzothiadiazole on transmission of X-disease phytoplasma by the vector *Colladonus montanus* to *Arabidopsis thaliana*, a new experimental host plant. In: *Plant Disease*. 2005, vol. 89, pp. 1121–1124.
17. 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.
18. BUOSO, S. et al. "*Candidatus* Phytoplasma solani" interferes with the distribution and uptake of iron in tomato. In: *BMC Genomics*. 2019, vol. 20, nr. 1, pp. 1–21.
19. CABI. CABI Datasheet on Pest '*Candidatus* Phytoplasma solani' (Stolbur phytoplasma). [online]. 2020. [citat 14 Mai 2021]. Disponibil:https://www.cabi.org/isc/datasheet/108243.
20. CAGLAR, B.K., SIMSEK, E. Detection and multigene typing of '*Candidatus* Phytoplasma solani'- related strains infecting tomato and potato plants in different regions of Turkey. In: *Pathogens*. 2022, vol. 11, nr.1031, pp. 1–14.
21. CAGLAYAN, K., GAZEL, M., ŠKORIĆ, D. Transmission of phytoplasmas by agronomic practices: transmission and management of phytoplasma - associated diseases. In: Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – II. Singapore: Springer, 2019. pp.149–163. ISBN: 978-981-1328-32-9.
22. CAINELLI, C. *Population dynamics of apple proliferation in Trentino*. PhD, 2007. p.18.
23. CAO, Y., TRIVELLONE, V., DIETRICH, C.H. A timetree for phytoplasmas (Mollicutes) with new insights on patterns of evolution and diversification, In: *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2020, vol. 149, nr. 106826, pp. 1–28.
24. CARLE, P., LAIGRET, F., TULLY, J. G., BOVE, J. M. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. In: *Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1995, vol. 45, pp. 178–181.
25. CHALAK, L. et al. Elimination of grapevine "bois noir" phytoplasma by tissue culture coupled or not with heat therapy or hot water treatment. In: *Advances in Crop Science and Technology.* 2013, vol. 1, nr.2, pp.1–4.

26. CHIESA, S. et al. Activity of synthetic and natural compounds for phytoplasma control. In: *Bulletin of Insectology*. 2007, vol.60, nr. 2, pp. 313–314.
27. CHUNG, W.C., CHEN, L.L., LO, W.S., LIN, C.P., KUO, C.H. Comparative analysis of the peanut witches'-broom phytoplasma genome reveals horizontal transfer of potential mobile units and effectors. In: *PLoS One*. 2013, vol. 8, nr. 4, pp.1–10.
28. CIOBANU, V., MUNTEANU N. Caracterizarea imuno-fiziologică a colecției de tomate pentru câmp deschis. In: *Academos*. 2014, nr. 4(35), pp. 111–115.
29. CONTALDO, N. et al. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. In: *Microbiological Methods*. 2016, vol. 127, pp. 105–110.
30. CONTALDO, N. et. al. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. In: *Phytopathologia Mediterranea*. 2012, vol. 51, pp. 607–617.
31. COST Action FA0807. New perspectives in phytoplasma disease management. Book of abstracts of presentations. [online]. Spain: COST, 2013. 78 p. [citat 7 Iunie 2019]. Disponibil:https://www.costphytoplasma.ipwgnet.org/PDF%20files/BOOK%20COST%20BCN%202013%20080313web.pdf.
32. DELIĆ, D. Polymerase chain reaction for phytoplasmas detection. Polymerase chain reaction. Croatia: In Tech. 2012, pp. 91–120. ISBN: 978-953-51-0612-8.
33. DENG, S., EIIMKI C. Enhanced detection of a plant pathogenic mycoplasmaiike organisms by polymerase chain reaction. In: *Proceedings of the Japanese Academy.* 1990, vol. 66, nr.7, pp. 140–144.
34. DERMASTIA, M., BERTACCINI, A., CONSTABLE, F, MEHLE, N. Grapevine yellows diseases and their phytoplasma agents. Switzerland: Springer, 2017. pp: 17–46. ISBN: 978-3-319-50647-0.
35. DIAGHILEVA, A., MITIN, V., PAŞA, L., TUMANOVA, L. Molecular examination of tomato plants whith *TYLCV*- like symptoms. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2016, nr. 3(330), pp. 104–108.
36. DICKINSON, M, TUFFEN, M, HODGETTS, J. The phytoplasmas: an introduction. In: Phytoplasma: methods and protocols. USA: Humana Press, 2013. pp. 1–14. ISBN: 978-1-62703-088-5
37. DICKINSON, M. Mobile units of DNA in phytoplasma genomes. In: *Molecular Microbiology*. 2010, vol. 77, nr. 6, pp.1351–1353.

38. DOI, Y. et al. Mycoplasma- or PLT group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. In: *Japanese Journal of Phytopathology*. 1967, vol. 33, pp. 259–266.
39. 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.
40. ELATEEK, S. Y. Y. M. *Molecular and biochemical genetic studies of some leafhopper transmited plant pathogens*. PhD. 2010, pp. 18.
41. EMBER, I. *Epidemiology of Bois noir disease and effect of disease on grapevine performance and wine quality in Hungary*. PhD. 2016, pp. 18
42. FISCHER, I. et al. Draft genome sequence of "*Candidatus* Phytoplasma oryzae" strain Mbita1, the causative agent of Napier grass stunt disease in Kenya. In: *Genome Announcements*. 2016, vol. 4, nr. 2, pp. 1–2.
43. 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.
44. GALETTO L., MARZACHI C. Real time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. UK: CABI, 2010. p.1–19. ISBN: 978-1-84593-530-6.
45. GASPARICH, G. Spiroplasmas: evolution, adaptation and diversity. In: *Frontiers in Bioscience.* 2002, vol. 7, pp. 619-640.
46. GUNDERSEN, D.E. et al. Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. In: *Journal of Bacteriology*. 1994, vol. 176, pp. 5244–5254.
47. GUO, Y., CHENG, Z.M., WALLA, J.A. Rapid PCR-based detection of phytoplasmas from infected plants. In: *HortScience*. 2003, vol. 38, nr.6, pp.1134–1136.
48. HEMMATI, C., NIKOOEI, M., AL-SUBHI, A. M., AL-SADI, A. M. History and current status of phytoplasma diseases in the Middle East. In: *Biology*. 2021. vol. 10, nr. 3, pp.1–20.
49. HODGETTS J., BOONHAM N., MUMFORD, R., DICKINSON, M. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, vol. 75, nr. 9, pp. 2945–2950.
50. HOGENHOUT, S. A. et al. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. In: *Molecular plant pathology*. 2008, vol. 9, nr. 4. pp. 403–423.

51. HOGENHOUT, S. A., MUSIC, M. S. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics – what have we learnt. In: Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. UK: CABI, 2009. pp. 19–36. ISBN: 978-1-84593-530-6.
52. HOSHI, A. et al. Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. In: *Bulletin of Insectology*. 2010, vol. 60, nr. 2, pp. 105–107.
53. HOSHI, A., OSHIMA, K., KAKIZAWA, S. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, vol. 106, nr. 15, pp. 6416–6421.
54. HUGENHOLTZ, P. et al. Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. In: *ISME Journal*. 2021, vol.15, pp. 1879–1892.
55. IRPCM. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. In: *Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, vol. 54, pp. 1243–1255.
56. IWABUCHI, N. et al. Functional variation in phyllogen, a phyllody-inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism. In. *Molecular Plant Pathology*. 2020, vol. 21, nr. 10, pp. 1322–1336.
57. JAIN, C. et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. In: *Nature Communications*. 2018, vol.9, pp. 1–8.
58. JOMANTIENE, R., DAVIS, R. E. Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. In: *Microbiology letters*. 2006, vol. 255, pp.59–65.
59. KAKIZAWA, S. et al. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. In: *Microbiology*. 2004, vol. 150, nr. 1, pp. 135–42.
60. KAKIZAWA, S. O., OSHIMA, K., NAMBA, S. Functional genomics of phytoplasmas. In: Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. UK: CABI, 2010. pp. 37–50. ISBN: 978-1-84593-530-6.
61. KHAN, J.A., SRIVASTAVA, P., SINGH, S.K. Efficacy of nested-PCR for the detection of phytoplasma causing spike disease of sandal. In: *Current Science*. 2004, vol. 86, pp. 1530–1533.
62. KITAZAWA, Y. et al. Phytoplasma-conserved phyllogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins, In: *Journal of Experimental Botany*. 2017, vol. 68, nr. 11, pp. 2799–2811.

63. KOINUMA, H. et al. Spatiotemporal dynamics and quantitative analysis of phytoplasmas in insect vectors. In: *Scientific Reports*. 2020, vol. 10, pp. 1–13
64. KUBE, M. et al. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. In: *The Scientific World Journal*. 2012, vol. 2012. pp. 1-25.
65. KUMARI, S. et al. Global status of phytoplasma diseases in vegetable crops. In: *Frontiers in Microbiology*. 2019, vol. 10, pp. 1–15.
66. LEE, I. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., BERTACCINI, A. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. In: *Phytopathology*. 1998, vol. 88, pp. 1359–1366.
67. LEE, I-M et al. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. In: *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1998, vol. 48, nr. 4, pp. 1153–1169.
68. LIM, P. O., SEARS, B. B. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasmalike organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. In: *Bacteriology*. 1992, vol. 174, nr. 8, pp. 2606–2611.
69. LINCK, H. *Diagnosis, transmission, and management of phytoplasmas infecting rubus species*. PhD. 2019, pp. 7.
70. LINGUA, G. et al. Mycorrhiza induced differential response to a yellows disease in tomato. In: *Mycorrhiza*. 2002, vol. 12, pp. 191–198.
71. LU, Y.T. et al. Transgenic plants that express the phytoplasma effector SAP11 show altered phosphate starvation and defense responses. In: *Plant Physiology*. 2014, vol. 164, nr. 3, pp. 1456–1469.
72. MAGGI, F. et al. Temperature-dependent transmission of *Candidatus* phytoplasma asteris by the vector leafhopper *Macrosteles quadripunctulatus* Kirschbaum. In: *Entomologia*. 2014, vol. 2, pp. 87–94.
73. MAIDEN, M.C. Multilocus sequence typing of bacteria. In: *Annual Review of Microbiology*. 2006, vol. 60, pp. 561–588.
74. MANILOFF, J. Phylogeny and Evolution. In: Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. USA: Springer, 2002. pp. 31–43. ISBN: 978-1-4757-8232-5
75. MARCONE, C. et al. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. In: *Phytopathology*. 1999, vol. 89, nr. 9, pp. 805–810.
76. MARCONE, C. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. In*: Annals of Applied Biology*. 2014, vol. 165, nr. 2, pp. 199–221.

77. 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.
78. MEJIA, J. F. *Identification and genetic diversity in phytoplasmas associated with diseases of cassava and other agronomic relevant crops in south-east Asia and Latin America*. PhD. 2014, pp. 25.
79. Meteo [online]. Serviciul Hidrometeorologic de Stat [citat 20 mai 2021]. Disponibil: https://www.meteo.md/index.php/meteo/arhiva/arhiva-anilor/
80. MINATO, N. The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. In: *Scientific Reports*. 2014, vol. 4, pp. 1–7.
81. MIRMAJLESSI, S. M., LOIT, E., MÄND, M., MANSOURIPOUR, S. M. Real-Time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis – a review. In: *Plant Protection Science*. 2015, vol. 51, nr. 4, pp. 177–190.
82. 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.
83. MÖLLERS, C., SARKAR, S. Regeneration of healthy plants from *Catharanthus roseus* infected with mycoplasma-like organisms through callus culture. In: *Plant Science.* 1989, vol. 60, nr. 1, pp. 83–89.
84. MOORE E.R. et al. 16S rRNA gene sequence analyses and inter-and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. In: *FEMS Microbiology Letters.* 1997, vol. 151, pp. 145–153.
85. MORAJDHWAJ S. Organic disease management in agricultural and horticultural crops. Ed.1. India: SR edu Publications, 2023. 139 p. ISBN: 978-93-92941-01-6
86. MORI, N. et al. Factors affecting the spread of ‘Bois Noir’ disease in north Italy vineyards. In: *Vitis*. 2008. vol. 47, nr.1, pp. 65–72.
87. MORTON, A., DAVIES, D.L., BLOMQUIST, C.L., BARBARA, D.J. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. In: *Molecular Plant Pathology*. 2003, vol. 4, nr.2, pp.109–114.

88. MOYA-RAYGOZA, G., NAULT, L.R. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). In: *Annals of Entomological Society of America*. 1998, vol. 91, nr. 5, pp. 668–676.
89. MURRAY, R.G., SCHLEIFER, K.H. Taxonomic notes: A proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. In: *Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1994, vol. 44, pp. 174–176.
90. NAMBA, S. Molecular and biological properties of phytoplasmas. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. 2019, vol. 95, pp. 401–418.
91. Ncbi.nlm.gov. [online] *Candidatus* Phytoplasma solani [citat 9 Iunie 2019]. Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/69896/.
92. NEJAT, N., VADAMALAI, G. Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. In: *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2013, vol. 120, nr. 1, pp. 16–25.
93. NICOLAISEN, M. Status quo of the knowledge on phytoplasma with the focus on Euphorbia pulcherrima and other ornamental plants. Raport. [online]. 2001, pp.1–31, [citat 9 Iunie 2019]. Disponibil: http://cpvo.europa.eu/sites/default/files/documents/techreports/report_literature_study_phytoplasma.pdf
94. NISHIGAWA, H. et al. *In planta* expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. In: *Microbiology*, 2001, vol. 147, nr. 2, pp. 507–513.
95. OCHMAN, H., ELWYN, S., MORAN, N. A. Calibrating bacterial evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, vol. 96, nr. 22, pp. 12638–12643.
96. OKSAL, H. D. Natural phytoplasma infections on fruit, vegetable and weed plants at the same agroecosystem and their molecular properties. In: *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. vol. 48, nr. 2, 2020, pp. 615–625.
97. OLIVIER, C., DUMONCEAUX, T., PEREZ-LOPEZ, E. Sustainable Management of Phytoplasma Diseases in Crops Grown in the Tropical Belt Biology and Detection: Biology and Detection. Canada: Springer, 2019. 271 p. ISBN: 978-3-030-29649-0.
98. ORLOVSKIS, Z. et al. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. In: *Current Opinion in Insect Science*. 2015, vol. 9, pp. 16–23.
99. ORLOVSKIS, Z. *Role of phytoplasma effector proteins in plant development and plant-insect interactions*. PhD. 2017, pp. 41.
100. OSHIMA, K. et al. Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. In: *PLoS One*. 2011, vol.6, nr. 8, pp. 1-9.

101. OSHIMA, K. et al. Molecular mechanisms of plant manipulation by secreting effectors of phytoplasmas. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2023, vol. 125, pp. 1–6.
102. OSHIMA, K. et al. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. In: *Nature Genetics*. 2004, vol. 36, pp. 27 – 29.
103. OSHIMA, K. et al. Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus* Phytoplasma asteris. In: *Molecular Plant Pathology*. 2007, vol. 8, pp. 481–489.
104. OSHIMA, K. Molecular biological study on the survival strategy of phytoplasma. In: *Journal of General Plant Pathology*. 2021, vol. 87, pp. 403-407.
105. OSHIMA, K., MAEJIMA, K., NAMBA, S. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. In: *Frontiers in microbiology*. 2013, vol. 4, pp. 1–8.
106. PARMESSUR, Y., ALJANABI, S., SAUMTALLY, S., DOOKUN-SAUMTALLY, A. *Sugarcane yellow leaf virus* and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. In: *Plant Pathology*. 2002, vol. 51, pp. 561–566.
107. PRACROS, P. et al. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006, vol. 19, nr. 1, pp. 62–68.
108. 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.
109. QUAGLINO, F. et al. *Candidatus* Phytoplasma solani. [online]. 2013, pp.1-7. Disponibil: http://download.ceris.purdue.edu/file/3312. [citat 6 Iunie 2018].
110. RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998, vol. 62, nr.4. pp. 1094–1156.
111. Recolta [online]. Stolburul solanaceelor- virus păgubitor în culturile de tomate. ardei, cartofi și vinete [citat 30 Iunie 2019]. Disponibil: http://www.recolta.eu/arhiva/fitopatologie-stolburul-solanaceelor-virus-pagubitor-in-culturile-de-tomate-ardei-cartofi-si-vinete-11529.html
112. RICHTER, M., ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009, vol.106, nr. 45, pp. 19126–19131.
113. RICKER, N., QIAN, H., FULTHORPE, R. R. The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution. In: *Genomics*. 2012, vol. 100, nr. 3, pp. 167–175.

114. RIVERA-TAPIA, J. A., CEDILLO-RAMÍREZ, M. L., JUÁREZ, C. G. Some biological features of mollicutes. In: *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2002, vol. 44, nr. 2, pp. 53–57.
115. ROMANAZZI, G. et al. Induction of resistance in the control of phytoplasma diseases. In: *Petria*. 2009, vol. 19, nr. 3, pp. 113–129.
116. Rp5 [online]. Arhiva meteo în Chișinău [citat 20 mai 2021]. Disponibil: https://rp5.md/Arhiva_meteo_%C3%AEn_Chi%C5%9Fin%C4%83u
117. SANCHEZ-ROJO, S. et al. Salicylic acid protects potato plants-from phytoplasma-associated stress and improves tuber photosynthate assimilation. In: *American Journal of Potato Research.* 2011, vol. 88, pp. 175–183.
118. SCHNEIDER, B. et al. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. In: *Journal of General Microbiology*. 1993, vol. 139, pp. 519–527.
119. SEEMÜLLER, E. et al. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. In: *Journal of Plant Pathology*. 1998, vol. 80, nr. 1, pp. 3–26.
120. SESIA, P. Testarea OMG. Cluj- Napoca: Bioflux. 2009, 100 p, ISBN 978-606-92029-5-1.
121. SINCLAIR, W.A. et al. Detection of ash yellows mycoplasma like organisms in different tree organs and in chemically preserved specimens by a DNA probe vs. DAPI. In: *Plant Disease*. 1992, vol. 76, nr. 2, pp. 154-158.
122. SMART, C. D. et al. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. In: *Applied and environmental microbilology*. 1996, vol. 62, nr. 8, pp. 2988–2993.
123. SOUFI, Z. *Molecular detection and identification of phytoplasmas in sugarcane in Hawaii, Thailand, Cuba and Near East*. PhD. 2012, pp. 6.
124. STROHMAYER, A. et al '*Candidatus* Phytoplasma mali' genome encodes a protein that functions as an E3 ubiquitin ligase and could inhibit plant basal defense. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2019, vol. 32, nr. 11, pp. 1487–1495.
125. SUGIO, A. et al. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. In: *Annual Review of Phytopathology*. 2011, vol. 49, pp.175-195.
126. SUGIO, A., DUBREUIL, G., GIRON, D., SIMON, J.C. Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. In: *Journal of Experimental Botany*. 2015, vol. 66, nr. 2, pp.467–478.
127. SUGIO, A., HOGENHOUT, S. A. The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. In: *Current Opinion in Microbiology*. 2012, vol. 15, nr. 3, pp.247–254.

128. SUZUKI, S. et al. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, vol. 103, nr. 11, pp. 4252–4257.
129. TAN C. M. et al. Accelerating complete phytoplasma genome assembly by immunoprecipitation-based enrichment and MinION-based DNA sequencing for comparative analyses. In: *Frontiers in Microbiology*. 2021, vol. 12, pp. 1–15.
130. TOMKINS, M. et al. A multi-layered mechanistic modelling approach to understand how effector genes extend beyond phytoplasma to modulate plant hosts, insect vectors and the environment. In: *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, vol. 44, pp. 39–48.
131. TRIVELLONE, V., DIETRICH, C. H. Evolutionary diversification in insect vector–phytoplasma–plant associations. In: *Annals of the Entomological Society of America*. 2021, vol. 114, nr. 2, pp. 137–150.
132. TSITSIGIANNIS, D. et al. Major diseases of tomato, pepper and eggplant in greenhouses. In: *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. 2008, vol. 2, nr. 1, pp. 107-124.
133. USTA, M., GÜLLER, A., DEMIREL, S. Molecular identification of '*Candidatus* Phytoplasma solani' using *secY* and *vmp1* genes in tomato plants from Van province. In: *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Journal of Agricultural Sciences.* 2021. vol. 31, pp. 951–960.
134. WANG, K. *Molecular detection and identification of phytoplasmas and establishment of phytoplama-free clonal plants*. MS. 1997, pp. 2, 18.
135. WANG, K., HIRUKI, C., YEH, F. Molecular evolution of phytoplasmas based on polymorphysms in the 16S rRNA genes and the 16/23S spacer rigions. In: *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2003, vol.79, nr. 6, pp.155–162.
136. WANG, L. et al. Identification of RNA silencing suppressor encoded by wheat blue dwarf (WBD) phytoplasma. In: *Plant Biology*. 2021, vol. 23, nr. 5, pp. 843–849.
137. WANG, N. et al. Phytoplasma effector SWP1 induces witches' broom symptom by destabilizing the TCP transcription factor BRANCHED1. In: *Molecular Plant Pathology*, 2018, vol. 19, nr. 12, pp. 2623–2634.
138. WATERWORTH, H. E., MOCK, R. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germ plasm. In: *Plant Disease*. 1999, vol. 83, nr.11, pp. 1047–1050.
139. WEI, W, ZHAO, Y. Phytoplasma taxonomy: nomenclature, classification, and identification. In: *Biology*. 2022, vol. 11, nr. 8, pp. 1–23.

140. WEI, W. et al. An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. In: *Phytopathology*. 2004, vol. 94, nr. 7, pp. 683–686.
141. WEINTRAUB, P.G., WILSON, M.R. Control of Phytoplasma Diseases and Vectors. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. UK: CABI. 2010, pp. 233–250, ISBN : 978-1-84593-530-6.
142. WONGKAEW, P., FLETCHER, J. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. In: *Plant Cell Reports*. 2004, vol. 23, pp. 426–434.
143. WU, W. et al. Identification of two new phylogenetically distant phytoplasmas from *Senna surattensis* plants exhibiting stem fasciation and shoot proliferation symptoms. In: *Annals Applied Biology*. 2012, vol. 160, nr. 1, pp. 25–34. doi: 10.1111/j.1744-7348.2011.00517.x
144. 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.
145. ZAMORANO, A., FIORE, N. Draft genome sequence of 16SrIII-J phytoplasma, a plant pathogenic bacterium with a broad spectrum of hosts. In: *Genome Announcements*. 2016, vol. 4, nr. 3, pp. 1–2.
146. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A**. Identification of stolbur phytoplasma in tomato in Moldova. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2022, vol. 12, nr. 2, pp. 151–154.
147. 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. Chișinău: "Print-Caro" SRL, 2020, pp. 359–363. ISBN 978-9975-3472-0-4.
148. ZAMORZAEVA, I., **BAHSIEV, A**., MIHNEA, N. Spread of stolbur in some tomato varieties and indicators of their productivity. In: *SCIENTIFIC PAPERS-SERIES B-HORTICULTURE*. 2020, vol. 64, nr. 2, pp. 273–278.
149. 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.
150. 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.
151. ZOVKIĆ, T. *Molecular characterization of 'Candidatus Phytoplasma solani' isolates from periwinkle (Catharanthus roseus (L.) G. Don) of the Zagreb area*. PhD. 2014, pp. 10

152. **БАХШИЕВ, А.**, ЗАМОРЗАЕВА, И., МИХНЯ, Н. Молекулярная диагностика заражения некоторых молдавских сортов томата фитоплазмой. In: *Овощи России*. 2020, vol. 4, pp. 3–7.
153. БОГОУТДИНОВ, Д.З., КАСТАЛЬЕВА, Т.Б., ГИРСОВА, Н.В. Фитоплазменные болезни – серьезная опасность для растениеводства России. Обзор. In: *Таврический вестник аграрной науки*. 2018, vol. 2, nr. 14, pp. 15–34.
154. ВЛАСОВ, Ю.И., САМСОНОВА, Л.Н. Об устойчивости томатов к фитоплазменному заболеванию столбуру. In: *Вестник защиты растений*. 2000, vol. 2, pp. 26–28.
155. ЖУЧЕНКО, А.А. и др. Дикие виды и полукультурные разновидности томатов и использование их в селекции. Кишинев: *Картя Молдовеняскэ*, 1974. С. 203.
156. МУГОЛ ХАН, Г. Н., МАЗУРИН, Е. С., ЗАЕЦ, В. Г. Фитоплазмы: проблемы их выявления и идентификации. *Теоретические и прикладные проблемы АПК*. 2013, vol. 4, pp. 21–25.

ANEXE

ANEXA 1. Secvențele specifice ale genei ribozomale '*Ca*. P. solani'

Rezultatul secvențierii probei 1 (BLAST)

AAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGG
TAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTCGAACGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGA
GGAAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTT
TTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAACGCTCAAC
GTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCGTGT
GTAGTGGTAAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAAGCGAAGGCGGCTTGCTGGG
TCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACA
TTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAC
TCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGT
CTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGGAGGTTATCAGAAGCACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAATGATAAATTG
GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGA
TACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCTTCTGGCGAATCTCAAAAAAGCA
GTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCA

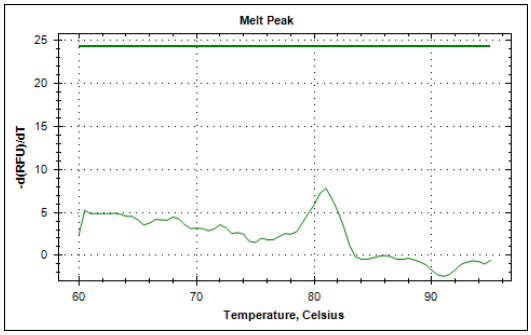
Rezultatul secvențierii probei 9 (BLAST)

AGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGT
AATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTCGAACGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAG
GAAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTT
TATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGTACCTAATGAATAAGCCCC
GGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAACGCTCAACG
TTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCGTGTG
TAGTGGTAAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGT
CTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACAT
TAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACT
CCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTC
TTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGGAGGTTATCAGAAGCACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAATGATAAATTGG
AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGAT
ACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCTTCTGGCGAATCTCAAAAAAGCA
GTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGA

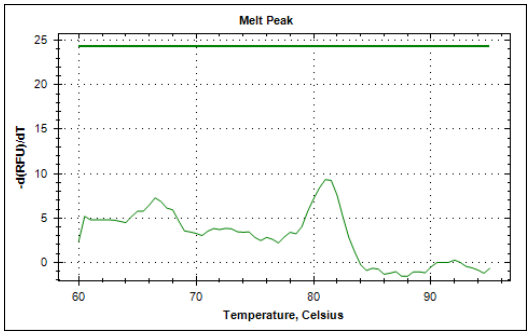
Rezultatul secvențierii probei 19 (BLAST) 1134 bp

TAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGT
GGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTCGAACGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGG
CAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTACGT
AAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGTACCTAAT
GAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCG
TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATAGAGG
CAAGTGGAATTCCGTGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAA
GCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATA
AAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTA
TGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTC
GAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATA
CAGTGGAGGTTATCAGAAGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAGTT
GGGGACTTTAGCAAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAA
TCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGT
AGCTAAAGCGTAAGCTTCTGGCGAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGT
CTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTA

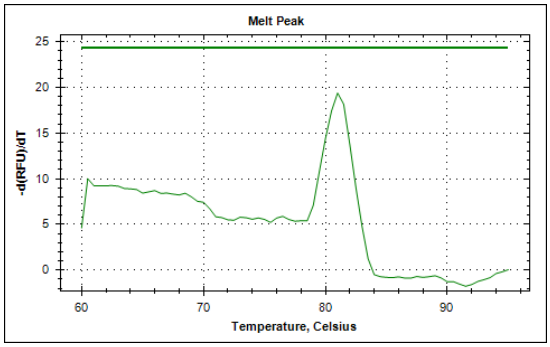
Anexa 2. Rezulatele testării primerilor n65-n66 pentru analiza *Real-Time* PCR



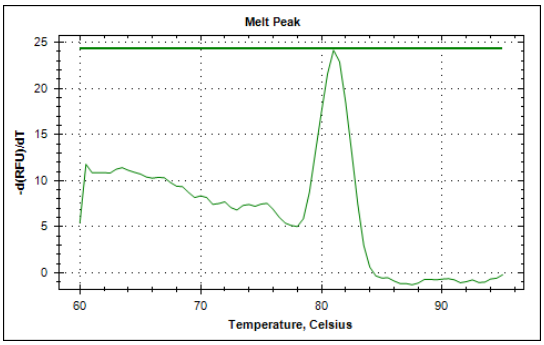
ADN 1/50 4 ml primer



ADN 1/500 4 ml primer



ADN 1/50 8 ml primer



ADN 1/500 8 ml primer

Anexa 3. Analiza moleculară a plantelor ruderale la prezența '*Ca*. P. solani'

Specia de plantă	Nr. de plante	Organ	Metoda de izolare a ADN-ului	Prezența infecției
Daucus corota	27	tulpina	Expres; K-acetat; DNAzol	-
Urtica dioca	20	tulpina	Expres	-
Convolvulus arvensis	21	tulpina	Expres; K-acetat; DNAzol	+
Artemisia vulgaris	20	tulpina	Expres;DNAzol	-
Potentilla reptans	24	frunze	Expres; DNAzol	-
Solanum nigrum	14	tulpina	Expres; K-acetat	+
Polygonum aveculare	8	tulpina	Expres	-
Polygonum convolvulus	12	frunze	Expres	-
Castygela sepium	12	frunze	K-acetat	-
Sonchus oleraceus	6	tulpina	Expres	-
Chemopodium album	12	frunze	K-acetat	-
Setaria viridis	12	frunze	K-acetat	-

Anexa 4.Temperatura și cantitatea de precipitații medii în perioada de vegetație 2018, 2019 și 2020

A. Temperatura medie pe parcursul sezoanelor de vegetație 2018, 2019 și 2020 [116]

Anul / Luna	2018	2019	2020
Iulie	22,2	22,1	23,2
August	24,6	23,8	23,5
Septembrie	17,9	18,6	20,3
Sumar	21,56	21,5	22,33

B. Precipitațiile medii în decursul perioadelor de vegetație 2018, 2019 și 2020 [116]

Anul / Luna	2018	2019	2020
Iulie	756,7	758,5	761,3
August	761,9	761,8	761,4
Septembrie	763,6	763,3	763,7
Sumar	760,73	761,2	762,1

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, Aighiuni BAHȘIEV, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări şi realizări ştiinţifice. Conştientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecinţele în conformitate cu legislaţia în vigoare.

Data: ***10.08.2024***

Bahsiev A.

Aighiuni BAHȘIEV

DIPLOME ȘI DISTINCȚII

MINISTERUL EDUCAŢIEI, CULTURII ŞI CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

MD-2009, Chişinău
str. A. Mateevici, 60
tel: (+373-22) 24-48-21, fax: 24-42-48
www.usm.md, email: rector@usm.md

MINISTRY OF EDUCATION, CULTURE AND RESEARCH OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA

MOLDOVA STATE UNIVERSITY

MD-2009, Chisinau
A. Mateevici str. 60
tel: (+373-22) 24-48-21, fax: 24-42-48
www.usm.md, email: rector@usm.md

08.06.2023 Nr 508c

ACT DE IMPLEMENTARE A REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE

Prin prezenta se confirmă că rezultatele investigațiilor științifice realizate în cadrul tezei de doctor în științe biologice „Diagnosticul molecular al fitoplasmei la diferite soiuri de tomate autohtone" a d-nei BAHȘIEV Aighiuni au fost implementate în cadrul lucrărilor practice la disciplina „*Tehnici de cercetare în biologia moleculară*", ciclul II la Departamentul Biologie și Ecologie, Facultatea Biologie și Geoștiințe a Universității de Stat din Moldova. Rezultatele obținute în baza tezei de doctorat au servit drept suport metodologic pentru unitățile de conținut „Metode de analiză a acizilor nucleici. Tehnica PCR".

Prodecan: ELENCIUC Daniela, dr., conf. univ.


CERTIFICATE
OF ATTENDANCE
This is to certify that
participated in
25TH IUBMB
46TH FEBS
15TH PABMB
2022
9-14 JULY
LISBON PORTUGAL
Graça Soveral
Congress co-chair
Miguel Castanho
Congress co-chair


Molecules of Life: Towards New Horizons
HDBMB
Certificate of Attendance
This is to certify that
Aighiuni Bahsiev
has attended
FEBS 2021
THE 45TH FEBS CONGRESS
3-8 JULY 2021
LJUBLJANA SLOVENIA
Virtual
Václav Pačes
FEBS Secretary General
Janko Kos
Congress Chair



THE 20TH FEBS YOUNG SCIENTISTS' FORUM

15 - 18 JUNE 2021

This is to certify that

Aighiuni Bahsiev

has attended

FEBS 2021

YSF20

CROATIA SLOVENIA

Irene Díaz-Moreno

Chair of the FEBS Working Group
on the Careers of Young Scientists

Maja Katalinic

Chair of the 20th YSF
Organizing Committee

Virtual

Euroleague FOR LIFE SCIENCES

UNIVERSITY OF HOHENHEIM

ELLS Summer University 2021

"Pathogens, Parasites and their Hosts: Ecology, molecular interactions and evolution"

Online
July 11 - 29, 2021

This is to certify that

Aighiuni Bahsiev

has actively and successfully participated in the 21 days online summer school "Pathogens, Parasites and their Hosts - Ecology, molecular interactions and evolution" organised by the University of Hohenheim (UHOH) on behalf of the Euroleague for Life Sciences (ELLS)[1]. The programme consisted of lectures, virtual lab courses and a seminar. The participants had to prove their knowledge and understanding of the topics in a final session by presentation of their results and subsequent discussion and by preparation of a paper on a course-related topic.

ECTS-grade obtained:

B+

The grading system is explained on the reverse side.

By successfully participating the student has been credited 7.5 ECTS.

Hohenheim, 04.10.2021

Dr. Thomas Romig
(Course Coordinator)



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII
AL REPUBLICII MOLDOVA

DIPLOMĂ
DE ONOARE

SE ACORDĂ

doamnei Aighiuni BAHȘIEV,

doctorandă, cercetător științific stagiar,
Institutul de Genetică,
Fiziologie și Protecție a Plantelor,
în semn de înaltă recunoștință și apreciere a
activității prodigioase în domeniul cercetării
și inovării și cu prilejul Zilei Internaționale
a Femeilor și Fetelor din domeniul Științei.

Ministru **Anatolie TOPALĂ**

2023

WORLD FEDERATION OF SCIENTISTS

THE PRESIDENT

Ms. Aighiuni Bahsiev
State University of Moldova
Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection
Chisinau, Republic of Moldova

Geneva, 1st June 2023

Concerns: Moldovan Scholarship Programme

Dear Ms. Bahsiev,

Following the recommendation made by Professor Gheorghe Duca, National Representative of the World Federation of Scientists in Moldova, I have the pleasure of granting you a one-year scholarship to conduct research under the direct supervision of Professor Irina Zamorzaeva at the Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, Chisinau. The topic of your research, related to the WFS Planetary Emergency "Food", will be "*Monitoring the spread of "Candidatus Phytoplasma solani" on tomatoes, apples and some host plants".*

The scholarship will amount to 150 Swiss Francs per month and will be paid to you every two months against receipt. Please note that we must receive the following for the continuation of the scholarship:

1) A copy of this letter signed by you.
2) Signed receipts every two months.
3) An interim report after six months and a final report at the end of the scholarship.

Wishing you success with your research work, I remain,

Yours sincerely,

Professor Antonino Zichichi
President

Enclosures: Basic Rules & Guidelines and Receipt Form

Main centres:
ESTONIA – EE0010 TALLIN – 10 Rävala Boulevard – Tel: +372/2/441304 – Fax: +372/2/440640 – E-mail: *rebanek@park.tartu.ee*
GEORGIA – 300008 TBILISI – 52 Rustaveli Avenue – Tel: +995/32/998891 – Fax: +995/32/998823 – E-mail: *lado@acad.acnet.ge*
LITHUANIA – 232600 VILNIUS – 3 Gediminio Avenue – Tel: +3/702/613651 – Fax: +3/702/618464 – E-mail: *tmkc.plls@wllb.lt*
MEDITERRANEAN area – FCCSEM, I 91016 ERICE – 26 Via Guarnotta – Tel: +39/0923/869133 – Fax: +39/0923/869226 – E-mail: *fiorella.ruggiu@ccsem.infn.it*
PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA – BEIJING – 52 Sanlihe Road – Tel: +86/1/8597701 – Fax: +86/1/8511095
RUSSIA – 123182 MOSCOW – Ulitsa Kurchatova 46 – Tel: +7/095/1969241 – Fax: +7/095/9430074
UKRAINE – 252054 KIEV – 32-A Str. Turguenevskaya – Tel: +380/44/2167012 – Fax: +380/44/2167012
USA – Columbia University in the City of New York, NY 10027 NEW YORK – 538 West 120th Street – Tel: +1/212/8543339 – Fax: +1/212/9323169
CH-1211 GENEVA 23, Switzerland – Tel: +41/22/7677755 – Fax: +41/22/7850219 – E-mail: *info@federationofscientists.org*
Sections in the following countries:
ALGERIA • ARGENTINA • BELARUS • BELGIUM • BULGARIA • BURKINA FASO • CANADA • CHILE • CHINA • COLUMBIA • CZECH REPUBLIC
DENMARK • EGYPT • ESTONIA • FINLAND • FRANCE • GERMANY • GREECE • HUNGARY • INDIA • ISRAEL • ITALY • JAPAN • JORDAN
KENYA • KOREA • LITHUANIA • NIGERIA • PAKISTAN • POLAND • PORTUGAL • REPUBLIC OF GEORGIA • ROMANIA • RUSSIA • SLOVENIA SPAIN
SWEDEN • SWITZERLAND • THE NETHERLANDS • TUNISIA • TURKEY • UK • UKRAINE • USA • VIETNAM

XI[th] INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICISTS AND BREEDERS FROM THE REPUBLIC OF MOLDOVA

SAGBRM

IGPPP

75 UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

MRDA

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

Aighiuni BAHSIEV

Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection, Republic of Moldova

Academician Maria DUCA

President of the Scientific Association of Geneticists and Breeders of the Republic of Moldova

June 15-16, 2021 | Chisinau, Republic of Moldova


BACĂU COUNTY COUNCIL
"ION BORCEA" NATURAL SCIENCE
MUSEUM COMPLEX OF BACĂU, ROMANIA
CERTIFICATE
This is to certify that
DRD. BAHSIEV AIGHIUNI
participated in the 21st edition of
"BIOLOGY AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT"
Symposium held online, in Bacău, Romania, on November 23, 2023.
"ION BORCEA" NATURAL SCIENCE
MUSEUM COMPLEX BACĂU, ROMANIA
Manager,
Dr. GABRIELA GURĂU

The IX-th International School of Molecular Genetics
for Young Scientists
"GENOMICS IN XXI CENTURY: FROM GENOME STUDY TO GENETIC TECHNOLOGY"

CERTIFICATE

AIGHIUNI G. BAHSIEV

**has attended the following lectures:
general and functional genomics,
genomic studies and genetic technology,**

**The lectures were held in the online conference mode
from March 15th through 19rd of 2021.
They were organized by the Institute of Molecular Genetics of the
National Research Center "Kurchatov Institute"**

On behalf of the Organizing Committee
Moscow, Russia, March, 19, 2021

*Director of Institute of
Molecular Genetics of the
National Research Center
"Kurchatov Institute"*

*Sergey V. Kostrov
Corresponding member of
the Russian Academy of Sciences,
Professor*

IGFPP

INSTITUTE OF GENETICS, PHYSIOLOGY AND PLANT PROTECTION

Certificat of Attendance

Bahşiev Aighiuni
Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection

Has attended the
INTERNATIONAL SCIENTIFIC SYMPOSIUM
(Vth Edition)

"ADVANCED BIOTECHNOLOGIES – ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS"

Chairman of the Organizing Committee *Andronic Larisa*

Chisinau, Republic of Moldova, October 21-22, 2019

INSTITUTE OF GENETICS, PHYSIOLOGY AND PLANT PROTECTION

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR BIOLOGICAL CONTROL OF NOXIOUS ANIMALS AND PLANTS

MINISTRY OF EDUCATION, CULTURE AND RESEARCH OF REPUBLIC OF MOLDOVA

CERTIFICATE

Confirms that

Bahsiev Aighiuni

has participated at the International Scientific Symposium

„Plant Protection – Achievements and Prospects"

27-28 October 2020, Chisinau, Republic of Moldova

Chairman of the Organizing Committee ***Vladimir TODIRAS Grand PhD***

The VIII-th International School
of Molecular Genetics
for Young Scientists
"GENETIC ORGANIZATION AND MOLECULAR MECHANISMS OF FUNCTIONING OF LIVING SYSTEMS"

CERTIFICATE

Bahsiev Aighiuni

has attended the following lectures:
general and functional genomics,
cellular enzyme systems and their regulation,
genetic modification and editing of living systems, and
the basics of biotechnology and bioinformatics.

The lectures were held in Zvenigorod (Moscow Region, Russia) from November 19th through 23rd of 2018.
They were organized by the Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences and the National Research Center «Kurchatov Institute» and supported by the
Russian Foundation for Basic Research,
Charity Foundation «Future of Molecular Genetics»,
and Dia-M company.

On behalf of the Organizing Committee
Moscow, Russia, November, 23, 2018

Vice-President of
the Organizing Committee

Sergey V. Kostrov
Corresponding member of the Russian Academy of Sciences

Vice-President of
the Organizing Committee

Svetlana A. Limborska
Head of Department of Molecular basis of human genetics of IMG RAS
Professor, Ph.D., D.Sci.

CURRICULUM VITAE



Informații personale: Bahșiev Aighiuni
Adresa: Negruzzi 5/2, ap.87, MD-2001, Chișinău (Moldova)
Telefon: +37378937676
Data nașterii: 1 octombrie 1993
Email: aighiuni.bahsiev@gmail.com
Naționalitatea: MD

Studii superioare:

- 2012-2015 – Studii de licență în Științe ale naturii, specialitatea Biologie moleculară Universitatea de Stat din Moldova.
- 2015-2017–Studii de masterat în Științe Biologice Aplicate, Universitatea de Stat din Moldova.
- 2018-2022–Studii doctorale, Universitatea de Stat din Moldova, specialitatea Genetica vegetală.

Stagii:

- 12.07.21-30.07.2021 – Școala de vară. Patogeni, Paraziți și a lor Gazde: Ecologia, Interacțiuni Moleculare și Evoluție. Universitatea Hohenheim, (Germania). Online.
- 15.03.21-19.03.2021 – Școală Internațională de Genetică Moleculară pentru Tineri Cercetători (ediția a-IX – a). Moscova, Rusia, Online
- 19.11.18-23.11.18 – Școala Internațională de Genetică Moleculară pentru tinerii cercetători (ediția a-VIII – a), Zvenigorod, Rusia.
- 29.07.17-12.08.17 – Școala de vară ”Genetic- Working with DNA”, Universitatea Aydin, Istanbul, Turcia.
- 5.07.16-14.07.16 – Școala de vară ,,Biotehnologie în agricultură, Agrobiotech-2016”, Universitatea Agrară de Stat din Rusia, K.A. Timireazev, Moscova, Rusia.
- 22 Iunie 2016 – Marie Skłodowska-Curie Actions, from association to participation, Chișinău, Moldova.
- 15.12.2016-19.12.2016 – Curs de formare ,,Parctici de cercetare", UnAȘM, Chișinău, Moldova.
- 20.09.15-24.09.15 – Școala de toamnă Moldo-Japoneză în domeniul Nanotehnologiilor şi Ingineriei Biomedicale Universitatea Tehnică a Moldovei, Chişinău, Republica Moldova.

Activatea profesională:

- Iulie 2014-August 2015 – Biolog categoria a treia, laboratorul Genomica, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, Republica Moldova.
- August 2015-Decembrie 2023 – Cercetător științific stagiar, Laboratorul Genetica moleculară, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, Republica Moldova.
- Ianuarie 2023-Prezent – Cercetător științific, Laboratorul Genetica moleculară, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova.

Participări în proiecte naționale și internaționale:

- **Subprogramul 011101.** Abordări genetice și biotehnologice de management al agroecosistemelor în condițiile schimbărilor climatice. 2024.

- **20.80009.5107.11.** Conservarea *ex situ* de lungă durată a resurselor genetice vegetale în Banca de gene cu utilizarea metodelor moleculare în testarea stării de sănătate a germoplasmei vegetale. 2020-2023.
- **19.80013.51.07.10A/BL.** Analiza complexă a acumulării micotoxinelor în produse alimentare pe parcursul depozitării. 2020.
- **18.80013.5107.05. STCU/6378.** Elaborarea tehnicii noi de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă. 2018-2019.
- **17.80013. 5107.11/6225STCU.** Monitoringul molecular al celor mai importante boli fungice şi bacteriene în livezile de meri din Moldova. 2017-2019.
- **17.80013.5107.08/Ua.** Diagnosticul maladiilor rădăcinii grăului. 2015-2018.
- **15.817.05.10F.** Tehnologii de diagnostic molecular al fitopatogenilor. 2015-2018
- **11.817.04.03F.** Cercetări genetico-moleculare ale genomurilor plantelor de cultură cu caractere valoroase în ameliorare 2011-2014.

Distincții:

- Diploma de Onoare a Ministerului Educației și Cercetării a Republicii Moldova. 2023.
- Bursa Federației Mondiale a Savanților în domeniu alimentare pentru anul 2023-2024.
- Bursa Guvernului pentru studenții pentru anul 2022.
- Bursă de participare Congresul *IUBMB–FEBS–PABMB* (Summitul Global al Biochimiștilor), 9-14 iulie 2022, Lisabona, Portugalia.
- Bursă de participare la 20–lea FEBS Forum al Tinerilor Cercetători 1-4 iulie 2020, (amânat 30iunie – 3iulie 2021), Lovran, Croația
- Bursa de mobilitate ,,Mircea Ciuhrii", 2017.
- Premiul IGFPP pentru promovarea rezultatelor, 2016.
- Premiul Municipal pentru Tineret în domeniul Biologie, 2016.
- Grant pentru participare la Școala de vară ,,Biotehnologii în agricultură, Agrobiotech-2016", Moscova, Rusia.

Participări la forururi științifice (naționale și internaționale):

2023

- Simpozionul "*Biologia şi dezvoltarea durabilă*", 23-24 noiembrie 2023, Bacău, România.
- Conferința Națională cu participare internațională „*Științele naturii în dialogul generațiilor*", 14-15 septembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova.

2022

- Congresul *IUBMB–FEBS–PABMB*, 9-14 iulie 2022. Lisbona, Portugalia.
- Conferința națională cu participare internațională "*Științele vieții în dialogul generații: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri*", 29-30 septembrie 2022, Chișinău, Republica Moldova.

2021

- Congresul Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova , ediția a XI, 15-16 iunie 2021. Chișinău, Republica Moldova.
- The 45th FEBS Congress "*Molecules of Life: Towards New Horizons*", 3-8 iulie 2021. Ljubljana, Slovenia – Online.
- The 20th FEBS Young Scientists Forum. 15-18 iunie 2021. Croația – Online.

2020

- Simpozion internațional științific "*Protecția Plantelor – Perspective și Realizări*", Octombrie 27-28, 2020. Chișinău, Republica Moldova.
- The Conferința Internațională "*Agriculture for Life, Life for Agriculture*", Secțiunea a-2 Horticultură. București, România, 4-6 iunie 2020.

2019

- Conferința Internațională "*Agrophysics Trends: from actual challenges in arable farming and crop growing towards advanced technologies*", ediția a II-a, Saint-Petersburg, Russia, 2-4 octombrie 2019.
- Simpozionului Științific Internațională "*Biotehnologii avansate - realizări și perspective*" (Ediția a V-a). 21-22 octombrie 2019.

2018

- Conferința științifice internaționale "*Protecția Plantelor în Agricultura Convențională și Ecologică*". 11 -12 decembrie 2018.
- Conferinței științifico-practice internaționale "*Aspecte inovative în ameliorarea culturilor agricole*". Pașcani, Republica Moldova, 2018.

2017

- Conferință științifică internațională "*Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor*", ediția a-VI, 9-10 octombrie 2017, Chișinău, Republica Moldova.
- Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, ediția a XXI-a, Universității de Stat din Moldova, 4-5 mai 2017. Chișinău, Republica Moldova.
- Conferința Științifică a Studenților și Masteranzilor cu genericul "*Viitorul ne aparține*", ediția a VII-a, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, 27 aprilie 2017. Chișinău, Republica Moldova
- Conferința municipală științifico-practică "*Tendințe moderne de dezvoltare a abilităților sociale umane*". Ediția a V-a, 2017. Chișinău, Republica Moldova.

2016

- Sesiunea națională de comunicări științifice studențești, ediția a XX-a, etapa a I-a, cu prilejul aniversării a 70 de ani de la fondarea Universității de Stat din Moldova, 2016. Chișinău, Republica Moldova
- Conferința Științifică a Studenților și Masteranzilor cu genericul "*Viitorul ne aparține*", ediția a VI-a, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, 21 aprilie 2016. Chișinău, Republica Moldova
- Conferința Națională cu Participare Internațională "*Științele vieții în dialogul generații: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri*". Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Chișinău, 2016. Chișinău, Republica Moldova

Lucrări științifice și științifico-metodologico publicate: 39 lucrări științifice (inclusiv 18 de monoautor): 9 articole în baza de date Scopus și Web of Science.

Cunoașterea limbilor: limba română-limba maternă, limba rusă-excelent, limba engleza-mediu.

Date de contact de serviciu: Laboratorul Genetica moleculară, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor. Adresa str. Pădurii, 20, MD-2002, Chișinău, Republica Moldova, tel. +373 77-04-47.

Bahnia A.