UDC: 582.28:633.853.74 https://doi.org/10.53040/gppb8.2024.05

IDENTIFICAREA MOLECULARĂ A SPECIILOR DE *FUSARIUM* ÎN SEMINȚE DE SUSAN (*SESAMUM INDICUM* L.*)*

Belousova Galina*, *https://orcid.org/0000-0002-9977-1248*
Mogîlda Anatolii, *https://orcid.org/0000-0001-9159-6038*
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova
**e-mail*: *galina.belousova@sti.usm.md*

Summary. The research focused on the identification of pathogenic fungi of the genus Fusarium in sesame seeds. To evaluate the spectrum of pathogens in seeds, molecular analysis based on nested-PCR was performed. Twelve samples of DNA extracted from sesame seeds obtained under field conditions were analyzed. The analysis revealed the presence of Fusarium spp. in 11 DNA samples tested. Discrimination analysis of 4 pathogen species was performed: *F. culmorum, F. equiseti, F. nivali, F. avenaceum.* The species *F. culmorum* and *F. équiseti* were identified in six samples. The pathogenic fungi *F. nivali* and *F. avenaceum* were not identified in the analyzed samples.

Keywords: *Fusarium spp.,* nested polymerase chain reaction, *F. culmorum, F. equiseti.*

Introducere

Susan (lat. *Sesamum*) – genul de plante ierboase cu înalțimea de pînă la 2 metri, care aparțin familiei de plante angiosperme *Pedaliaceae*. Genul Sesamum L. unește 30 de specii de plante răspândite prin toată lumea care aparțin culturilor monocotiledonate foarte vechi și au fost cultivate cu mult timp înaintea erei noastre (1). Sesamum indicum (2n=26) este specia cea mai des cultivată din genul respectiv (Morris et al., 2021). Pe parcursul a mai multor secole semințele de susan erau componenta inalienabilă a medicinei tradiționale și a bucatelor. Uleiul de susan se caracterizează prin valoarea nutritivă înaltă și se utilizează în diferite domenii (2). Infecția fitopatogenă a susanului depinde de zona de cultivare, de condițiile meteorologice din anii de cultivare, de genotipul soiului sau al probei. Cultura de susan este afectată de mulți agenți patogeni, majoritatea fiind transmiși prin semințe, provocând alterări cantitative și calitative în materialul semințelor. Plantele obținute din semințe infectate cu agenți patogeni fungici nu numai că pot fi bolnave, ci pot servi și ca focare de infecție secundară. Ele devin purtători de boli, răspândindu-le în noi zone de creștere. Fuzarioza este o boală fungică distructivă care afectează cultura în diferite stadii de dezvoltare, în funcție de care duce fie la moarte, fie la scăderea randamentului roadei (3). A fost studiată infectarea a douăsprezece soiuri de semințe de susan din recolta 2022 cu fitopatogeni Fusarium spp. S-au efectuat experimente pentru a stabili tipul de agenți patogeni din genul Fusarium. Următoarele specii patogene au fost identificate prin nested-PCR : *F. equiseti, F. culmorum, F. nivale, F. avenaceum*.

Materiale și metode

Scopul lucrării a constat în identificarea agenților patogeni fungici în semințele de susan (*Sesamum indicum* L.) din douăsprezece probe: 1. Oro 9/7, 2. Dulce, 3. Cadet, 4. Delco, 5.VN 11 MC 1, 6. VN 11 MC 889, 7. K-1257, 8. Cubaneț 93, 9. Margo Tall, 10. Djerelo, 11. Zaltsadovzri, 12. Oro Shot. Folosind abordări moleculare, agenții patogeni *Fusarium* spp. au fost identificați. În studiul s-au folosit semințe de susan din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie, Protecția Plantelor al USM, recolta 2022. Pentru experiment au fost prelevate semințe sănătoase vizual, fără semne evidente de infecție. Pentru fiecare probă s-au cântărit 400 mg de semințe de plante de câmp

și s-a izolat ADN-ul utilizând tampon SDS (dodecil sulfat de sodiu) de 5%. Probele de ADN au fost testate folosind metoda moleculară nested-PCR cu primeri caracteristici pentru genul și speciile de agenți patogeni fungici. Produșii de amplificare au fost separați prin electroforeză în gel de agaroză, colorați cu bromură de etidiu și fotografiați sub lumină UV. Temperatura de reasociere pentru toți primerii din prima rundă a fost de 61°C, în a doua de 60°C. Metoda nested-PCR a contribuit la specificitatea și acuratețea studiului nostru. Pentru a atinge obiectivul propus, patogenii Fusarium spp. au fost determinați prin nested-PCR pe ADN de susan cu primeri complementari secvențelor: gena beta-tubulinei, gena F.equiseti - poliketide sintază (PKS13); F.avenaceum - gena factorului de alungire- translație finale 1-alfa; F.nivale – gena subunității ARN polimerazei II (RPB2), F. culmorum - gena factorului de alungire-translație 1-alfa din banca de nucleotide NCBI. Condițiile de amplificare și designul primerului sunt prezentate în tabel (Tabelul 1).

Tabelul 1

Secvențele nucleotidice a primerilor ADN pentru detecția fitopatogenilor și condițiile pentru amplificarea *nested* PCR

Denumirea patogenului	Nr. primerului	Runda/ Primer	Secvența 5'-3'	Nr. ciclurilor PCR
Fusarium spp.	1	1/fc 1/fc	fr. TCAGACCGGTCAGTGCGTAA rev. CCATCATGTTCTTGGGGTCGAA	32
	2	2/fc 2/fc	fr. AGCTGTCCAACCCCTCTTACG rev. CAGCGCGGAAAGAGTGAGC	30
F. equiseti	3	1/fqeq 1/fqeq	fr. GTCATCAACCCCGCCATACG rev. TCGAGGAAAATGGAAACCAACCT	33
	4	2/fqeq 2/fqeq	fr. GCCATACGTGGTGGGGTTAAT rev. ATCGAGGAAAATGGAAACCAACCT	34
F. culmorum	5	1/fcute 1/fcute	fr. CATCCCAACCCCGCCGATA rev. CGCGCCTAGGGAATGGTTTG	35
	6	2/fcute 2/fcute	fr. CGATACATGGCGGGGTAGTTT rev. ATGAGCCCCACCAGAAAAATTACG	34

Rezultate și discuții

Pentru a detecta Fusarium spp., a fost efectuată analiza nested-PCR pe douăsprezece mostre de semințe de susan din recolta anului 2022. Designul primerului pentru cele două runde de PCR este prezentat în Tabelul 1. Pentru prima rundă a fost utilizată perechea de primeri numărul unu, iar pentru a doua rundă a fost folosită perechea de primeri numărul doi. Rezultatele migrării ampliconilor obținuți în urma nested-PCR sunt prezentate în Fig. 1.

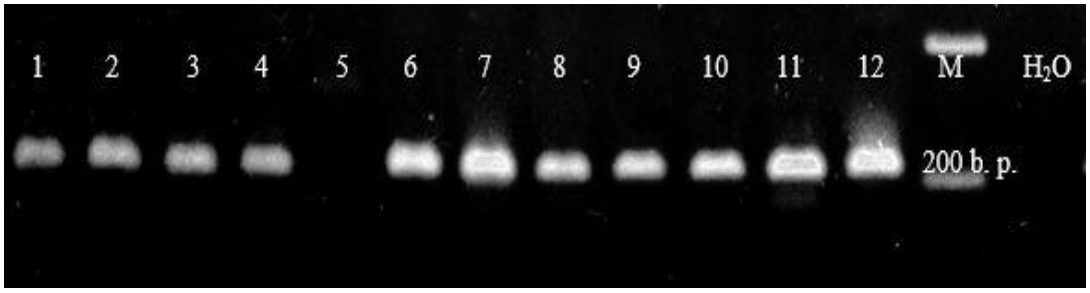


Figura 1. Electroferograma produselor *nested*-PCR cu primeri specifici pentru *Fusarium spp.* pe ADN-ul frunzelor de susan ale soiurilor: 1. Oro 9/7, 2. Dulce, 3. Cadet, 4. Delco, 5.VN 11 MC 1, 6. VN 11 MC 889, 7. K-1257, 8. Cubaneț 93, 9. Margo Tall, 10. Djerelo, 11. Zaltsadovzri, 12. Oro Shot, H_2O - control, Ladder - marker ADN 1kb. Banda de 204 bp în 11 eșantioane.

În electroferogramă, banda de 204 bp (față de markerul de 1 kb) corespunde mărimii așteptate a ampliconului pentru agenții patogeni *Fusarium* detectați folosind perechile de primeri

corespunzătoare din a doua rundă. Agenții patogeni *Fusarium* au fost detectați în 11 probe de ADN de susan examinate.

Fusarium equiseti a fost identificat folosind primeri din Tabelul 1 sub numărul 3 pentru prima rundă de PCR și sub numărul 4 pentru a doua rundă. Rezultatele celei de-a doua runde de PCR sunt prezentate în Fig. 2.

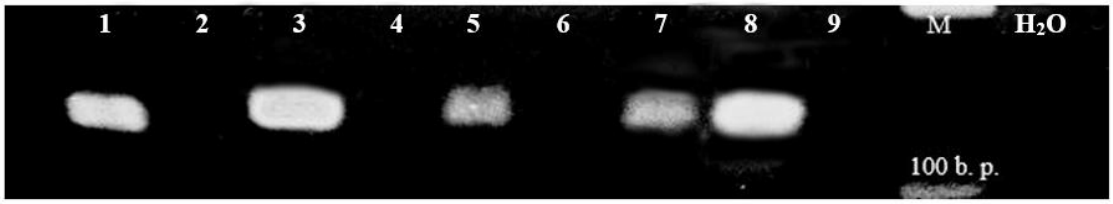


Figura 2. Electroferograma produselor *nested*-PCR cu primeri specifici pentru *Fusarium equiseti* pe baza ADN-ul din semințele de susan ale soiurilor 1. Cadet, 2. Delco, 3. VN 11 MC 889, 4. K-1257, 5. Cubaneț 93, 6. Margo Tall, 7. Djerelo, 8. Zaltsadovzri, 9. Oro Shot**.** H_2O-control, M- Marker *1kb ADN Ladder*. Lungimea produsului de amplificare 138 p. b.

Pe electroferograma s-au evidențiat benzi de 138 bp pentru 5 probe. Mărimea ampliconului corespunde mărimii pentru perechea de primeri din a doua rundă utilizată în nested-PCR.

Fusarium culmorum a fost detectat cu primerii numărul 5 pentru prima rundă și numărul 6 pentru a doua rundă. Produsele de amplificare sunt prezentate în Fig. 3.

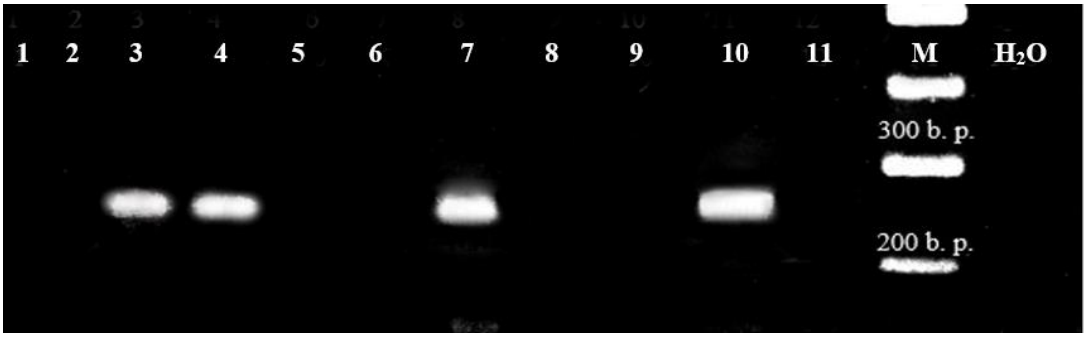


Figura 3. Electroferograma produselor *nested*-PCR cu primeri specifici pentru *Fusarium culmorum* pe baza ADN-ul din semințele de susan ale soiurilor: 1. Oro 9/7, 2. Dulce, 3. Cadet, 4. Delco, 5. VN 11 MC 889, 6. K-1257, 7. Cubaneț 93, 8. Margo Tall, 9. Djerelo, 10. Zaltsadovzri, 11. Oro Shot. H_2O-control, M- Marker *1kb ADN Ladder*. Lungimea produsului de amplificare 263 p.b.

Fusarium culmorum a fost detectat în 4 din cele 11 probe de ADN din semințe de susan examinate. O bandă de 263 bp a fost observată pe electroferogramă. Ampliconul corespundea celui calculat pentru perechea de primeri din a doua rundă.

Concluzii

Studiul molecular al ADN-ului semințelor de susan folosind nested-PCR cu utilizarea primerilor corespunzători pentru genul *Fusarium* și pentru speciile de agenți patogeni *F. equiseti, F. culmorum, F. nivali, F. avenaceum* ne-a permis să identificăm infecția semințelor cu fitopatogeni. Din cele 12 probe examinate, agenții patogeni Fusarium au fost identificați în 11 probe. F. equiseti a fost detectat în 5 probe.: Cadet, VN 11 MC 889, Cubaneț 93, Djerelo, Zaltsadovzri.

Fusarium culmorum a fost identificat în 4 probe: Cadet, Delco, Cubaneț 93, Zaltsadovzri. Mostrele Cadet, Cubaneț 93, Zaltsadovzri au fost infectate concomitent cu două specii de *Fusarium.* Pentru acestea s-a stabilit infecție dublă cu *F. culmorum* și *F. equiseti.*

Din cele 11 probe afectate de agenți patogeni Fusarium, apartenența la specii a fost stabilită pentru 6 probe. În lucrare, a fost efectuat un studiu pentru a determina încă 2 specii de agenți patogeni: *F. nivali, F. avenaceum.* Fitopatogenii *F. nivali, F. avenaceum* nu au fost identificați.

Cererea de pe piață pentru semințe și produse din semințe de susan din lume este în continuă creștere. Produsele procesate trebuie să fie sigure pentru sănătatea umană. Abordarea moleculară a studiului contaminării semințelor cu agenți patogeni permite identificarea precisă a agentului patogen, ceea ce va contribui la utilizarea în siguranță a semințelor în scopuri alimentare, medicale și la prevenirea răspândirii semințelor contaminate în industria agricolă.

Notă: Cercetările au fost realizate în cadrul subprogramului 011101 „Abordări genetice și biotehnologice de management al agroecosistemelor în condițiile schimbărilor climatice”, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al RM.

Referințe bibliogrfaice

1. Bedigian D., History and lore of sesame in Southwest Asia. In: *Econ Bot.*, 2004, 58(3), 329–353.
2. Pusadkar P.P., Kokiladevi E., Bonde S.V., and NR Mohite. Sesame (*sesamum indicum* l.) Importance and its high quality seed oil. A review. In: *Trends in Biosciences*, 2016, 8 (15), 3900-3906.
3. Brian Gagosh Nayyar, Steve Woodward, Luis A.J. Mur, Abida Akram, Muhammad Arshad, S.M. Saqlan Naqvi Shaista Akhunda. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds from the Punjab, Pakistan**.** In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2018, 102, 128-135.