TESTAREA PRIMERILOR SPECIFICI PENTRU DETECȚIA '*Candidatus Phytoplasma solani*'

Bahşiev Aighiuni, Mitin V., Zamorzaeva Irina
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, Republica Moldova
e-mail: bahsiev.aighiuni@gmail.com

Fitoplasma este un microorganism fără perete celular care infectează plantele, fiind propagat prin floem la un spectru larg de culturi agricole de importanță economică majoră ca de exemplu: grâu, porumb, cartof ș.a. În special infectează tomatele, simptomele tipice ale infecției se manifestă prin piticism, îngălbenirea frunzelor, scurtarea internodurilor și sterilitatea înflorescenței, ce duce în final la scăderea semnificativă a calității producției și a productivității. Detecția morfologică este greu de realizat, din motiv că fitoplasmoza prezintă simptome specifice și altor infecții virale iar simptomele distinctive se observă la etapele tardive de creștere a tomatelor când are loc infecția sistemică în plante. La fel diagnosticul fitoplasmei este mai dificil din cauza imposibilității cultivării *in vitro*. Pe când metodele moleculare permit identificarea veridică și specifică a fitoplasmei. De obicei detecția moleculară a fitoplasmei se realizează prin metoda *nested*-PCR care constă în amplificarea în două runde a secvenței specifice. Însă această metodă posedă unele dezavantaje fiindcă consumă mult timp și reactive. Scopul cercetării a constat în optimizarea condițiilor de identificare a '*Candidatus Phytoplasma solani*' într-o singură rundă, astfel am realizat testarea primerilor specifici pentru detecția sigură a fitopatogenului la plante.

Materialul a fost colectat la etapa de coacere în masă a fructelor în luna august a anului 2018, când titrul fitoplasmei atinge un nivel înalt în plante. Izolarea ADN-ului s-a realizat prin metoda DNAzol din 10 plante a soiului Elvira. Soiul Elvira fiind considerat ca soi sensibil la infecția fitoplasmică. În studiu au fost analizați șase primeri ps (3 *Forward* și 3 *Revers* în diferite combinații), specifici pentru '*Ca. P. solani*'. Primeri au fost creați cu ajutorul programei *Primer 3*, pe baza secvenței genei *chaperonin*. Reacția de amplificare a decurs conform următorului program : I - 94°C 5'; II - 94°C 30", 58°C 30", 72°C 30" × 30; III - 72°C 10'; IV - 4°C ∞. Rezultatele amplificării au fost înregistrate prin electroforeza ampliconilor colorați cu bromură de etidiu (gel de agaroză de 2%, soluție-tampon 1xTBE) și vizualizați în UV. Veridicitatea metodei de detecție a fitoplasmei a fost determinată pe baza datelor obținute cu ajutorul metodei *nested*-PCR.

Inițial s-a realizat testarea primerilor ps3-ps4. Rezultatele detecției moleculare a '*Ca. P. solani*' cu primerii ps3-ps4 au demonstrat prezența a 8 semnale de amplificare din 10 probe analizate. În urma comparației datele obținute prin metoda PCR au fost identice cu rezultatele primite prin metoda *nested*-PCR. Utilizând primerii ps1-ps4 la fel s-au demonstrat rezultate asemănătoare iar semnalele de amplificare fiind mai accentuate.

Diagnosticul molecular al fitoplasmei cu perechea de primerii ps3-ps6 nu a prezentat o sensibilitate atât de înaltă fiind prezente 7 semnale de amplificație din 10 probe, mai mult ca atât s-a atestat sinteza unor fragmente de ADN cu lungimi nespecifice. Date similare au fost obținute și prin utilizarea primerilor ps1-ps5. În acest caz au fost determinate 6 benzi din cele 8 obținute în urma realizării *nested*-PCR.

Analizând rezultatele primite putem menționa că perechea de primeri ps1-ps4 este cea mai potrivită pentru identificarea sigură și precisă a fitoplasmei. La fel primerii ps3-ps4 pot fi utilizați în diagnosticul molecular al '*Ca. P. solani*' dar benzile electroforetice (semnele de infecție) nu au fost așa de accentuate în acest caz. Perechea ps3-ps6 nu a demonstrat rezultate veridice, dar pe viitor pot fi analizate și alte condiții de realizare a PCR. Perechea de primeri ps1-ps5 a prezentat rezultate fals-negative și nu necesită de a fi inclusă în cercetările ulterioare pentru diagnosticul molecular al fitoplasmei prin metoda PCR.

În concluzie putem recomanda perechile de primeri ps1-ps4 și ps3-ps4 pentru detecția moleculară sigură și precisă a '*Ca. P. solani*'. Primerii dați demonstrează o sensibilitate înaltă permițând obținerea rezultatelor veridice, cu minimizarea timpului și a reactivelor utilizate.