ELABORAREA PRIMERILOR SPECIFICI PENTRU IDENTIFICAREA MOLECULARĂ A FUNGILOR DIN G. *Gaeumannomyces*

Deaghileva Angela, Mitin V., Tumanova Lidia, Grăjdieru Cristina
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, Republica Moldova
e-mail: show2003@yandex.ru

Maladiile radiculare, care determină pierderea de 10-30% a producției anuale de cereale, sunt cauzate de un complex de agenți patogeni, cel mai frecvent, fiind identificați fungii din g. *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* și *Gaeumannomyces*, care manifestând simptome asemănătoare, deseori sunt prezenți pe același câmp sau chiar pe aceeași plantă. În Republica Moldova bolile radiculare ale grâului au fost studiate prin metode clasice, printre agenții cauzali fiind identificați preponderent *Fusarium*, frecvent *Gliocladium*, *Helminthosporium*, etc. *Gaeumannomyces graminis*, care provoacă îngenuncherea grâului, este pe larg răspândit în Eurasia, inclusiv în țara vecină Ucraina, iar în Republica Moldova unde condițiile sunt favorabile pentru dezvoltarea lui nu se cunosc date despre prezența la culturile cerealiere. Astfel, acest patogen prezintă un risc semnificativ pentru agricultura națională. Pentru a permite luarea măsurilor adecvate de control, care vor fi utilizate în beneficiul randamentului culturilor, este crucial ca acest patogen să fie identificat corect și la timp.

Identificarea *Gaeumannomyces graminis* a fost efectuată prin metodele PCR și *nested*-PCR cu perechi de primeri specifici, creați pe baza fragmentului genei *MnLOX*, care este comun pentru speciile din genul *Gaeumannomyces* (*GenBank*). Testarea seturilor de primeri creați a fost efectuată pe ADN-ul extras din cultura mixtă de *G. graminis* și din material vegetal infectat, care a fost furnizată de catedra Fitopatologie, Universitatea Națională de Viață și Știință a Mediului din Ucraina.

Caracteristicile primerilor sunt următoarele: *gg1* – Forward, start/stop 239 p.b. - 258 p.b., lungimea - 20 p.b., GC – 55%; *gg2* – Reverse, start/stop 1249 p.b. - 1230 p.b., lungimea – 20 p.b., GC - 60%; *gg3* – F, start/stop 362 p.b. - 381 p.b., lungimea – 20 p.b., GC – 55%; *gg4* – R, start/stop 952 p.b. - 934 p.b., lungimea – 19 p.b., GC – 58%. T_m pentru toți primeri este 60°C.

În cazul utilizării diferitor combinații de primeri specifici cu ADN-ul extras din *G. graminis* în reacția PCR au fost sintetizate următoarele fragmente: *gg1-gg2* – fragmentul cu lungimea 1011 p.b.; *gg3-gg4* – fragmentul cu lungimea 591 p.b.; *gg1-gg4* – 717 p.b.; *gg3-gg2* – 888 p.b. Toate fragmentele obținute în urma PCR corespund parametrilor calculați cu utilizarea aplicației soft *BLAST*. Pentru *nested*-PCR au fost alese următoarele perechi de primeri: runda I - *gg1-gg2*; runda II – *gg3-gg4*.

Parametrii PCR au inclus: *predenaturarea* 95° C – 3', urmată de 40 cicluri: *denaturarea* 95° C – 1', *alinieră primerilor* 65° C – 1', *elongarea* 72° C – 1', *elongarea finală* 72° C – 7'.

Parametrii *nested*-PCR pe ADN extras din cultură de fungi au inclus în I rundă: *predenaturarea* 95° C – 3', urmată de 20 cicluri: *denaturarea* 95° C – 1', *alinieră primerilor* 65° C – 1', *elongarea* 72° C – 1', *elongarea finală* 72° C – 7', iar în a II-a rundă 20 cicluri: *denaturarea* 95° C – 1', *alinieră primerilor* 65° C – 1', *elongarea* 72° C – 1', *elongarea finală* 72° C – 7'.

Parametrii *nested*-PCR pe ADN extras din material vegetal au inclus în I rundă: *predenaturarea* 95° C – 3', urmată de 30 cicluri: *denaturarea* 95° C – 1', *alinieră primerilor* 60° C – 1', *elongarea* 72° C – 1', *elongarea finală* 72° C – 7', iar în a II-a rundă 30 cicluri: *denaturarea* 95° C – 1', *alinieră primerilor* 60° C – 1', *elongarea* 72° C – 1', *elongarea finală* 72° C – 7'.

Astfel, datele obținute au demonstrat, că în rezultatul efectuării PCR și *nested*-PCR primerii creați pot fi utilizați pentru identificarea moleculară a *Gaeumannomyces spp.* în material vegetal. Analiza *BLAST* a primerilor creați a demonstrat că parametrii lor respectă standardele internaționale a Comitetului European de Standardizare (ISO 24276:2006(E)).

Cercetările au fost realizate în cadrul proiectului comun AȘM-ASȘIU „Diagnosticul maladiilor rădăcinii grâului” (2017-2018).