

CZU: 633.15:582.28

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6694870>

EVALUAREA LINIILOR CONSANGVINIZATE DE PORUMB ÎN BAZA REZISTENȚEI LA FUNGI TOXIGENICI DIN GENURILE *FUSARIUM* ȘI *ASPERGILLUS*

Cristina GRAJDIERU, Elena BĂLICI

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

În articol sunt prezentate datele evaluării mostrelor colecției de porumb în baza rezistenței la fungi toxigenici din genurile *Fusarium* și *Aspergillus*. În calitate de criterii s-au folosit gradul de atac și intensitatea infectării genotipurilor la fuzarioza știuleților. În conformitate cu rezultatele testărilor, liniile noi au fost repartizate în grupe după rezistența la acești patogeni. Prin utilizarea metodei PCR au fost identificate speciile toxigenice de fungi ce produc aflatoxine, fumonizine și tricotecene și determinată specificația lor în dependență de genotipul de porumb. Evaluarea stării fitosanitare a boabelor de porumb la faza de maturitate fiziologică a evidențiat următoarele specii toxigenice: *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *A. flavus*, *A. parasiticus*. Cele mai infectate linii au fost MAH2459 și MAH2461, în boabele cărora au fost detectate 5 specii de fungi toxigenici. Iar cea mai puțin infectată a fost linia MAH2452, în mostrele de boabe fiind identificat doar *F. verticillioides*.

Cuvinte-cheie: porumb, micotoxine, PCR, putregaiul știuleților, mostre de colecție.

THE EVALUATION OF SEVERAL INBRED MAIZE LINES IN TERMS OF RESISTANCE TO TOXIGENIC *FUSARIUM* AND *ASPERGILLUS* FUNGI

The current paper presents the results of evaluation of maize collection samples based on moisture yield. Cob parameters and kernel ripening period served as criteria. As a result of the research, two promising self-pollinated lines were identified, which can serve as a source of the desired genes. Molecular identification of toxigenic fungi producing aflatoxins, fumonisins and trichothecenes and their specification, according to the maize genotype, was carried out. The mycological evaluation of the phytosanitary status of maize kernels at the physiological maturity stage revealed the following toxigenic species: *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *A. flavus*, *A. parasiticus*. The most infected lines were MAH2459 and MAH2461, in whose grains 5 species of toxigenic fungi were detected. The least infected was the MAH2452 line – only *F. verticillioides* was identified in grain samples.

Keywords: maize, mycotoxins, PCR, ear rot, collection samples.

Introducere

Porumbul (*Zea mays* L.) este o cultură cerealică importantă și în multe țări prezintă sursa principală de alimentație pentru populația umană. Din acest motiv plantațiile de porumb se extind anual, iar cerințele pentru producția de porumb cresc. Astfel, există necesitatea de a spori cantitatea și calitatea materiei prime obținute de porumb. Cultura dată este atacată de un spectru larg de fungi patogeni care provoacă boli devastatoare și duc la pierderi semnificative din cantitatea și calitatea recoltei. Identificarea exactă a fungilor care apar pe produsele agroalimentare este aspectul-cheie al oricărui program de prevenire și management al dăunătorilor, oferind informații esențiale pentru sănătatea culturilor și siguranța alimentelor.

Fungii din genurile *Aspergillus* și *Fusarium* prezintă un risc semnificativ pentru porumb fiind agenți cauzali ai unor boli infecțioase, factori biotici de deteriorare a boabelor pe parcursul depozitării și producători de micotoxine. Acești fungi pot infecta planta pe parcursul vegetației, iar unele specii pot pătrunde în boabe prin mătase, ocolind barierele mecanice ale pănușilor [1]. Genul *Fusarium* este asociat cu fuzarioza știuleților, care este cauzată de un șir de specii, printre care cele mai importante fiind *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* [2]. Pierderile recoltei din cauza fuzariozei variază în dependență de regiunea cultivării, practicile agrotehnice aplicate și condițiile climatice – de la 10% până la 50% [3]. Speciile din genul *Aspergillus* sunt mai des asociate cu deteriorarea boabelor pe parcursul depozitării, dar sub anumite condiții unele dintre ele, precum *A. flavus* și *A. parasiticus*, pot cauza putregaiul știuleților [4,5]. Patogenii necesită condiții optime diferite pentru dezvoltare: *F. graminearum* necesită umiditate înaltă, dar temperaturi moderate, *F. verticillioides* și *F. proliferatum* necesită temperaturi mai ridicate în comparație cu *F. graminearum* și umiditate moderată, iar *A. flavus* necesită temperaturi în jur de 30°C [6]. Astfel, în dependență de an, spectrul agenților cauzali ai putregaiurilor știuleților la porumb variază.

Un alt hazard asociat cu fungii din genurile *Aspergillus* și *Fusarium* se datorează faptului că multe dintre aceste specii pot sintetiza micotoxine, care provoacă toxicoze acute și dereglări serioase ale metabolismului la om și animale. *F. graminearum* este cunoscut pentru producerea micotoxinelor DON, care împiedică sinteza proteinelor, și a zearalenonei, care cauzează dereglări ale funcțiilor reproductive la mamifere [7]. Speciile *F. proliferatum* și *F. verticillioides* în principal sintetizează fumonizina B1 ce manifestă efect nefrototoxic și hepatotoxic [8]. Speciile *A. flavus* și *A. parasiticus* sunt asociate cu sinteza aflatoxinelor, care sunt cunoscute pentru proprietățile de a induce cancerogeneza [9]. Impactul semnificativ asupra sănătății umane a condiționat elaborarea în multe țări a bazei legislative care determină cantitățile maximal admisibile de micotoxine în produsele alimentare și furaj [10-12].

Scopul acestei lucrări a constat în evaluarea genotipurilor noi de porumb în baza rezistenței la fitopatogeni fungici, ceea ce va permite crearea colecției specializate de porumb din cadrul Laboratorului de Resurse Genetice Vegetale al IGFPP.

Material și metode

Materialul vegetal pentru cercetare a fost reprezentat de 12 linii consangvinizate noi obținute din populații sintetice: MAH2281, MAH2459, MAH2461, MAH2452, MAH2414, MAH2413, MAH2424, MAH2425, MAH2526, MAH2308, MAH244, MAH2451 (colecția Laboratorului de Resurse Genetice Vegetale).

Mostrele colecției au fost evaluate în câmp în condițiile climaterice ale anului 2021. Pentru cultivare a fost utilizată agrotehnica unanim acceptată pentru Zona de Centru a Moldovei. Observările fenologice și descrierea morfologică au fost executate conform clasificatorului pentru porumb [13]. Înregistrările necesare și evidențierea știuleților afectați a fost efectuată direct în câmp în timpul recoltării. Intensitatea deteriorării știuleților de către *Fusarium* a fost determinată prin metoda evaluărilor vizuale și calculul procentului de boabe deteriorate. Pentru screeningul final al formelor rezistente a fost luată o scară de 9 puncte.

Identificarea agenților patogeni a fost efectuată în Laboratorul Genetica moleculară (IGFPP) prin metoda nested-PCR cu set de primeri specifici. ADN-ul total a fost extras din boabe de porumb prin metoda CTAB cu modificări [14]. Cuantificarea și analiza calității a fost efectuată prin electroforeză în gel de agaroză cu markeri comerciali în baza fagului λ (Thermo Fischer Scientific).

Diagnosticul PCR molecular al fungilor a fost efectuat prin metoda nested-PCR cu un set de primeri (Tab.1) elaborați în Laboratorul Genetica moleculară în baza secvențelor genomice, asociate cu sinteza tricotecenelor, aflatoxinelor și fumonizinelor din baza de date *GenBank* [15].

Tabelul 1

Caracteristicile primerilor utilizați pentru diagnosticul molecular

Primeri	Secvența (3'→5')	Specia	Secvența-tintă
ftri8gr1	CTTCCGGTAATGTTTCTCGTCACT	<i>F. graminearum</i>	MH514940.1 <i>Fusarium graminearum</i> isolate 23-4 Tri core gene cluster, complete sequence
ftri8gr4	CGCTGCTGAGGGTTTTACCAT		
fqtri8gr2	CTCGTCACTTCTTGATGACACA		
fqtri8gr3	GGGGGCCGACATTCCTTC		
fufum6ve1	GCCTTTGTTTGGGGCCATGA	<i>F. verticillioides</i>	KF889190.1 <i>Fusarium verticillioides</i> isolate 17L oxygenase (fum6) gene, partial cds
fufum6ve4	CTGAGACCCTCGCCAGTTTTG		
fqfum6ve2	TCGCCCTTTGCACCATTGAC		
fqfum6ve3	AGCCTGCCGCTTGAACCTTG		
fprfum61	TCGGATTGTCACGCCTTTGT	<i>F. proliferatum</i>	KF889207.1 <i>Fusarium proliferatum</i> isolate 85L oxygenase (fum6) gene, partial cds
fprfum64	GTCCTTGCGTTCAGCATTG		
fqprfum62	ATCGCCCTCTGCACGATAGA		
fqprfum63	TGGGAGGTTGCTCTGAGTGA		
afap1	CTTTGTTTCGGTAGTGCCATCTTGA	<i>A. flavus</i>	FJ877830.1 <i>Aspergillus flavus</i> strain IC289 O-
afap4	GCCATAGCACATATTCTCCAACCT		

aqfap2	GTGTCGGGTGTGCCTATTTAACC	<i>A. parasiticus</i>	methyltransferase A (aflP) gene, partial cds; and aflP-aflQ intergenic spacer, partial sequence
aqfap3	AAGGCTTTCGGTCGGTTGATG		
apap1	TTGCTCGGTAGTGCCATGTT		
apap4	GGCTTCCATAACACATATTCTCCAA		
aqpap2	CCGCGAAAGAACAACAGAGA		
aqpap3	AACACATATTCTCCAACCTTCTTGCT		
			DQ390914.1 <i>Aspergillus parasiticus</i> strain IC73 O-methyltransferase A (aflP) gene, partial cds; and aflP-aflQ intergenic region, genomic sequence

Amplificarea a fost efectuată în 25 μ l de mix de reacție: 66 mM Tris-HCl (pH 8.4), 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 mM MgCl_2 , 0,1% Tween 20, 7% glicerol, 0,01 μ g BSA, 0,2 mM de fiecare dNTP, 1,25 U Taq ADN-polimerază (Thermo Fisher Scientific), 5 pM de fiecare primer și 20 ng de ADN.

Protocolul nested-PCR a inclus două runde consecutive cu 30 de cicluri în fiecare: denaturarea 30 s la 94°C, alinierea 30 s la 57°C, elongarea 30 s la 72°C. Runda I s-a început cu denaturarea inițială de 3 min la 94°C. Ambele runde au fost finisate cu elongare terminală de 7 min la 72°C.

Analiza ampliconilor. Secvențele amplificate au fost separate prin electroforeză în gel de agaroză (1,5%, 1xTBE, 6V/cm, 1 oră) cu bromură de etidiu, vizualizate în raze UF la lungimea undei 302 nm. Lungimea ampliconilor a fost estimată prin migrarea cu markeri comerciali de lungime 100 bp DNA ladder (Thermo Fischer Scientific) și aplicația soft GelAnalyzer2010.

Rezultate și discuții

Studiul fenologic a permis gruparea genotipurilor după precocitate. În Tabelul 2 sunt prezentate datele privind perioada de vegetație a liniilor medii tardive. Lungimea perioadei a variat în dependență de genotip de la 120 până la 125 zile.

Tabelul 2
Evaluarea liniilor consangvinizate după gradul de atac al fuzariozei știuleților, anul 2021

Nr crt.	Linia consangvinizată, numărul registrului	Perioadă de vegetație, zile	Numărul de plante infectate de fuzarioza știuleților, %	Intensitatea infectării știuleților, %	Rezistența liniilor, grade (1-9)*
1	MAH2281	120	30	16,7	4
2	MAH2459	125	0	0,0	1
3	MAH2461	120	35	12,3	5
4	MAH2451	125	30	9,1	4
5	MAH2308	120	10	14,6	3
6	MAH2526	120	0	0	1
7	MAH2425	125	70	12,7	8
8	MAH2452	125	0	0	1
9	MAH2414	125	0	0	1
10	MAH2413	120	0	0,0	1
11	MAH2424	120	40	19,1	6
12	MAH2448	120	100	83,2	9
	Media	122	26,3	14,0	3,7

* 1 grad – rezistentă; 3 grade – moderat rezistentă; 6 – moderat susceptibilă; 9 – susceptibilă

În procesul de recoltare a fost determinat numărul de știuleți cu simptome de infectare cu *Fusarium spp.* Analiza datelor obținute a relevat diferență genotipică în gradul de atac și intensitatea dezvoltării bolii. Numărul de plante infectate de fuzarioza știuleților a variat în limitele 0–100% în dependență de genotip. Media liniilor studiate a fost determinată de 26,3%. Nivelul maxim de deteriorare a plantelor (70% și 100%) a fost înregistrat la liniile MAN2425 și MAN2448, ceea ce a permis ca acestea să fie clasificate ca foarte susceptibile. Patru linii cu rata de infectare de la 30 până la 50% plante infectate (MAN2424, MAN2461, MAN2281 și MAN2451) au constituit grupul moderat susceptibil. Genotipurile cu o prevalență a bolii mai mică de 30% au fost clasificate ca slab susceptibile (MAH2308, MAH2459, MAH2526, MAH2413, MAH2452 și MAH2414).

În literatura de specialitate sunt mai multe relatări care mărturisesc că funghi patogeni se conțin în abundență în probe de boabe. De exemplu, prin analiza micologică s-a depistat prezența micotoxinelor în 69,9% probe de boabe [16]. De menționat că diagnosticul vizual al prezenței micotoxinelor în boabe de porumb nu este posibil. Prin urmare, pentru determinarea gradului de contaminare cu micromicete a genotipurilor studiate și identificarea aflatoxinelor s-au folosit metode moleculare, rezultatele cărora sunt prezentate mai jos.

Amplificarea pozitivă a fost marcată de o bandă de 152 pb pentru *A. flavus*, 120 pb pentru *A. parasiticus*, 147 pb – *F. graminearum*, 179 pb – *F. verticillioides*, 123 pb – *F. proliferatum*. Astfel, în boabele liniilor MAH2459 și MAH2461 au fost identificate toate cinci specii de funghi toxigenici (Fig.1 A,B). În boabele liniei a fost absent *F. proliferatum* (Fig.1A), iar în boabele liniei MAH2451 au fost identificate doar *A. flavus*, *F. graminearum* și *F. verticillioides* (Fig.1B).



Fig.1. Electroforegrama ampliconilor cu primerii pentru identificarea unor funghi toxigenici în mostrele de boabe ale liniilor MAH2281, MAH2459, MAH2461, MAH2451: 1,6 – *A. flavus*; 2,7 – *A. parasiticus*; 3,8 – *F. graminearum*; 4,9 – *F. proliferatum*; 5,10 – *F. verticillioides*.

Rasa toxigenică de *F. graminearum* a fost absentă în boabele liniilor MAH2308 și MAH2526 (Fig.2A). Pentru două linii (MAH2425 și MAH2452) s-a evidențiat un nivel redus al cantității de funghi toxigenici – au fost identificați doar *A. flavus*, *F. verticillioides* și *F. proliferatum* (Fig.2B).



Fig.2. Electroforegrama ampliconilor cu primerii pentru identificarea unor funghi toxigenici în mostrele de boabe ale liniilor MAH2308, MAH2526, MAH2425, MAH2452: 1,6 – *A. flavus*; 2,7 – *A. parasiticus*; 3,8 – *F. graminearum*; 4,9 – *F. proliferatum*; 5,10 – *F. verticillioides*.

În altele patru linii de porumb au fost identificați fungi-producenți de tricotecene, aflatoxine și fumonizine. La linia MAH2414 a fost absent doar *F. graminearum*, iar în cazul genotipului MAH2413 nu au fost constatate două specii de *Fusarium* (Fig.3A). În boabele liniei MAH2424 au fost absente speciile *F. graminearum* și *F. proliferatum*, iar la linia cosangvinizată MAH2448 au fost identificate patru specii de fungi toxigenici (Fig.3B).



Fig.3. Electroforegrama ampliconilor cu primerii pentru identificarea unor fungi toxigenici în mostrele de boabe ale liniilor MAH2414, MAH2413, MAH2424, MAH2448:

1,6 – *A. flavus*; 2,7 – *A. parasiticus*; 3,8 – *F. graminearum*; 4,9 – *F. proliferatum*; 5,10 – *F. verticillioides*.

Din datele expuse anterior rezultă că printre speciile de fungi toxigenici cele mai frecvent detectate au fost *A. flavus* (11 probe pozitive), *A. parasiticus* (9 probe pozitive) și *F. verticillioides* (9 probe pozitive). Mai rar a fost detectat *F. proliferatum* (7 probe pozitive), iar *F. graminearum* a fost identificat doar în 5 mostre de boabe (Tab.3).

Tabelul 3

Fungii toxigenici identificați în boabele liniilor de porumb analizate

Genotip Patogen	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>
MAH2281	+	+	+	-	+
MAH2459	+	+	+	+	+
MAH2461	+	+	+	+	+
MAH2451	+	-	+	-	+
MAH2308	+	+	-	+	+
MAH2526	+	+	-	+	-
MAH2425	+	-	-	-	+
MAH2452	-	-	-	+	-
MAH2414	+	+	-	+	+
MAH2413	+	+	-	+	-
MAH2424	+	+	-	-	+
MAH2448	+	+	+	-	+
Total	11	9	5	7	9

Cele mai infectate linii au fost MAH2459 și MAH2461, în boabele cărora au fost detectate 5 specii de fungi toxigenici. Iar cea mai puțin infectată a fost linia MAH2452 – în mostrele de boabe a fost identificat doar *F. verticillioides*.

Concluzii

1. Ca urmare a evaluărilor imunologice pe fundal natural de infecție ale liniilor cosangvinizate de porumb, au fost identificate surse genetice de rezistență complexă la fungi toxigenici din g. *Fusarium*.

2. Identificarea agenților patogeni prin metoda PCR a determinat nivelul de infecție cu fungi toxigenici din g. *Fusarium* și *Aspergillus* în probe de boabe și a relevat diferențe în acești parametri în dependență de tipul de agent patogen și genotipul plantei.

3. Printre speciile de fungi toxigenici cele mai frecvent detectate au fost *A. flavus*, *A. parasiticus* și *F. verticillioides*. Mai rar a fost detectat *F. proliferatum*, iar *F. graminearum* a fost identificat doar în 5 mostre de boabe.

4. Cele mai infectate linii de porumb au fost MAH2459 și MAH2461, în boabele cărora au fost detectate 5 specii de fungi toxigenici, iar cea mai puțin infectată a fost linia MAH2452 – în probele de boabe fiind identificat doar *F. verticillioides*.

Referințe:

1. THOMPSON, M., RAZADA, M. Fungal pathogens of maize gaining free passage along the silk road. In: *Pathogens*, 2018, vol.7, no.4, p.1-16. ISSN 2076-0817
2. MASIELLO, M. et al. *In vitro* and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. In: *Toxins (Basel)*, 2019, vol.11, no.1, p.1-18. ISSN 2072-6651
3. LI, L. et al. The relationship analysis on corn stalk rot and ear rot according to *Fusarium* species and fumonisin contamination in kernels. In: *Toxins (Basel)*, 2019, vol.11, no.6, p.1-15. ISSN 2072-6651
4. LAGOIANNI, C., TSITSIGIANNIS, D. Effective biopesticides and biostimulants to reduce aflatoxins in maize fields. In: *Frontiers in Microbiology*, 2019, vol.10, November, p.1-8. ISSN 1664-302X
5. PFLIEGLER, W. et al. The *Aspergilli* and their mycotoxins: metabolic interactions with plants and the soil biota. In: *Frontiers in Microbiology*, 2020, vol.10, February, p.1-21. ISSN 1664-302X
6. SZABO, B. et al. A new concept to secure food safety standards against *Fusarium* species and *Aspergillus flavus* and their toxins in maize. In: *Toxins (Basel)*, 2018, vol.10, no.9, p.1-25. ISSN 2072-6651
7. ABDALLAH, M. et al. Fungal endophytes control *Fusarium graminearum* and reduce trichothecenes and zearalenone in maize. In: *Toxins (Basel)*, 2018, vol.10, no.12, p.1-18. ISSN 2072-6651
8. CHEN, J. et al. Research progress on fumonisin B1 contamination and toxicity: A review. In: *Molecules*, 2021, vol.26, no.17, p.1-21. ISSN 1420-3049
9. NIKOLIC, M. et al. Toxigenic species *Aspergillus parasiticus* originating from maize kernels grown in Serbia. In: *Toxins (Basel)*, 2021, vol.13, no.12, p.1-13. ISSN 2072-6651
10. AGRIOPOULOU, S., STAMATELOPOULOU, E., VARZAKAS, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: prevention and detoxification in foods. In: *Foods*, 2020, vol.9, no.2, p.1-50. ISSN 2304-8158
11. KEMBOI, D. et al. A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: challenges for food safety and dairy production in Sub-Saharan Africa. In: *Toxins (Basel)*, 2020, vol.12, no. 222, p.1-25. ISSN 2072-6651
12. LANDONI, M. et al. Phlobaphenes modify pericarp thickness in maize and accumulation of the fumonisin mycotoxins. In: *Scientific Reports*, 2020, vol.10, no.1, p.1-9. ISSN 2045-2322
13. *Descriptors for Maize Characterization*. IITA Accessions 2. Disponibil: <https://my.iita.org/accession2/descriptors.jsp;jsessionid=90C4F6D51E3F86F0B2C83B5A8955F4C5?id=35> [Accesat: 02.05.2022]
14. ABOUL-MAATY, N., ORABY, H. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. In: *Bulletin of the National Research Centre*, 2019, vol.43, no.1, p.1-10. ISSN 2522-8307
15. *National Center for Biotechnology Information*. National Library of Medicine, ©1988. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Accesat: 02.05.2022]
16. SCHAEFFER, J., TYCZKOWSKI, J., HAMILTON, P. Depletion of oxycarotenoid pigments in chickens and the failure of aflatoxin to alter it. In: *Poultry Science*, 1988, vol.67, no.7, p.1080-1088. ISSN 0032-5791

Notă: Cercetările au fost realizate în cadrul Proiectului Programului de Stat „Conservarea ex situ de lungă durată a resurselor genetice vegetale în Banca de gene cu utilizarea metodelor biologiei moleculare în testarea stării de sănătate a germoplasmei vegetale”, cu cifra 20.80009.5107.11, finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Date despre autori:

Cristina GRĂJDIERU, cercetător științific stagiar, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

E-mail: kgrejdieru@mail.ru

ORCID: 0000-0003-1560-7924

Elena BĂLICI, doctor, cercetător științific coordonator, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

E-mail: bylici.alena@mail.ru

ORCID: 0000-0002-2360-5518

Prezentat la 05.05.2022