

REZUMAT

Cuvinte cheie: *Fusarium*, *Bacillus*, *ceai de compost*, *identificare moleculară*, *chemotipare*, *biocontrol*, *stimulator*, *antagonism în vivo*

Infecția cu *Fusarium*, fitopatogen întâlnit frecvent la cereale, tinde să devină o problemă îngrijorătoare la nivel global, cauzând pierderi de recoltă și economice importante, daunele fiind amplificate datorită capacității acestui gen de a sintetiza micotoxine. În prezent au fost identificate aproximativ 19 specii de *Fusarium*, fiecare specie având propriul profil de micotoxine și propria preferință față de planta gazdă.

Identificarea tulpinilor patogene de *Fusarium* prezente în probele de plante contaminate este extrem de importantă în vederea diagnosticării bolilor respective, a combaterii lor și a prevenirii contaminării cu micotoxine.

În privința combaterii acestor fungi au fost propuse o serie de strategii, dintre care rotația culturilor, utilizarea unor soiuri de plante rezistente sau tratamentul cu fungicide reprezintă principalele abordări practice. În ultimii ani, o atenție specială este acordată metodelor de control biologic al infecțiilor fungice, ceea ce ar putea reduce semnificativ impactul negativ asupra mediului a pesticidelor chimice.

Din aceste motive, scopul principal al proiectului este acela de a identifica noi agenți de combatere biologică a fungilor din genul *Fusarium*: *F.graminearum* și *F.culmorum*, principalii responsabili de infecțiile cerealelor.

Teza de doctorat intitulată “*CERCETĂRI PRIVIND METODELE DE BIOCONTROL ALE FUNGILOR DIN GENUL FUSARIUM*” cuprinde 5 capitole, desfășurate pe un număr de 155 pagini cuprinzând 25 tabele, 67 figuri dintre care un număr de 48 originale și 190 de referințe bibliografice.

În **Capitolul I** sunt prezentate informații privind importanța genului *Fusarium*, taxonomia acestuia, ciclul de viață, patogenitate, metode de identificare, metode de prevenire și combatere. Cunoașterea acestor aspecte contribuie la o mai bună înțelegere a fungilor din genul *Fusarium*, a metodelor de diferențiere între specii fiind un pas important în vederea elaborării unor experimente ce vizează identificarea rapidă a speciilor micoxigene în vederea prevenției și combaterii lor.

În **Capitolul II** sunt prezentate metodele de control biologic ca alternativă la metodele clasice de combatere prin folosirea agenților de control biologic. De asemenea este prezentat atât efectul compostului ca supresor al fungilor patogeni cât și ca sursă de izolare pentru microorganisme cu potențial efect antifungic. Acest capitol contribuia la o mai bună înțelegere a

strategiilor de biocontrol iar cunoștințele acumulate vor fi folosite în experimentele de biocontrol prezentate în studiul de față.

Scopul principal al tezei **este acela de a identifica noi agenți de combatere biologică a fungilor din genul *Fusarium*: *F.graminearum* și *F.culmorum*, principalii responsabili de infecțiile cerealelor.**

Obiectivele cercetării au fost:

- izolarea și caracterizarea unor noi tulpini de microorganisme indigene capabile să inhibe dezvoltarea tulpinilor de fusarii;
- caracterizarea unor izolate fungice în privința capacității micotoxigene și a apartenenței la speciile vizate;
- identificarea unor mecanisme de acțiune ale microorganismelor antagoniste față de fusarii.

În **Capitolul III** este prezentat materialul biologic luat în studiu și metodologia folosită

Materialul biologic este reprezentat din 34 de tulpini de *Fusarium*, izolate noi de pe suprafața boabelor de grâu din 2013 și 2014. Două tulpini de referință aparținând speciilor *F. graminearum* (Fg183) și *F. culmorum* (Fc46) au fost obținute din diverse colecții de microorganisme europene. De asemenea în studiu au mai fost folosite diverse specii de fungi fitopatogene aparținând colecției de microorganisme ale Facultății de Biotehnologii, Laboratorul de genetică. Ca microorganisme antagoniste au fost testate 6 tulpini bacteriene nou izolate din compost precum și două bacterii din colecția de microorganisme ale Facultății de Biotehnologii, Laboratorul de genetică.

Metodele de lucru folosite sunt legate de: izolarea și cultivarea microorganismelor folosite în experimente (bacterii și fungi filamentoși); de izolarea ADN genomic din tulpinile bacteriene și cele fungice selectate; de identificarea, cu ajutorul sistemului BIOLOG și a tehnicilor moleculare, a speciilor cărora le aparțin izolatele microbiene utilizate; chemotiparea moleculară în cazul fungilor din genul *Fusarium*; analiza patogenității fungilor; testarea proprietăților antagoniste ale tulpinilor bacteriene selectate și caracterizarea lor.

Capitolul IV cuprinde rezultatele cercetărilor proprii grupate în principal pe obiectivele propuse în cadrul tezei. Astfel, în primul subcapitol sunt prezentate rezultatele legate de izolarea din extract (ceai) de compost a unor noi tulpini de bacterii cu proprietăți antagoniste față de o gamă largă de fungi fitopatogeni. Aceste rezultate au demonstrat, prin testarea mai multor variante experimentale că extractul de compost are efecte inhibitoare pentru dezvoltarea fungilor fitopatogeni, activitatea fiind asociată, în mare măsură, prezenței unor microorganisme benefice la nivelul acestuia.

Al doilea subcapitol cuprinde rezultatele referitoare la identificarea speciilor cărora aparțin cele opt tulpini bacteriene care au dovedit efecte antifungice clare. Pentru identificarea noilor izolate bacteriene (șase provenite din compost și două din sol) au fost folosite două variante de teste: sistemul BIOLOG și analizele moleculare. Sistemul BIOLOG a fost eficient pentru identificarea, la nivel de gen a tuturor izolatelor și la nivel de specie a cinci dintre acestea, în timp ce prin folosirea de primeri specie-specifici (PCR multiplex) s-a reușit identificarea tuturor celor opt tulpini bacteriene utilizate. Analiza RAPD în cazul tulpinilor ce aparțin aceleiași specii au evidențiat un ușor polimorfism intraspecific ceea ce demonstrează faptul că, deși au fost izolate din aceeași surse, tulpinile bacteriene respective sunt diferite.

Următorul subcapitol se referă la identificarea și caracterizarea noilor izolate de *Fusarium* obținute de pe boabe de grâu. Identificarea tulpinilor de *Fusarium* s-a realizat prin metode clasice, microbiologice pentru încadrarea acestora la nivel de gen. Pentru identificarea speciei/speciilor cărora le aparțin au fost utilizate metode moleculare. În cadrul experimentelor a fost optimizată o metodă de izolare a ADN genomic fungic care a permis obținerea unor probe de ADN corespunzătoare din punct de vedere cantitativ și calitativ pentru analizele ulterioare. Pentru identificarea speciilor de fusarii s-a utilizat reacția PCR multiplex cu primeri specie-specifici, ceea ce a condus la identificarea a 34 de tulpini de *Fusarium*: cinci tulpini au fost identificate ca aparținând speciei *Fusarium culmorum* iar 29 aparțin speciei *Fusarium graminearum*, aceste rezultate confirmând dominanța acestei specii. Analiza RAPD a izolatelor de *F.graminearum* și *F.culmorum* a evidențiat, în general, un anumit grad de polimorfism molecular între tulpinile examinate (intraspecific) dar nu a permis asocierea vreuneia dintre benzile polimorfe evidențiate cu vreun caracter specific al fungilor respectivi. În cadrul acestui subcapitol sunt prezentate și rezultatele obținute în privința chemotipării izolatelor fungice. Folosirea unor primeri specifici pentru gena *Tri 5* a permis detectarea acestei gene la majoritatea tulpinilor fungice analizate sugerând capacitatea acestora de a sintetiza tricotecene. Utilizarea unor seturi de primeri caracteristici și pentru alte gene implicate în biosinteza tricotecenelor a permis identificarea a două chemotipuri distincte: 15-ADON și 3-ADON. De remarcat că toate izolatele de *F.culmorum* sunt de tip 3-ADON. Rezultatele obținute în urma cercetărilor efectuate confirmă utilitatea tehnicilor moleculare pentru caracterizarea tulpinilor noi de *Fusarium*.

Subcapitolul 4.4. a vizat analiza patogenității izolatelor de *Fusarium* selectate, fiind evaluată atât influența fungilor asupra germinării și a dezvoltării plantulelor de grâu cât și posibilitatea asocierii acestui caracter cu producerea de micotoxine. În urma experimentelor s-a evidențiat faptul că patogenitatea tulpinilor fungice este asociată clar cu nivelul de micotoxine produs, fapt dovedit de analizele cromatografice (TLC) care au dovedit prezența clară a DON (dar și a altor compuși potențial toxici) la unele dintre fungi.

Ultimele trei subcapitole sunt dedicate proprietăților antagoniste ale bacteriilor selectate, mecanismelor de acțiune ale acestora și evaluării efectelor protectoare/stimulatoare asupra unor plante țintă. Rezultatele obținute au demonstrat că izolatele bacteriene selectate au potențialul de a inhiba în mod semnificativ dezvoltarea speciilor *Fusarium graminearum* și *Fusarium culmorum*, iar eficiența inhibării este influențată de interacțiuni specifice dintre tulpinile bacteriene și fungii țintă, dovadă analizele de microscopie. Compușii antifungici produși de bacterii sunt afectați atât de temperatură cât și de enzimele proteolitice, ceea ce înseamnă că natura acestor compuși este proteică. Mecanismele specifice de acțiune ale bacteriilor selectate sunt legate de producerea de enzime hidrolitice (chitinaze și proteaze) precum și de biosurfactanți (genele pentru biosinteza bacilomicinei, fengicinei, bacilolizinei și surfactinului fiind detectate la majoritatea bacteriilor testate). În privința enzimelor hidrolitice testate, rezultatele sugerează că deși sunt extracelulare, cea mai mare parte a lor rămân localizate la nivelul peretelui celular, cel mai probabil la nivelul unor complexe macromoleculare asociate acestuia. Tulpina *Bacillus amyloliquefaciens* BIR (B8) a prezentat cele mai puternice efecte antifungice, ea evidențiind și cele mai ridicate activități enzimatică și conținând genele pentru toți biosurfactanții examinați. Teste efectuate cu diferitele tulpini bacteriene analizate au evidențiat că unele dintre ele sunt capabile să influențeze nivelul DON produs de fungii filamentosi țintă, fie prin inhibarea sintezei de DON fie prin degradarea micotoxinei. De asemenea, s-a dovedit că bacteriile de interes au capacitatea de a solubiliza fosforul anorganic, ceea ce evidențiază utilitatea lor nu numai pentru efectele de protecție ci și de stimulare a dezvoltării plantelor, prin asigurarea unor nutrienți importanți.

În privința evaluării proprietăților antagoniste ale izolatelor bacteriene prin tratarea semințelor sau a plantelor țintă, analizele efectuate au evidențiat că germinarea semințelor de grâu nu a fost afectată negativ de tratamentele bacteriene ci, din contră, tratamentul bacterian a prevenit infectarea semințelor cu fungi și a asigurat o rată de germinare de 2-3,5 ori mai mare comparativ cu variantele în care tratamentul bacterian a lipsit. Două dintre tulpinile bacteriene selectate, B3 și B8 (BIR) au stimulat atât germinarea semințelor de grâu cât și dezvoltarea plantulelor.

Teza se încheie cu un capitol de concluzii în care sunt sintetizate principalele rezultate obținute, urmat de capitolul de referințe bibliografice ce cuprinde un număr de 190 lucrări științifice citate.

Rezultatele obținute pe parcursul studiilor doctorale au fost diseminate prin publicarea unui număr de 2 articole publicate in extenso în reviste indexate BDI; un articol publicat într-o revistă cotate ISI și un alt articol publicat într-un volum de tip ISI Proceedings. De asemenea,

cea mai mare parte a rezultatelor a fost prezentată la diverse manifestări științifice naționale și internaționale.

În concluzie, experimentele realizate în cadrul acestei teze au condus la selectarea a cel puțin două tulpini bacteriene, una din compost și cealaltă din sol. Prin identificarea și caracterizarea lor complexă, aceste tulpini ar putea fi considerate drept candidați importanți pentru realizarea unor biopreparate utilizabile ca atare sau care ar putea fi incluse în compost pentru biocontrolul speciilor de *Fusarium*, prevenind astfel contaminarea plantelor. Rezultatele au caracter de noutate pe plan național și chiar internațional prin materialul biologic selectat și caracterizat, prin metodele optimizate pe parcursul cercetărilor și prin evidențierea efectelor de reducere a cantității de DON acumulat în mediul de cultură în cazul utilizării unora dintre tulpinile bacteriene selectate.