

**APROBAT**

Secția AȘM Științe ale vieții

Coordonatorul secției

dr.hab. acad. GAINA BORIS

Semnătura \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

L.Ș.

**APROBAT**

Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare

Director general

TAGADIUC OLGA

Semnătura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

L.Ș.

**RAPORT FINAL**

**privind executarea proiectului bi/multilateral**

19.80013.51.07.10A/BL “Analiza complexă a acumulării micotoxinelor în produse alimentare pe parcursul depozitării”

Concursul comun al proiectelor științifice de cercetare moldo-belaruse

2019-2020 (24 luni)

Direcția Strategică **Biotehnologii (16.05, 51.07)**

Conducătorul proiectului

Mitina Irina \_\_\_\_\_

Directorul organizației

Andronic Larisa \_\_\_\_\_

Consiliul științific/Senat

Andronic Larisa \_\_\_\_\_

L.Ș.

## Chișinău 2021

### 1. Scopul general al proiectului conform formularului de aplicare

Scopul proiectului dat este evidențierea corelației dintre prezența genelor de sinteză a micotoxinelor (patogenilor) în produse alimentare și concentrației micotoxinelor, stabilite pe parcursul depozitării.

### 2. Obiectivele proiectului conform formularului de aplicare

- 1) Design-ul primerilor specifici secvențelor de gene, implicate în sinteza micotoxinelor.
- 2) Elaborarea protocoalelor PCR și Real-Time PCR pentru detectarea genelor, implicate în sinteza micotoxinelor.
- 3) Analizele PCR și Real-Time PCR a produselor alimentare la diferite etape de depozitare pentru prezența genelor, implicate în sinteza micotoxinelor.
- 4) Analiza micotoxinelor în produse alimentare prin metoda de cromatografie lichidă de înaltă performanță (Republica Belarus).

### 3. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor proiectului

#### **1.Elaborarea primerilor specifici secvențelor de gene, implicate în sinteza micotoxinelor, și primerilor specifici fungilor-producenți de micotoxine (din g. *Fusarium*, *Aspergillus*, și *Penicillium*)**

- Studierea datelor GenBank și căutarea secvențelor conservative a genelor, implicate în sinteza micotoxinelor
- Analiza BLAST a primerilor creați.
- Studierea datelor GenBank și căutarea secvențelor conservative a genelor pentru identificarea fungilor-producenți de micotoxine (din g. *Fusarium*, *Aspergillus*, și *Penicillium*)
- Analiza BLAST a primerilor creați.
- Comandarea primerilor

## **2. Testarea seturilor de primeri creați**

- Izolarea și purificarea ADN-ului genomic din produse, contaminate cu mucegaiuri
- Cuantificarea ADN-lui prin electroforeza în gelul de agaroză.
- PCR și nested-PCR pe ADN izolat din produse, contaminate cu mucegaiuri, cu seturile noi de primeri specifici pentru PCR-identificarea genelor, implicate în sinteza micotoxinelor, și optimizarea parametrilor PCR.
- Electroforeza în gelul de agaroză și procesarea electroforegramelor (GelAnalyzer2010).
- PCR și nested-PCR pe ADN izolat din produse, contaminate cu mucegaiuri cu seturile noi de primeri specifici pentru identificarea fungilor-producenți de micotoxine (din g. *Fusarium*, *Aspergillus*, și *Penicillium*)
- Electroforeza în gelul de agaroză și procesarea electroforegramelor (GelAnalyzer2010).
- Identificarea fungilor filamentoși, detectați în produse pe parcursul depozitării, și corelarea cu datele despre evidențierea în aceste produse genelor, implicate în sinteza micotoxinelor

## **3. Analiza diseminării fungilor-producenți pe parcursul depozitării**

- Selectarea metodei optime pentru extragerea ADN-lui din cereale.
- Izolarea ADN-lui din cereale în diferite etape de depozitare.
- analiza PCR convențională, nested-PCR a ADN-ului izolat folosind primerii pentru gene de sinteză a micotoxinelor
- analiza PCR convențională, nested-PCR a ADN-ului izolat folosind primerii pentru gene utilizate pentru identificarea moleculară a agenților patogeni capabili să sintetizeze micotoxine.
- Analiza real-time PCR (în timp real) a ADN-ului izolat folosind primerii la gene pentru sinteza micotoxinelor
- Analiza real-time PCR (în timp real) a ADN-ului izolat folosind primerii pentru gene utilizate pentru identificarea moleculară a agenților patogeni capabili să sintetizeze micotoxinele.

## **4. Evaluarea coincidenței rezultatelor, obținute prin metode moleculare, cu rezultatele, obținute prin metode standard**

- Extragerea micotoxinelor din probele analizate anterior prin metoda PCR.
- Determinarea cantității de micotoxine în probe.
- Compararea rezultatelor obținute folosind metode de diagnostic molecular și metode standard pentru determinarea micotoxinelor și identificarea corelației dintre cantitatea de ADN a unui agent patogen sau a unei gene pentru sinteza micotoxinelor și conținutul micotoxinei însăși.

## 4. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor proiectului

### **1. Elaborarea primerilor specifici secvențelor de gene, implicate în sinteza micotoxinelor, și primerilor specifici fungilor-producenți de micotoxine (din g. *Fusarium*, *Aspergillus*, și *Penicillium*)**

A fost efectuată studierea datelor GenBank și căutarea secvențelor conservative a genelor, implicate în sinteza micotoxinelor, Analiza BLAST a primerilor creați, Studierea datelor GenBank și căutarea secvențelor conservative a genelor pentru identificarea fungilor-producenți de micotoxine (din g. *Fusarium*, *Aspergillus*, și *Penicillium*), Analiza BLAST a primerilor creați. Ca rezultat, au fost create și ordonate 22 de perechi de primeri pentru gene implicate în biosinteza

micotoxinelor (ocratoxină, patulină, fumonisină, aflatoxină, zearalenonă, T2 și DON) și 16 perechi de primeri pentru gene utilizate pentru taxonomia moleculară.

## **2. Testarea seturilor de primeri creați**

- A fost efectuată izolarea, purificarea și cuantificarea ADN-ului genomic din produse, contaminate cu mucegaiuri (tomate, grâu, porumb)

- PCR, nested-PCR și Real-time PCR pe ADN izolat din produse, contaminate cu mucegaiuri, cu seturile noi de primeri specifici pentru PCR-identificarea genelor, implicate în sinteza micotoxinelor, și optimizarea parametrilor PCR. În cazul PCR și nested-PCR - Electroforeza în gelul de agaroză și procesarea electroforegramelor (GelAnalyzer2010)

- PCR, nested-PCR și Real-time PCR pe ADN izolat din produse, contaminate cu mucegaiuri cu seturile noi de primeri specifici pentru identificarea fungilor-producenți de micotoxine și

optimizarea parametrilor PCR. În cazul PCR convențional și nested-PCR - Electroforeza în gelul de agaroză și procesarea electroforegramelor (GelAnalyzer2010)

Au fost elaborate protocoale PCR și RT-PCR pentru detectarea genelor, implicate în sinteza micotoxinelor. Aceste protocoale au fost utilizate în faza a treia a proiectului pentru a analiza distribuția producătorilor de micotoxine în produse alimentare în diferite etape de depozitare.

A fost efectuată identificarea fungilor filamentoși, detectați în produse pe parcursul depozitării, și corelarea cu datele despre evidențierea în aceste produse genelor, implicate în sinteza micotoxinelor

### **3. Analiza diseminării fungilor-producenți pe parcursul depozitării**

A fost selectată metoda optimă pentru izolarea ADN-ului din cereale. ADN-ul a fost izolat din probe de grâu, porumb, orz, fasole, năut în diferite perioade de depozitare (25 de probe). ADN-ul izolat a fost analizat folosind

- analiza PCR convențională, nested-PCR a ADN-ului izolat folosind primerii pentru gene de sinteză a micotoxinelor

- analiza PCR convențională, nested-PCR a ADN-ului izolat folosind primerii pentru gene utilizate pentru identificarea moleculară a agenților patogeni capabili să sintetizeze micotoxine.

- Analiza RT-PCR (în timp real) a ADN-ului izolat folosind primerii la gene pentru sinteza micotoxinelor

- Analiza RT-PCR (în timp real) a ADN-ului izolat folosind primerii pentru gene utilizate pentru identificarea moleculară a agenților patogeni capabili să sintetizeze micotoxine.

### **4. Evaluarea coincidenței rezultatelor, obținute prin metode moleculare, cu rezultatele, obținute prin metode standard**

S-a efectuat extracția micotoxinelor din probele analizate anterior prin PCR (aflatoxină totală și fumonisină B1).

S-a determinat cantitatea de micotoxine (aflatoxină totală și fumonisină B1) în probe.

- S-a făcut comparația rezultatelor obținute utilizând metode de diagnostic molecular și metode standard pentru determinarea micotoxinelor și identificarea unei corelații dintre cantitatea de ADN patogen sau gena de sinteză a micotoxinelor și conținutul micotoxinei în înseși.

## 5. Rezultatele obținute

Pentru identificarea microorganismelor capabile de sinteza micotoxinelor în produse alimentare, a fost aleasă metoda de reacție de polimerizare în lanț (PCR). Ca urmare a acestei reacții, se sintetizează un număr mare de copii ale fragmentelor specifice genei studiate, limitate de o pereche de primeri. Specificitatea și eficiența reacției PCR depinde de calitatea primerilor.

**Etapa 1. Elaborarea primerilor specifici secvențelor de gene, implicate în sinteza micotoxinelor, și primerilor specifici fungilor-producenți de micotoxine (din g. Fusarium, Aspergillus, și Penicillium)**

**Studierea datelor GenBank și căutarea secvențelor conservative a genelor, implicate în sinteza micotoxinelor**

Au fost studiate datele bibliografice ce descriu biosinteza a principalelor micotoxine, concentrația cărora în produsele alimentare este reglementată de baza legislativă în majoritatea țărilor. Au fost alese genele implicate în biosinteza micotoxinelor. Au fost analizate datele GenBank referitor la prezenta secvențelor a acestor gene în genomurile diferitor microorganisme-producenți de micotoxine. Au fost alese secvențele conservative ce permit design-ul primerilor pentru identificarea microorganismelor-producenți de micotoxine. Pentru PCR-identificarea patogenilor producenți de DON, T-2 au fost creați primeri în baza secvențelor genice implicate în sinteza tricotecenelor: trichothecene biosynthesis protein (TRI14) gene, TRI11, TRI8. Pentru identificarea producenților de aflatoxine a fost aleasă gena AflR. Pentru identificarea producenților de ocratoxina A au fost creați primeri în baza secvențelor genice ochratoxin A non-ribosomal peptide synthetase gene, pentru identificarea producenților de patulină — secvențele isoepoxydon dehydrogenase gene, producenților de zearalenonă — secvențele polyketide synthase (PKS13) gene. Design-ul primerilor a fost efectuat utilizând aplicația Soft Primer3.

**2 Analiza BLAST a primerilor creați.**

Secvențele primerilor, generați de aplicația Soft, au fost analizate cu ajutorul aplicației BLAST pentru verificarea specificității primerilor creați. În cazul de necorespondere cu criteriile de specificitate de referință, au fost creați primeri noi pentru genele alese.

Astfel au fost obținuți primeri elaborați în baza secvențelor de gene, implicate în sinteza micotoxinelor

**Tabelul 1. Primerii pentru gene implicate în sinteza micotoxinelor**

<b>Micotoxina</b>	<b>Gene de interes pentru designul primerilor</b>
Ocratoxina A	non-ribosomal peptide synthetase
Zearalenona	PSK13
Fumonisină B1	FUM1
Aflatoxina	AflR
T2, DON	Tri11

Acești primeri fac posibilă determinarea prezenței organismelor care conțin aceste gene în probe fără identificarea speciilor.

**Studierea datelor GenBank și căutarea secvențelor conservative a genelor pentru identificarea fungilor producenți de micotoxine (din g. Fusarium, Aspergillus, și Penicillium)**

Au fost studiate datele bibliografice referitor la taxonomia moleculară a microorganismelor-produse de micotoxine. Au fost analizate datele GenBank și alese secvențe conservative intragenice, utilizate pe larg în taxonomie. Pentru identificarea a diferitor specii din genul *Fusarium* au fost creați primeri în baza secvențelor genice: beta-tubulin gene, RNA polymerase II subunit (RPB2) gene, translation elongation factor 1-alpha gene. Pentru identificarea speciilor din genul *Aspergillus* și *Penicillium* au fost creați primeri în baza secvenței genice de beta-tubulină. Design-ul primerilor a fost efectuat utilizând aplicația Soft Primer3.

#### **Analiza BLAST a primerilor creați.**

Secvențele primerilor, generați de Primer3, au fost analizate cu ajutorul aplicației BLAST pentru verificarea specificității primerilor creați. În cazul de necorespondere cu criteriile de specificitate de referință, au fost creați primeri noi pentru genele alese.

Mai jos, în tabelul 2, sunt prezentați primerii testați experimental pentru analiza RT-PCR, elaborați pe baza secvențelor de gene, utilizate în taxonomia moleculară.

**Tabelul 2. Primeri pentru gene utilizate pentru identificarea speciilor**

<b>Microorganisme</b>	<b>Gene de interes pentru designul primerilor</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	aflQ (ord1)
<i>Aspergillus flavus</i>	aflP
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflP
<i>Fusarium verticillioides</i>	fum6
<i>Fusarium proliferatum</i>	fum6
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Beta-tubulin
<i>Penicillium citrinum</i>	Beta-tubulin
<i>Fusarium equiseti</i>	PSK13, TEF-1
<i>Microdochium nivale</i> ( <i>Fusarium nivale</i> )	polymeraseII large subunit
<i>Fusarium equiseti, incarnatum</i>	Beta-tubulin
<i>Fusarium incarnatum</i>	TEF-1
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	TEF-1

#### **Etapa 2. Testarea seturilor de primeri creați**

A fost izolat, purificat și cuantificat (spectrofotometru NanoDrop) ADN-ului genomic din grâu, porumb, orz și tomate, contaminate cu mucegaiuri. Calitatea ADN-ului purificat a fost evaluată prin electroforeza în gel de agaroză, precum și raportul densității optice la o lungime de undă de 260/280 și 260/230 nm.

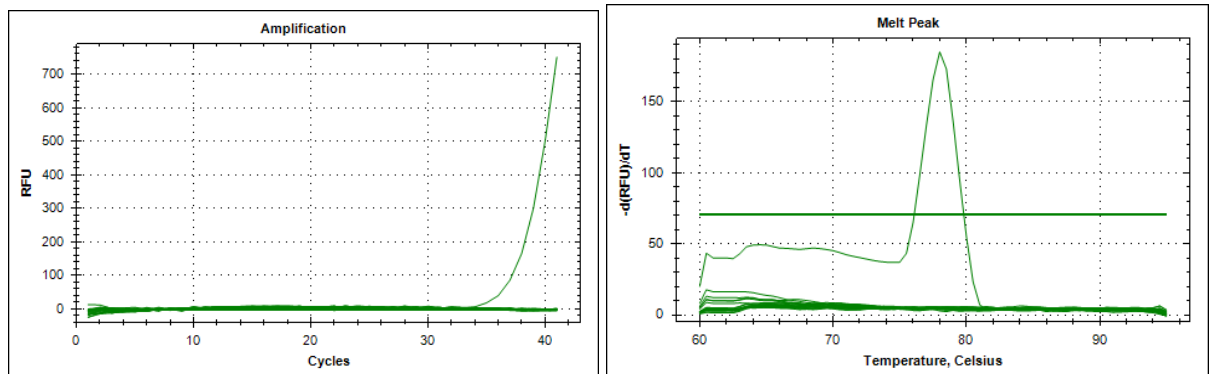
A fost efectuată analiză PCR (PCR, RT-PCR și nested PCR) pe ADN izolat din produse, contaminate cu mucegaiuri, cu seturile noi de primeri specifici pentru PCR-identificarea genelor, implicate în sinteza micotoxinelor. Parametrele PCR (RT PCR și nestedPCR) au fost optimizate. Au fost obținute grafice de amplificare și disociere pentru primerii analizați.

În cele ce urmează este descris un test experimental de primeri pentru gene implicate în sinteza micotoxinelor care pot determina simultan prezența a cel puțin uneia dintre mai multe specii care conțin această genă.

Pentru fiecare pereche de primeri s-au obținut grafice de amplificare (amplification) și disociere (melt peak). Graficul de amplificare este dependența valorilor unităților de fluorescență relative (RFU) de numărul de cicluri PCR. O reacție pozitivă este determinată de acumularea semnalului de fluorescență. În absența ADN-ului țintă în probă, fluorescența nu depășește nivelul de fundal, iar graficul este o linie dreaptă.

Diagrama de disociere este o evaluare a proprietăților de disociere ale fragmentului amplificat și arată la ce temperatură ADN-ul monocatenar disociat se leagă de catena sa complementară și devine dublu-catenar. Această temperatură depinde de caracteristicile (lungimea și secvența) fragmentului de ADN însuși, adică, prin natura vârfurilor curbei de disociere, se poate concluziona despre numărul, lungimea și secvența fragmentelor sintetizate.

Figura 1 prezintă graficele de amplificare (stânga) și disociere (dreapta) pentru o pereche de primeri pentru gena TRI11 (*Fusarium sporotrichioides, sibiricum, langsethiae*), care este implicată în biosinteza micotoxinelor DON și T2, obținute ca urmare de analiza PCR în timp real a probelor de grâu. Se poate observa că graficele de amplificare a probelor care nu conțin această genă sunt o linie dreaptă, iar graficul de amplificare a unei probe care conține gena TRI11 arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantitatea fragmentului amplificat. Diagrama de disociere arată un vârf unic clar definit cu un punct de topire de 78 de grade, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.

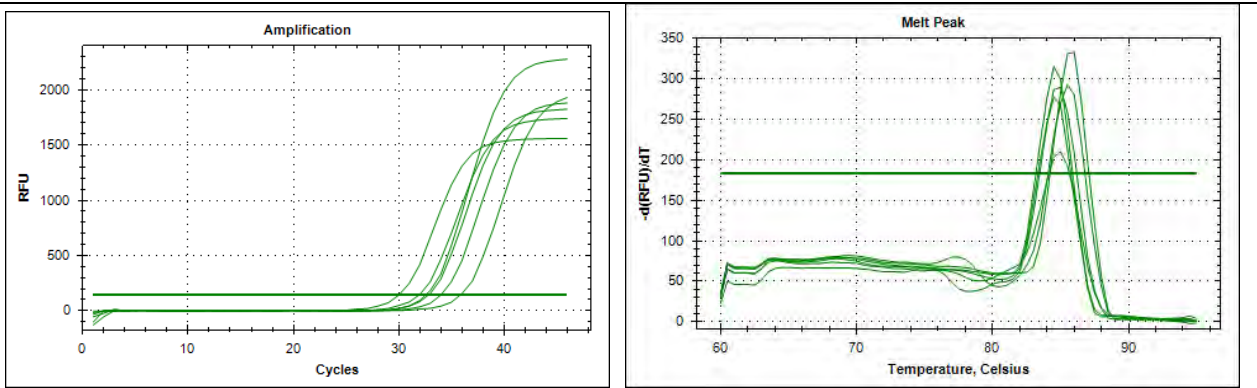


**Figura 1. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena TRI11 pe probe de ADN izolat din boabe de grâu.**

Figura 2 prezintă graficele de amplificare și disociere pentru o pereche de primeri pentru gena PSK13 (*F. equiseti*), care este implicată în biosinteza micotoxinei zearalenonei, obținută ca urmare a analizei PCR în timp real a grâului, orzului și probelor de porumb. Graficele de disociere prezintă un vârf unic distinct, cu un punct de topire de aproximativ 84 de grade, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.

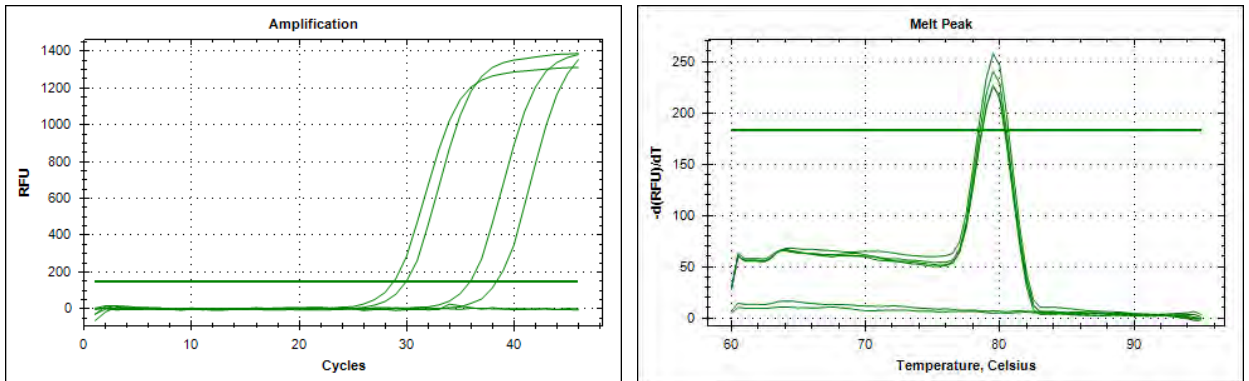
Diferențele minore în punctele de topire ale fragmentelor amplificate în diferite eșantioane par să indice că diferite eșantioane sunt infectate cu diferite specii de *F. equiseti*.





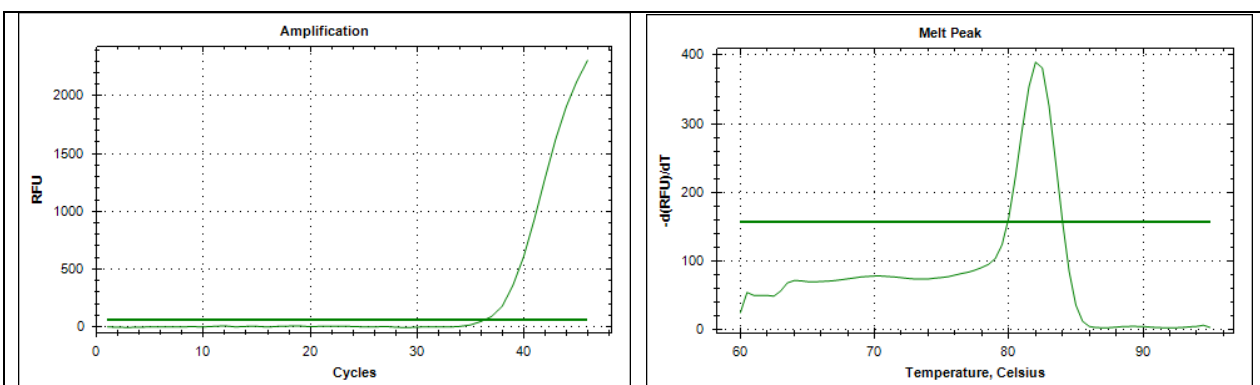
**Figura 2. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena PSK13 pe probe de ADN izolat din grâu, orz și porumb.**

Mai jos, în Figura 3, sunt prezentate graficele de amplificare și disociere pentru o pereche de primeri pentru gena ochratoxin non-ribosomal peptide synthetase gene (g. *Penicillium*, *Aspergillus*), care este implicată în biosinteza micotoxinei ochratoxinei A, obținută ca rezultat a analizei PCR în timp real a probelor de boabe de grâu, orz și porumb. Se poate observa că graficele de amplificare a probelor care nu conțin această genă sunt o linie dreaptă, iar graficele de amplificare a probelor care conțin ochratoxin non-ribosomal peptide synthetase gene arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantitatea a fragmentului amplificat. Graficul de disociere prezintă un vârf unic clar definit cu un punct de topire de 80 de grade, care indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.



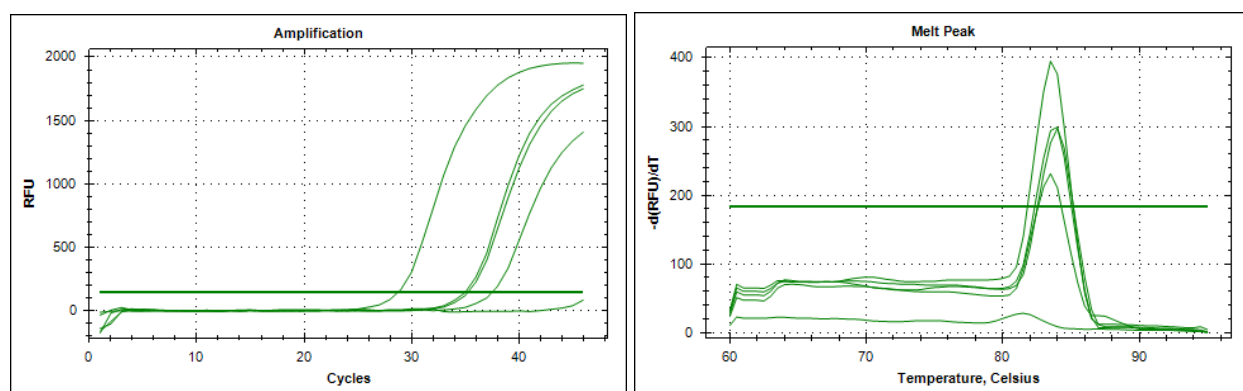
**Figura 3. Graficele de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru ochratoxin non-ribosomal peptide synthetase gene pe probe de ADN izolat din grâu, orz și porumb.**

Mai jos, în Figura 4, sunt reprezentate graficele de amplificare și disociere pentru o pereche de primeri pentru gena AflR (*A. parasiticus*, *flavus*), implicată în biosinteza aflatoxinelor, obținute ca rezultat al analizei PCR în timp real a probelor de boabe de porumb.



**Figura 4. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena AfIR pe probe de ADN izolate din bobul de porumb.**

Următoarele (Figura 5) sunt grafice de amplificare și disociere pentru o pereche de primeri pentru gena FUM1 (*F. proliferatum*, *F. verticillioides*), care este implicată în biosinteza fumonisinei B1, obținută ca urmare a analizei PCR în timp real a probelor de grâu, porumb, orz. Se poate vedea că graficele amplificării probelor fără această genă sunt o linie dreaptă, iar graficele amplificării probelor care conțin gena FUM1 arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantitatea fragmentului amplificat. Graficul de disociere prezintă un vârf unic clar definit cu un punct de topire de 84 de grade, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.

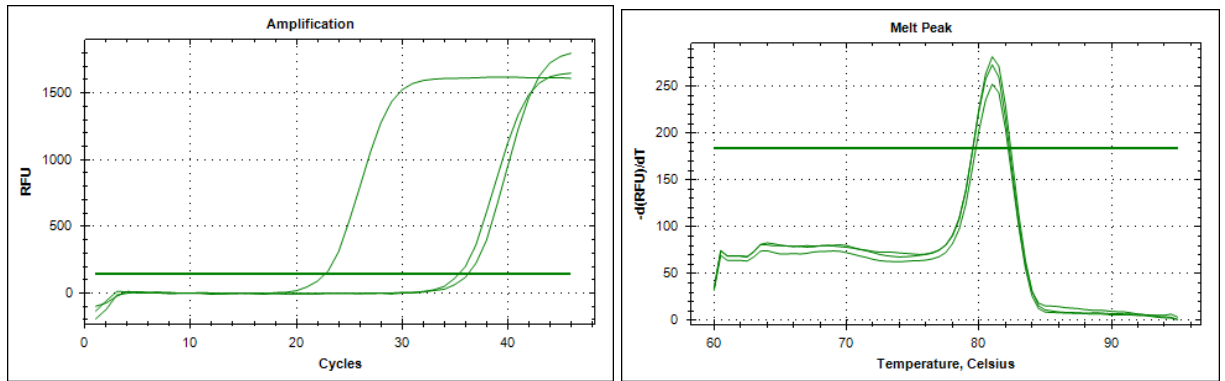


**Figura 5. Graficele de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de grunduri pentru gena FUM1 pe probe de ADN izolate din porumb, orz, grâu.**

Astfel, am testat experimental primerii, elaborați pe baza secvențelor de gene, implicate în sinteza micotoxinelor, capabili să determine simultan prezența a cel puțin uneia dintre mai multe specii care conțin această genă. Pentru fiecare pereche de primer, s-au construit grafice de amplificare și disociere.

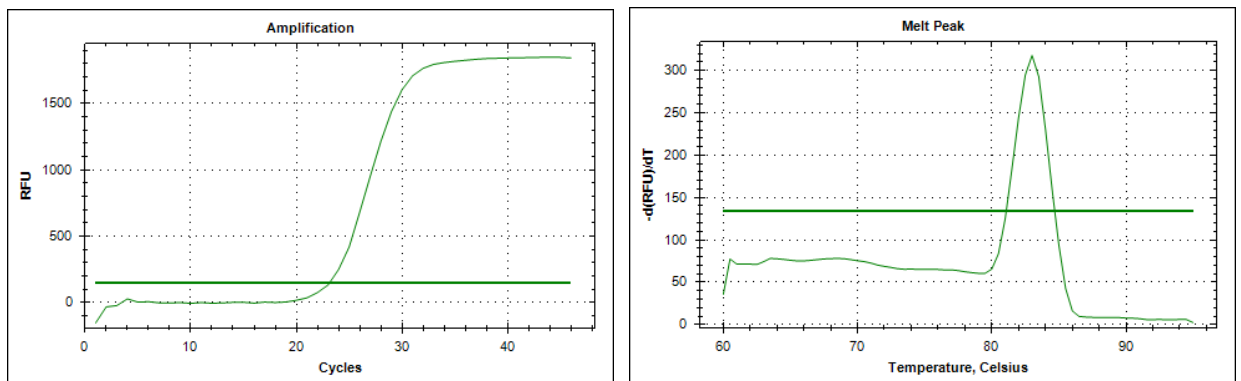
Următoarele sunt rezultatele testării experimentale a primerilor pentru identificarea speciilor de mucegaiuri capabile să producă micotoxine, pe baza genelor implicate în sinteza micotoxinelor. Următoarea figură (Figura 6) prezintă rezultatele testării unei perechi de primeri specifici genei AfIQ, *A.flavus*. Mucegaiurile acestei specii pot fi capabile să sintetizeze aflatoxine. Graficul de

disociere arată un vârf unic clar definit cu un punct de topire de 81 de grade, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de grund testate.



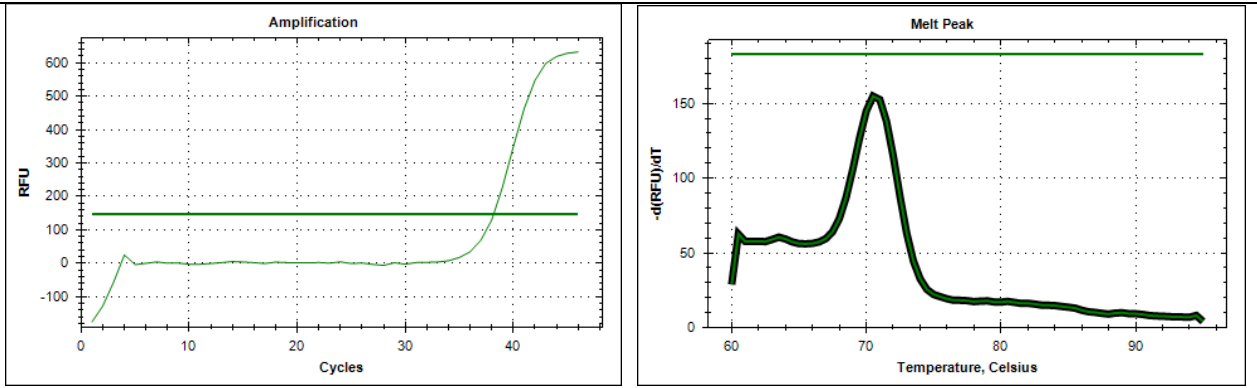
**Figura 6. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena *A.flavus* AflQ pe probe de ADN izolate din boabe de porumb.**

Figura următoare (Figura 7) prezintă rezultatele testării unei perechi de primeri pentru identificarea *A. flavus* pentru gena AflP. La fel ca în cazul anterior, graficul de disociere prezintă un vârf unic bine definit cu un punct de topire de 83 de grade, ceea ce confirmă omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.



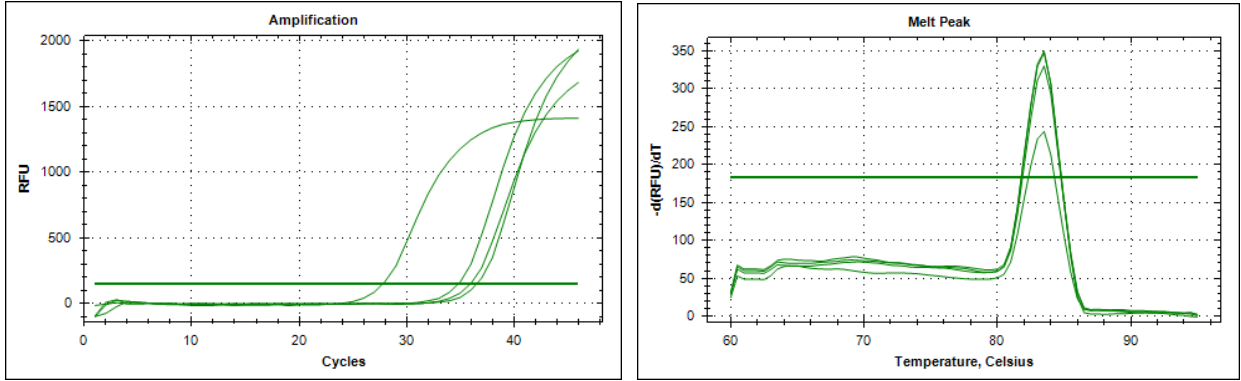
**Figura 7. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena *A.flavus* AflP pe probe de ADN izolat din boabe de porumb.**

Următoarea figură (Figura 8) prezintă graficele de amplificare și disociere a unei perechi de primeri pentru identificarea *A. parasiticus* în baza genei AflP. Analizând graficul de disociere, un singur vârf cu un punct de topire de 71 de grade poate fi folosit pentru a trage o concluzie despre omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.

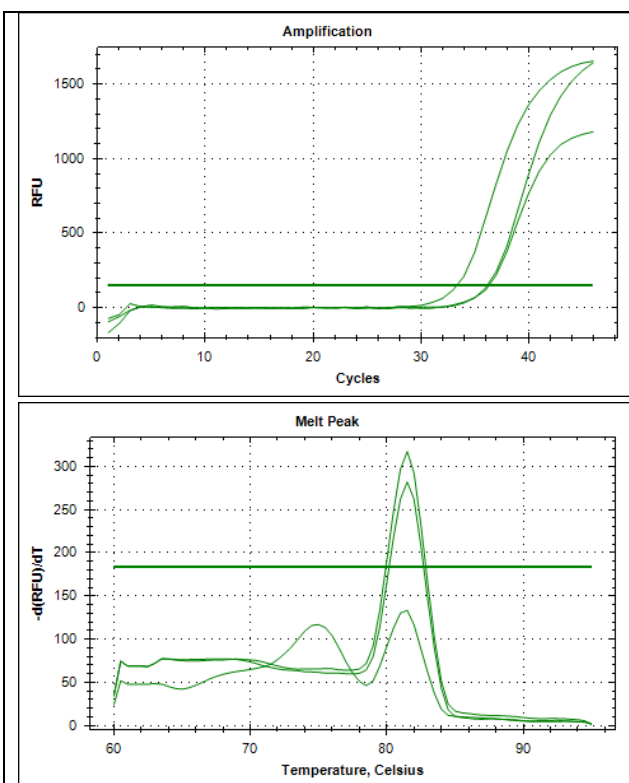


**Figura 8. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena *A. parasiticus* AfIP pe probe de ADN izolat din boabe de porumb.**

Figurile 9 și 10 arată rezultatele verificării perechilor de primeri pentru identificarea *F. verticillioides* (Fig. 9) și *F. proliferatum* (Fig. 10) capabile să sintetizeze fumonisine pentru gena *fum6*.



**Figura 9. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena *F. verticillioides* *fum6* pe probe de ADN izolat din boabe de porumb.**



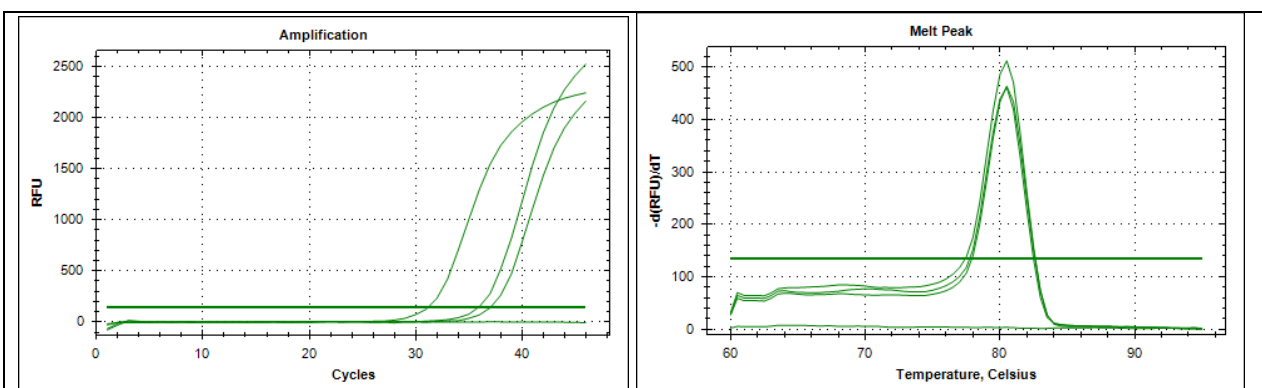
**Figura 10. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena *F. proliferatum* fum6 pe probe de ADN izolat din boabe de porumb.**

Se poate observa că graficele amplificării probelor care conțin gena FUM6 arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantității fragmentului amplificat. Graficul de disociere prezintă un vârf unic distinct cu un punct de topire de 83 de grade pentru perechea specifică pentru *F. verticillioides* fum6, care indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate. În ceea ce privește graficele de disociere construite pentru perechea de primeri fum6 de *F. proliferatum*, punctul de topire de vârf corespunde cu 81 de grade. Într-o probă, se observă un pic suplimentar mic la o temperatură corespunzătoare la 74 de grade, ce poate fi cauzat de o concentrație suboptimală de primeri din această probă și de formarea dimerilor de primeri sau de prezența unui amplicon nespecific.

Astfel, am testat experimental perechi de primeri, elaborați pe baza secvențelor de gene, implicați în sinteza micotoxinelor, convenabile pentru identificarea speciilor de fungi micotoxigenici. Pentru fiecare pereche de primeri s-au construit grafice de amplificare și disociere.

Următoarele sunt rezultatele testării experimentale a primerilor pentru identificarea speciilor de mucegaiuri capabile să producă micotoxine, pe baza genelor care nu sunt implicate în sinteza micotoxinelor, dar sunt utilizate pe scară largă în taxonomia moleculară.

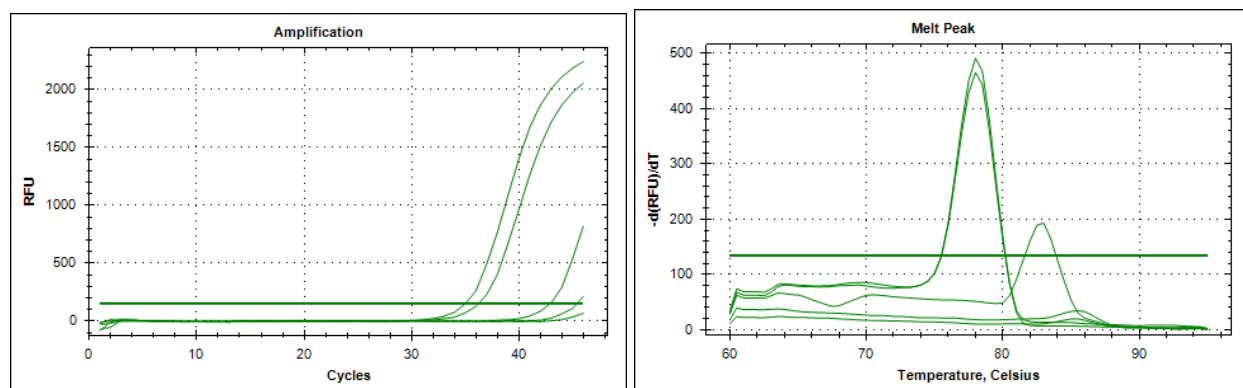
Următoarea figură (Figura 11) prezintă rezultatele testării unei perechi de primeri pentru identificarea *A. ochraceus* capabil să sintetizeze ocratoxine la gena beta-tubulinei.



**Figura 11. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena *A. ochraceus* de beta-tubulină pe probe de ADN izolat din boabe de porumb.**

Se poate observa că graficele amplificării probelor care nu conțin această genă sunt o linie dreaptă, iar graficele amplificării probelor care conțin gena *A. ochraceus* de beta-tubulină prezintă o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantității fragmentului amplificat. Graficul de disociere a tuturor probelor pozitive arată un vârf unic pronunțat cu un punct de topire de 80 de grade. Aceasta indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.

Figura 12 prezintă rezultatele testării unei perechi de primeri pentru identificarea *P. citrinum* capabil să sintetizeze citrulina la gena beta-tubulinei.

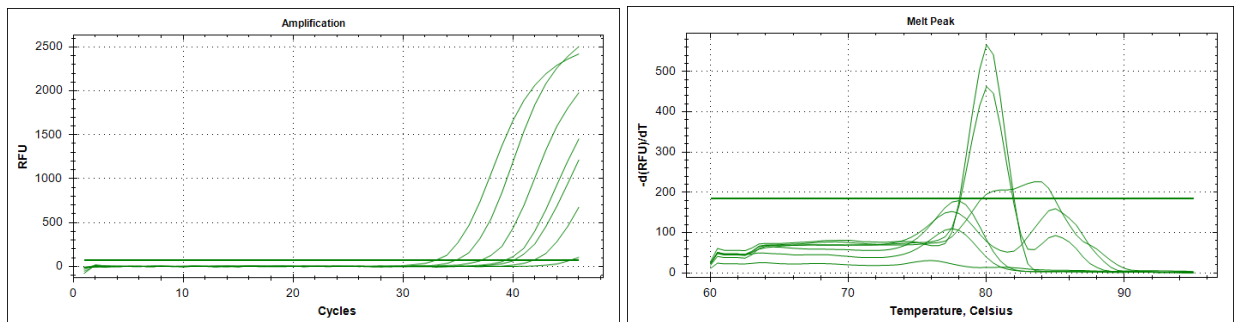


**Figura 12. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena beta-tubulinei *P. citrinum* pe probe de ADN izolat din boabe de porumb.**

Analizând datele graficelor de disociere construite pentru o pereche de primeri pentru gena beta-tubulinei a *P. citrinum*, se poate vedea că în două probe există vârfuri clar pronunțate care corespund unui punct de topire de 79 de grade, corespunzător unui fragment specific. Într-una dintre probe există un vârf mic corespunzător unei temperaturi de 83 de grade. Având în vedere acest lucru, precum și faptul că, conform programului de amplificare, sinteza acestui fragment a început după ciclul 40, se poate concluziona că acesta este un fragment nespecific, mai lung.

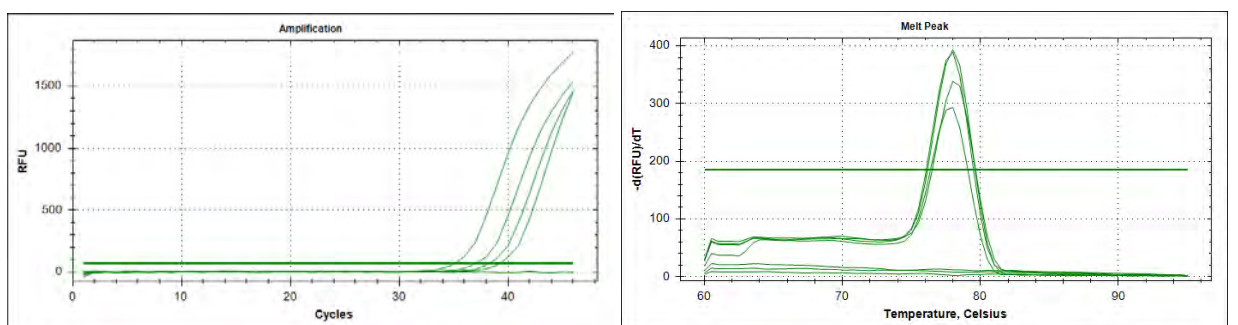
Mai jos sunt rezultatele testării perechilor de primeri specifice diferitelor specii din genul *Fusarium*: *F. nivale* (micotoxină DON), *F. equiseti* (T2), *F. incarnatum* (T2), *F. sporotrichioides* (DON).

În Figura 13 sunt prezentate grafice de amplificare și disociere pentru o pereche de primeri pentru gena subunității mari a polimerazei II (*F. nivale*), obținută ca rezultat al analizei PCR în timp real a probelor de grâu, porumb, orz. Se poate observa că graficele amplificării eșantioanelor fără această genă sunt o linie dreaptă, iar graficele de amplificarea eșantioanelor care conțin gena subunității mari a polimerazei II (*F. nivale*) arată o creștere exponențială a fluorescenței. Graficul de disociere arată în două eșantioane un vârf unic bine definit cu un punct de topire de 80 de grade și în alte eșantioane vârfuri slab pronunțate, corespunzătoare aparent amplificării nespecifice.



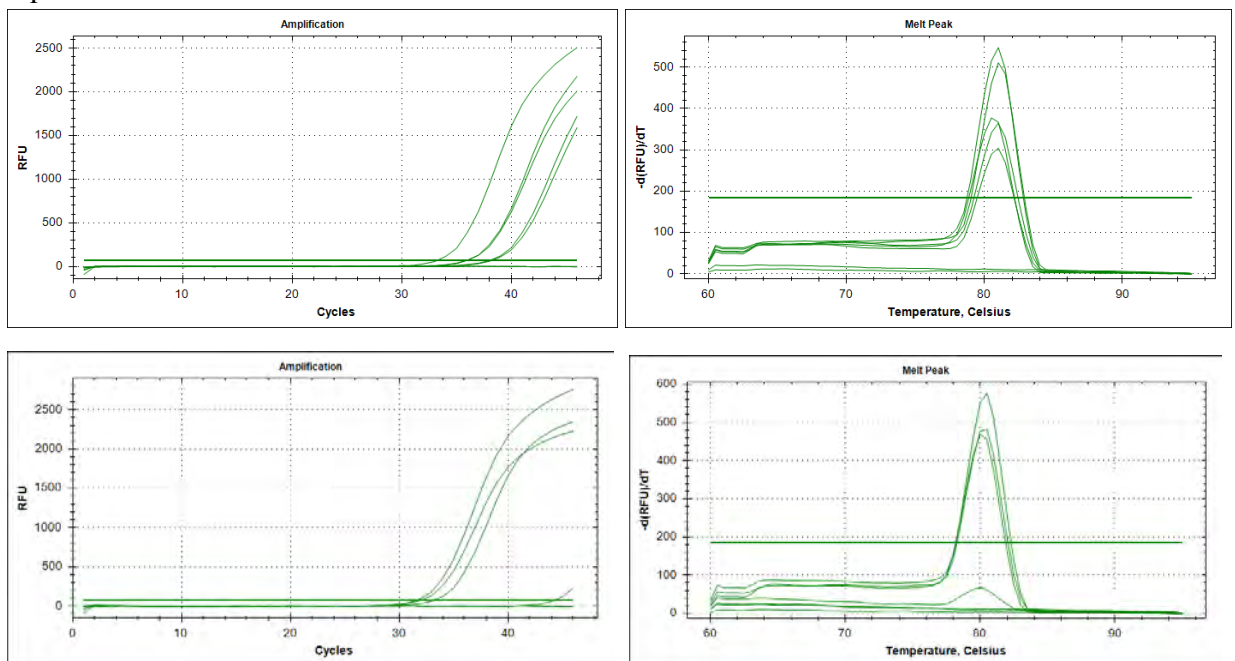
**Figura 13. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena subunității mari a polimerazei II (*F. nivale*) pe probe de ADN izolate din porumb, grâu, orz.**

Figura 14 prezintă graficele de amplificare și disociere pentru o pereche de primeri pentru gena beta-tubulinei (*F. equiseti*, *F. incarnatum*), obținută ca rezultat al analizei PCR în timp real a probelor de grâu, porumb și orz. Se poate observa că graficele amplificării probelor fără această genă sunt o linie dreaptă, iar graficele amplificării probelor care conțin gena beta-tubulinei (*F. equiseti*, *F. incarnatum*) arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică, cantității de fragment amplificat. Graficul de disociere prezintă un vârf unic pronunțat cu un punct de topire de 79 de grade pentru o pereche specifică pentru beta-tubulină a *F. equiseti*, *F. incarnatum*, care indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.



**Figura 14. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena beta-tubulinei (*F. equiseti*, *F. incarnatum*) pe probe de ADN izolat din boabe de porumb, grâu, orz.**

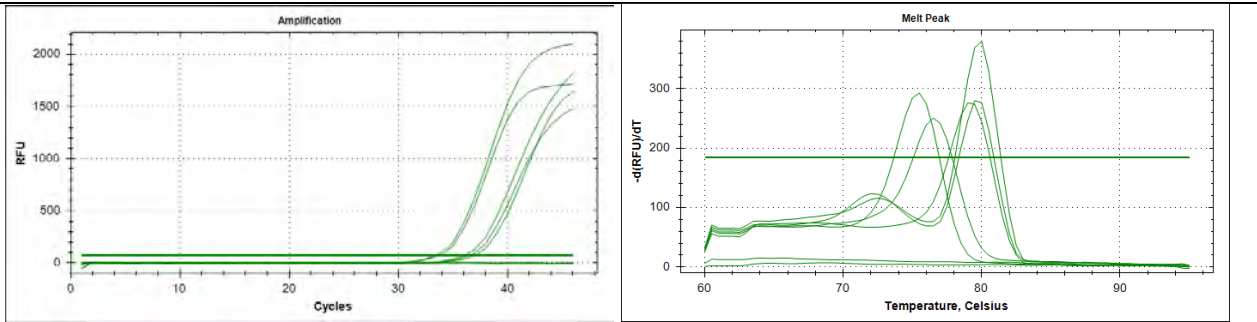
Mai departe (Figura 15) sunt prezentate graficele de amplificare și disociere pentru două perechi de primeri pentru gena *F. equiseti* TEF-1, obținută ca rezultat al analizei PCR în timp real a probelor de grâu, porumb, orz. Se poate observa că graficele amplificării eşantioanelor care nu conțin această genă sunt o linie dreaptă (fără amplificare), iar graficele amplificării eşantioanelor care conțin gena TEF-1 a lui *F. equiseti* arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantității de fragment amplificat. Graficul de disociere arată un vârf pronunțat unic cu un punct de topire de 80 de grade pentru o pereche specifică fragmentului amplificat de TEF-1 a *F. equiseti*



**Figura 15. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena TEF-1 a *F. equiseti* pe probe de ADN izolat din porumb, grâu, orz.**

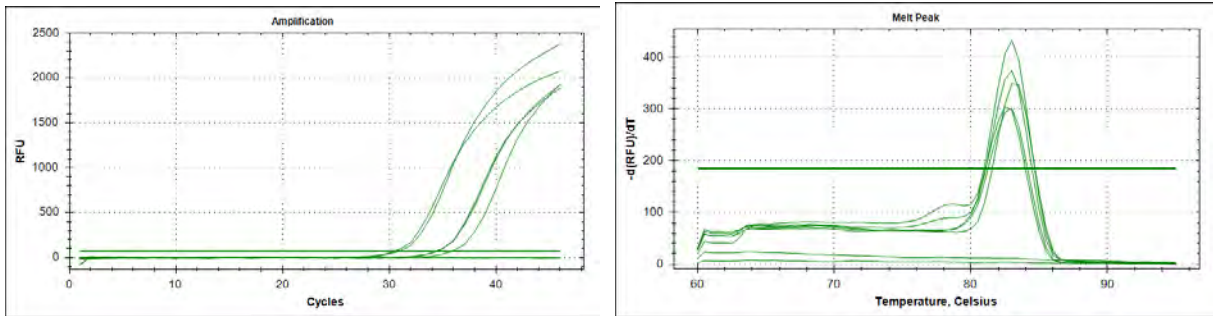
Figura 16 prezintă graficele de amplificare și disociere pentru două perechi de primeri pentru gena TEF-1 a *F. incarnatum*, obținută ca urmare a analizei PCR în timp real a probelor de boabe de grâu, porumb și orz. Se poate observa că graficele amplificării probelor care nu conțin această genă sunt o linie dreaptă, iar graficele amplificării probelor care conțin gena TEF-1 a *F. incarnatum* prezintă o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantității de fragment amplificat. Cu toate acestea, analiza graficelor de disociere arată sinteza unui fragment cu un punct de topire de 80 de grade în trei eşantioane, un fragment cu un punct de topire de 76 de grade într-o probă și un fragment cu un punct de topire de 75 de grade într-o altă probă. Acest lucru poate fi cauzat atât de polimorfismul secvențelor acestei gene în diferite probe de *F. incarnatum* găsite în diferite tipuri de cereale, cât și de legarea nespecifică a primerilor.





**Figura 16. Grafice de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena TEF-1 a *F. incarnatum*, pe probe de ADN izolat din porumb, grâu, orz.**

Mai jos (Fig. 17) sunt prezentate grafice de amplificare și disociere pentru două perechi de primeri pentru gena TEF-1 a *F. sporotrichioides*, obținute ca rezultat al analizei PCR în timp real a probelor de grâu, porumb și orz. Se poate observa că graficele amplificării probelor fără această genă sunt o linie dreaptă, iar graficele amplificării probelor care conțin gena TEF-1 a *F. sporotrichioides* arată o creștere exponențială a fluorescenței, adică cantității de fragment amplificat. Graficul de disociere prezintă un vârf unic distinct cu un punct de topire de 83 de grade pentru perechea specifică fragmentului amplificat *F. sporotrichioides* TEF-1, care indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate.



**Figura 17. Graficele de amplificare și disociere a fragmentelor obținute ca rezultat al PCR în timp real folosind o pereche de primeri pentru gena TEF-1 a *F. sporotrichioides*, pe probe de ADN izolat din porumb, grâu, orz.**

Astfel, ca rezultat al acestei lucrări, s-a demonstrat experimental că primerii pe care i-am creat sunt adecvați pentru detectarea genelor pentru sinteza diferitelor micotoxine din probele de boabe.

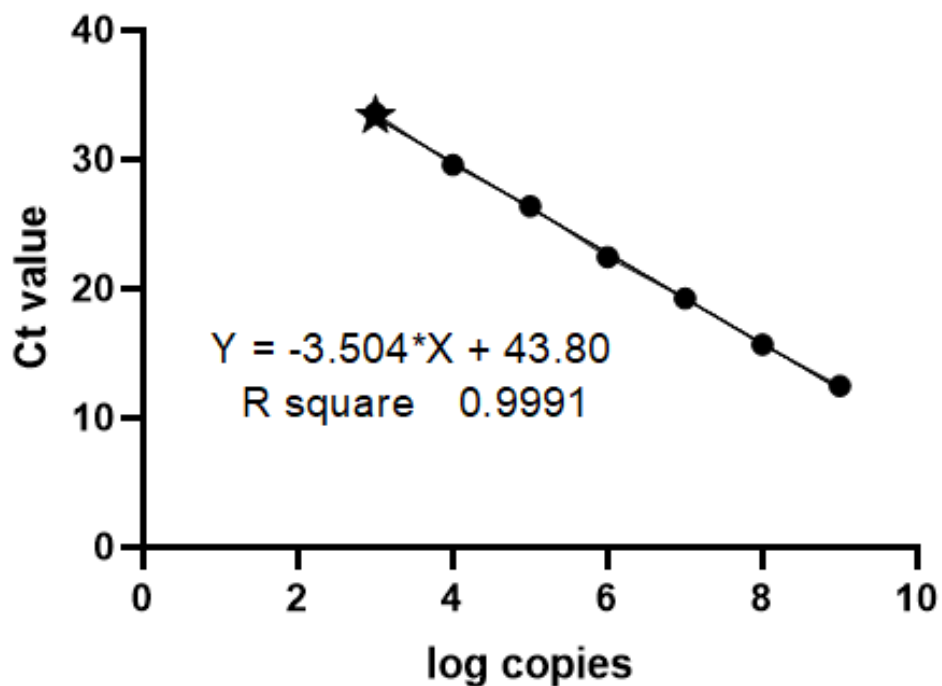
Pentru unii primeri (perechile de primeri pentru gena fum6 a *Fusarium verticillioides*, implicată în sinteza fumonisinei) a fost calculată eficacitatea și construită curba standard de etalonare pentru analiza cantitativă. Pentru determinarea cantitativă a speciilor de *Fusarium* în probe de porumb, primerii specifici genei fum6 a *Fusarium verticillioides* și genei de beta-tubulină, capabili să detecteze o serie de specii din genul *Fusarium* (*Fusarium spp.*).

Pentru cuantificare, un fragment din gena FUM6 a fost sintetizat anterior prin PCR convențional. S-a efectuat electroforeza, s-a excizat o secțiune din gel care conține un fragment de lungimea așteptată, fragmentul a fost eluat din gel și purificat. Concentrația ADN-ului a fost determinată spectrofotometric și numărul de copii ale fragmentului amplificat în 1 ng de ADN a

fost calculat folosind un calculator online, cunoscând lungimea fragmentului sintetizat. Apoi, cunoscând numărul de copii în 1 ng de standard ADN, s-au pregătit diluții în serie ale ADN standard. Diluțiile seriale ale standardului au fost analizate prin PCR în timp real, împreună cu probele testate.

Pentru fiecare reacție PCR în timp real, aparatul afișează valoarea Ct (pragul ciclului). Ct este numărul de cicluri necesare pentru ca graficul de fluorescență să treacă nivelul pragului (adică depășește valorile de fundal). Valoarea Ct este invers proporțională cu cantitatea de ADN țintă din eșantion, adică cu cât concentrația genei analizate în eșantion este mai mare, cu atât este mai mică valoarea Ct.

Diluțiile seriale ale standardului ADN cu numărul de copii cunoscut au fost analizate prin PCR în timp real, valorile Ct au fost înregistrate și utilizate pentru a construi o curbă standard. În același timp, ADN-ul boabelor din patru plante individuale (probele 1, 2, 3, 4) a fost testat pentru prezența genei FUM6 cu această pereche de primeri. Aceste rezultate sunt prezentate în Figura 18. Eficiența calculată a primerilor pentru pantă este de 93%.



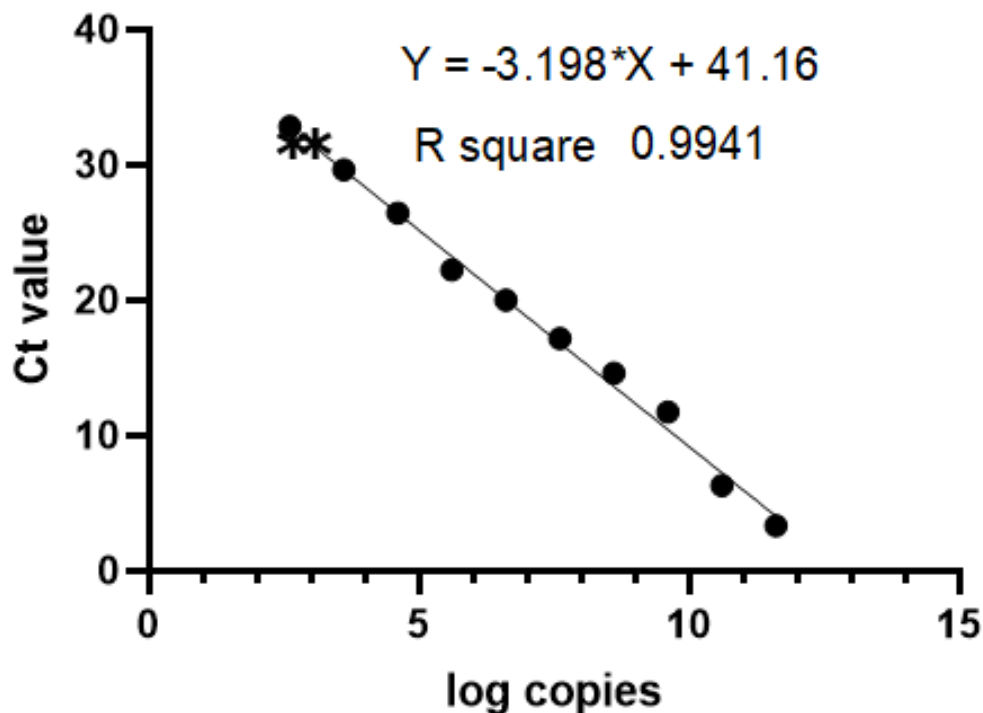
**Figura 18. Relația dintre numărul de copii inițial al șablonului din reacție și valoarea Ct pentru perechea de primeri specifici genei FUM6. Steaua indică valoarea logaritmică a copiilor/ valoarea Ct a genei FUM6 din proba de porumb 1 care a dat semnal pozitiv cu această pereche de primeri.**

Una din patru probe de porumb (proba 1) a fost testată pozitiv pentru gena FUM6. Folosind relația, am putea calcula numărul de copii ale genei FUM6 din acest eșantion. Valoarea

medie Ct a 3 replici tehnice a fost de 33,37, ceea ce corespunde la aproximativ 780 de exemplare pe 20 ng de ADN de intrare. Acest lucru este arătat de o stea în grafic (Figura 18).

Apoi am vrut să testăm aceleași probe folosind primeri pentru *Fusarium spp.* Pentru cuantificare, un fragment din gena beta-tubulinei a *Fusarium* a fost sintetizat anterior utilizând PCR convențional. Produsul de reacție PCR a fost analizat prin electroforeză în gel de agaroză, secțiunea gelului care conține fragmentul de lungimea așteptată a fost excizată, fragmentul a fost eluat din gel și purificat. Concentrația ADN-ului a fost determinată spectrofotometric și numărul de copii ale unui fragment de ADN de 1 ng a fost calculat folosind un calculator online, cunoscând lungimea fragmentului sintetizat. Apoi, cunoscând numărul de copii în 1 ng de standard ADN, s-au pregătit diluții consecutive ale ADN-lui standard. Diluțiile seriale ale standardului au fost analizate prin PCR în timp real, împreună cu probele testate.

Deci, diluțiile seriale ale standardului ADN cu numărul de copii cunoscut au fost analizate prin PCR în timp real, valorile Ct au fost înregistrate și utilizate pentru a construi o curbă standard. Eficiența calculată a primerilor pentru panta este de 105%. Graficul dependenței valorii Ct de numărul logaritmic al copiilor genetice este prezentat în Figura 19.

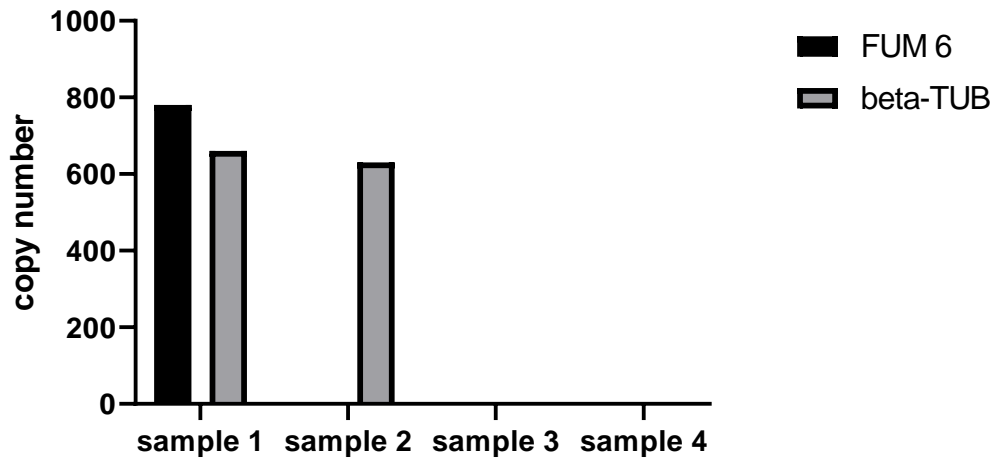


**Figura 19. Relația dintre numărul de copie inițial al șablonului din reacție și valoarea Ct pentru perechea de primeri specifică genei beta-tubulinei a *Fusarium*. Stelele indică valoarea logaritmică a copiilor / valoarea Ct a genei beta-tubulină a *Fusarium* în probele de porumb 1 și 2 care au dat semnal pozitiv cu această pereche de primeri.**

Două din patru probe de porumb au fost testate pozitiv pentru gena beta-tubulinei a *Fusarium*. Folosind relația, am putea calcula numărul de copii ale acestei gene în aceste probe.

Valoarea medie Ct a 3 replici tehnice a fost de 32,12 pentru un eșantion și 32,34 pentru celălalt eșantion pozitiv. Aceasta corespunde la aproximativ 650 de copii pe 20 ng de ADN de intrare.

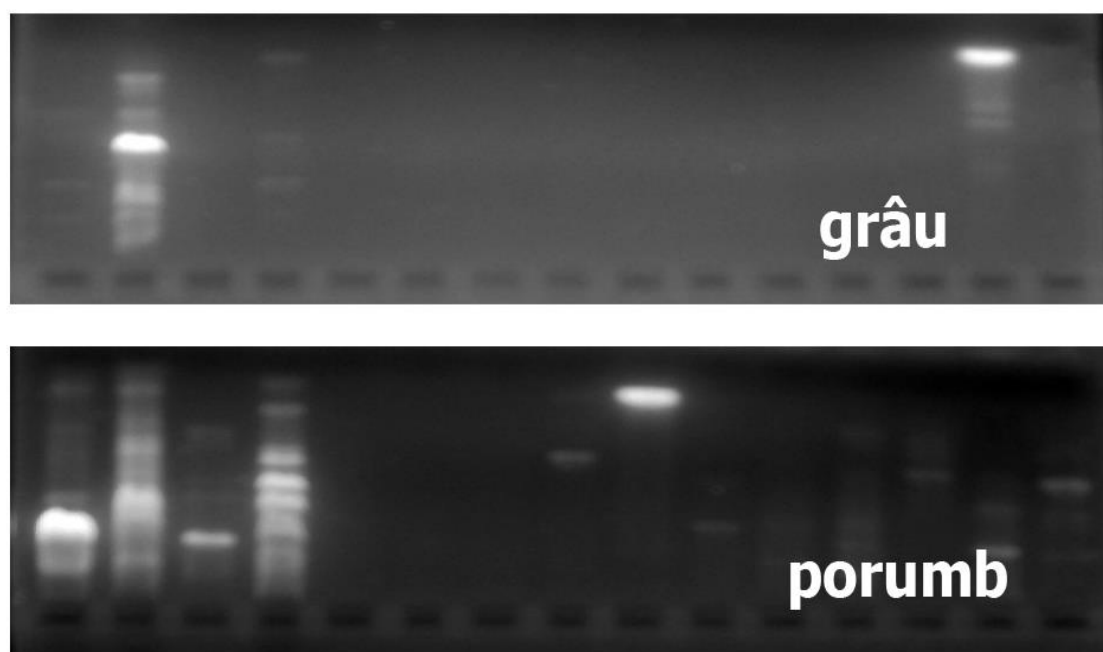
Datele rezumate ale analizei qPCR a patru probe de porumb sunt prezentate în figura 20.



**Figura 20. Date rezumate ale analizei qPCR a patru probe de porumb.**

După cum se poate vedea, în primul eșantion ambele perechi de primeri au dat un semnal pozitiv, ceea ce înseamnă că atât FUM6 al *Fusarium verticillioides* (gena implicată în sinteza micotoxinelor), cât și gena beta-tubulinei a *Fusarium spp.* (gena neimplicată în sinteza micotoxinelor) sunt prezente în probă. Numărul de copii al fragmentelor detectate este foarte apropiat, deci, presupunând că ambele gene sunt prezente în genom într-o singură copie, se poate presupune că tot *Fusarium* prezent în prima probă de porumb este *Fusarium verticillioides* conținând gena FUM6 și, astfel, este micotoxigenic. A doua probă de porumb a fost pozitivă numai pentru gena a *Fusarium* de beta-tubulină, dar nu și pentru *Fusarium verticillioides* FUM6. Deci, această probă este probabil contaminată cu o altă specie de *Fusarium*. Celelalte două probe (3 și 4) nu au fost testate pozitiv pentru niciuna dintre gene, ceea ce înseamnă că probabil probele nu au fost infectate cu *Fusarium*.

În plus față de PCR în timp real și PCR cantitativă în timp real, analiza nested-PCR a fost efectuată folosind primeri pentru gene care nu sunt implicate în sinteza micotoxinelor. Mai jos (Fig. 21) este prezentată o electroperogramă a analizei nested-PCR a probelor de grâu și porumb folosind perechi de primeri pentru gena beta-tubulin a diferitelor specii de fungi.



**Figura 21. Electroferograma rezultatelor analizei nested-PCR a probelor de grâu și porumb folosind primeri pentru (gena beta-tubulin (btub)) a matricei din speciile de *Penicillium* și *Fusarium***

În probele de grâu s-au găsit *Penicillium citrinum* și *Fusarium pseudograminearum* (gena beta-tubulin (btub)), în probele de porumb - *Penicillium citrinum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum* (gena beta-tubulin (btub)).

### 3. Analiza diseminării fungilor-producenți pe parcursul depozitării

Pentru a analiza distribuția mucegaiurilor, potențialii producători de micotoxine în alimente în timpul depozitării, probele de grâu, orz și porumb din diferite perioade de depozitare au fost analizate prin PCR folosind primeri pentru gene implicate în sinteza micotoxinelor, precum și primeri pentru identificarea specifică a producătorilor de micotoxine. Am folosit următoarele mostre:

**Tabelul 3. Probele de grâu, triticales, orz, porumb**

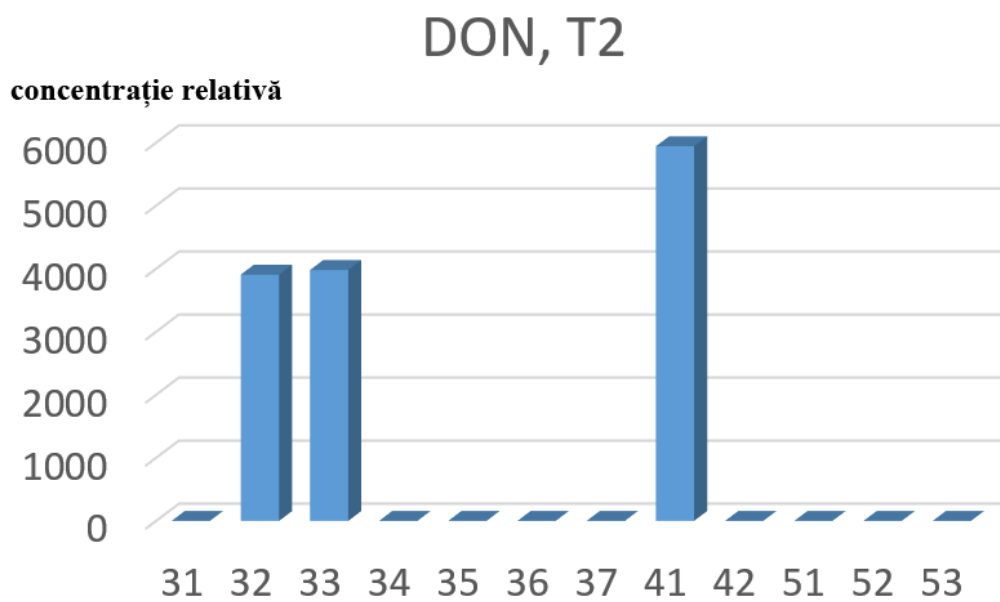
№	Denumirea	Anul recoltării
31	Grâu (Moldova 614)	2019
32	Grâu (Kuialnic)	2019
33	Triticale de iarnă	2018
34	Grâu moale	2018
35	Grâu de iarnă	2016
36	Grâu de iarnă	2016
37	Grâu de vară Arnaut 7	2014

41	Orz Vitanta	2013
42	Orz Vitanta	2014
51	Porumb	2017
52	Porumb	2011
53	Porumb	2011

Aceste probe au fost depozitate într-un depozit fără a menține un regim constant de temperatură și fără control al umidității.

Metoda PCR în timp real permite de a compara concentrația relativă a genei de interes în probe fără a construi o curbă de concentrație și fără a determina numărul absolut de copii ale genei studiate în probă. Pentru aceasta, aceeași cantitate de ADN este introdusă în reacție (concentrația ADN-ului șablon introdus în reacție este determinată spectrofotometric). În cazul PCR în timp real, o reacție pozitivă este determinată de acumularea unui semnal de fluorescență. Pentru fiecare reacție, aparatul afișează valoarea Ct (pragul ciclului). Ct este numărul de cicluri necesare pentru ca graficul de fluorescență să treacă nivelul pragului (adică depășește valorile de fundal). Valoarea Ct este invers proporțională cu cantitatea de ADN țintă din eșantion, adică cu cât concentrația genei analizate este mai mare, cu atât va fi mai mică valoarea Ct. Diferența dintre valorile Ct ale genei studiate și gena de referință poate fi utilizată pentru a determina cantitatea relativă a genei din eșantion (metoda delta Ct). Astfel, comparând valorile Ct ale probelor analizate, au fost construite următoarele grafice.

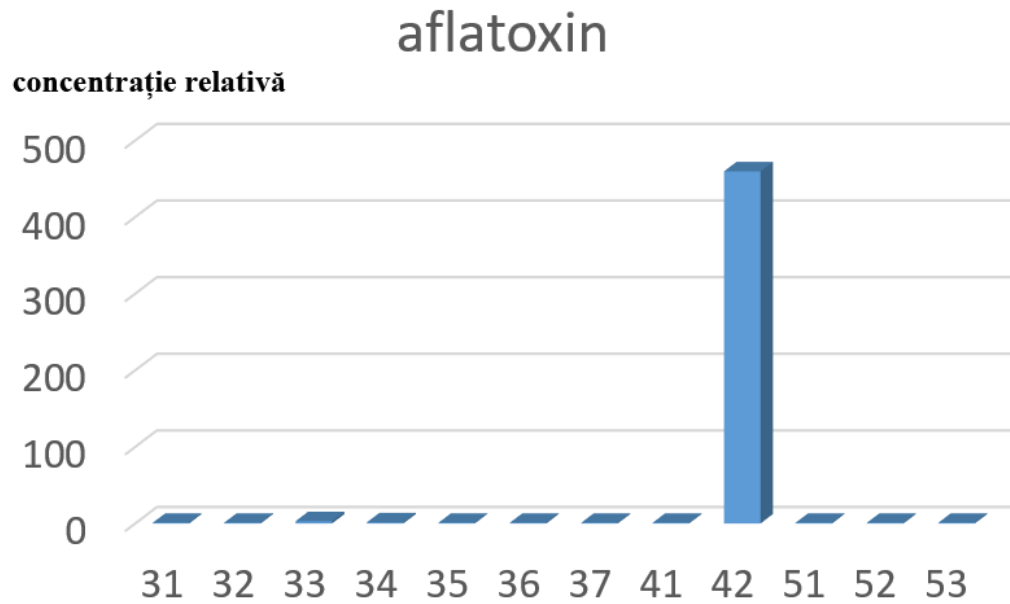
Următoarea figură (Figura 22) prezintă concentrația relativă a genei Tri11 implicată în sinteza micotoxinelor DON, T2 în probele analizate (probele sunt descrise mai sus în Tabelul 3).



**Figura 22. Concentrația genei Tri11 în diferite probe de boabe.**

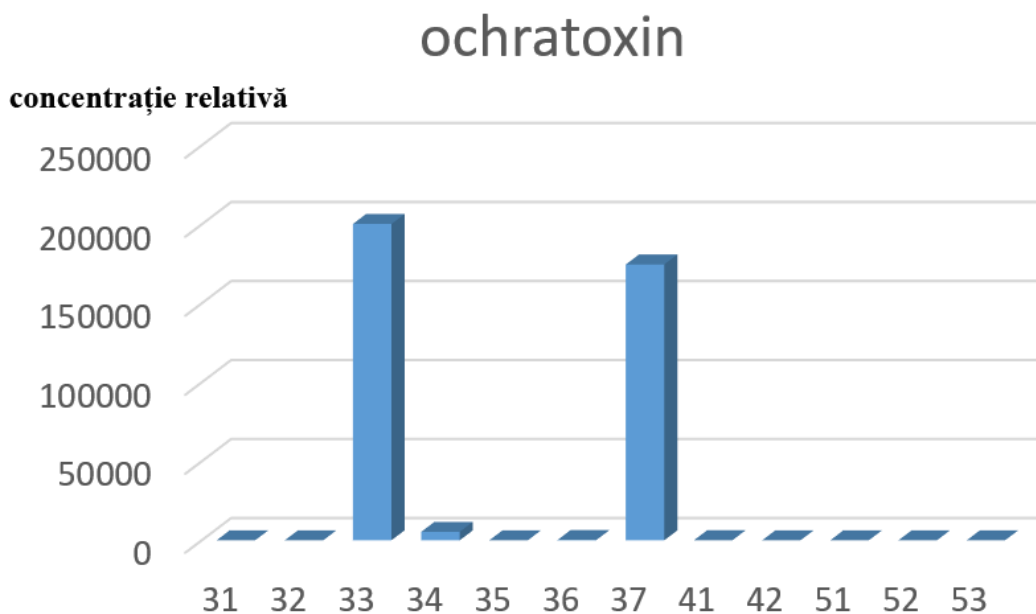
Se poate observa că cea mai mare cantitate a acestei gene a fost găsită în proba 41; este prezentă și în cantități mari în probele 32 și 33.

Următoarea figură (Fig. 23) prezintă concentrația relativă a genei AflR implicată în sinteza aflatoxinei în probele analizate (probele sunt descrise în Tabelul 3).



**Figura 23. Concentrația genei AflR în diferite probe de boabe.**

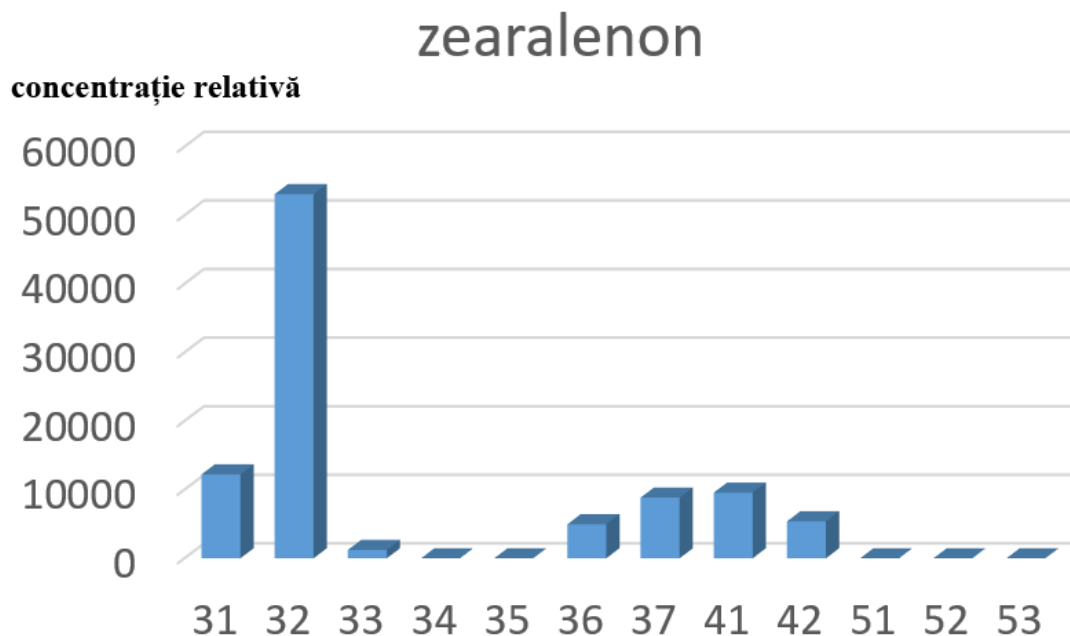
Se poate observa că cea mai mare cantitate din această genă a fost găsită în eșantionul 42. Următoarea figură (Figura 24) prezintă concentrația relativă a genei non-ribosomal peptide synthetase implicate în sinteza ocratoxinei A din probele analizate.



**Figura 24. Concentrația genei non-ribosomal peptide synthetase în diferite probe de boabe.**

Cea mai mare cantitate a acestei gene a fost găsită în probele 33 și 37

Figura următoare arată concentrația relativă a genei PSK13 implicată în sinteza micotoxinei zearalenonei în probele analizate..

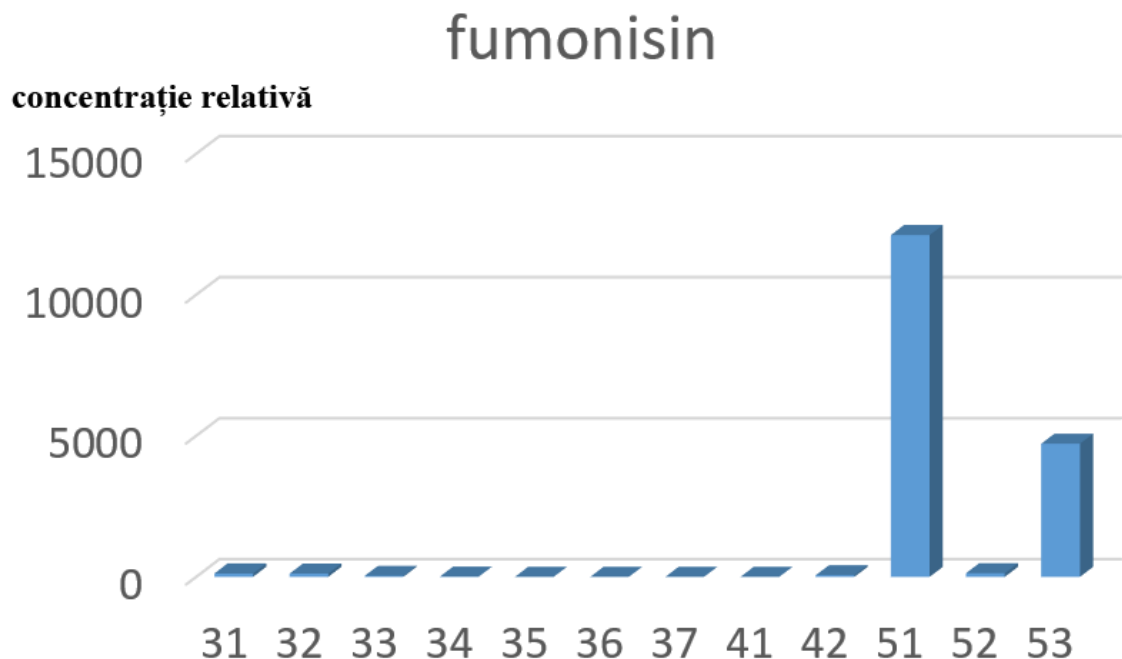




**Figura 25. Concentrația genei PSK13 în diferite probe de boabe.**

Cea mai mare cantitate a acestei gene a fost găsită în eșantionul 32; este prezentă și în probele 31, 33, 36, 37, 41, 42.

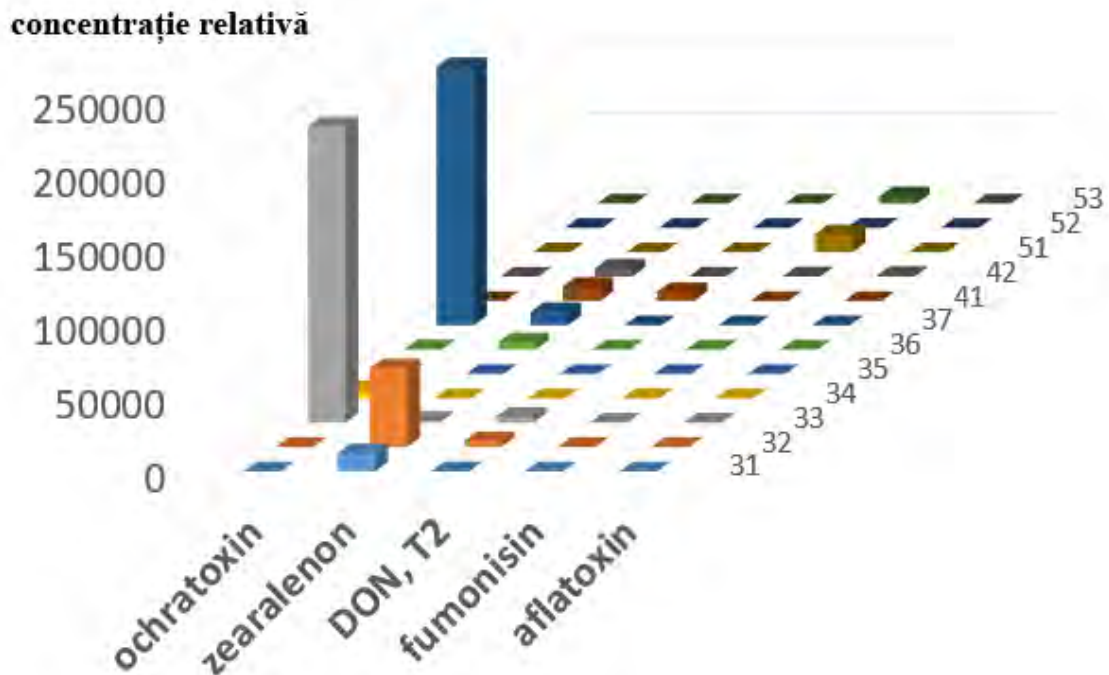
Următoarea figură (Figura 26) prezintă concentrația relativă a genei FUM1 implicată în sinteza micotoxinelor fumonisine în probele analizate.



**Figura 26. Concentrația genei FUM1 în diferite probe de boabe.**

Se poate observa că cea mai mare cantitate a acestei gene a fost găsită în proba 51; este prezentă și în eșantionul 53.

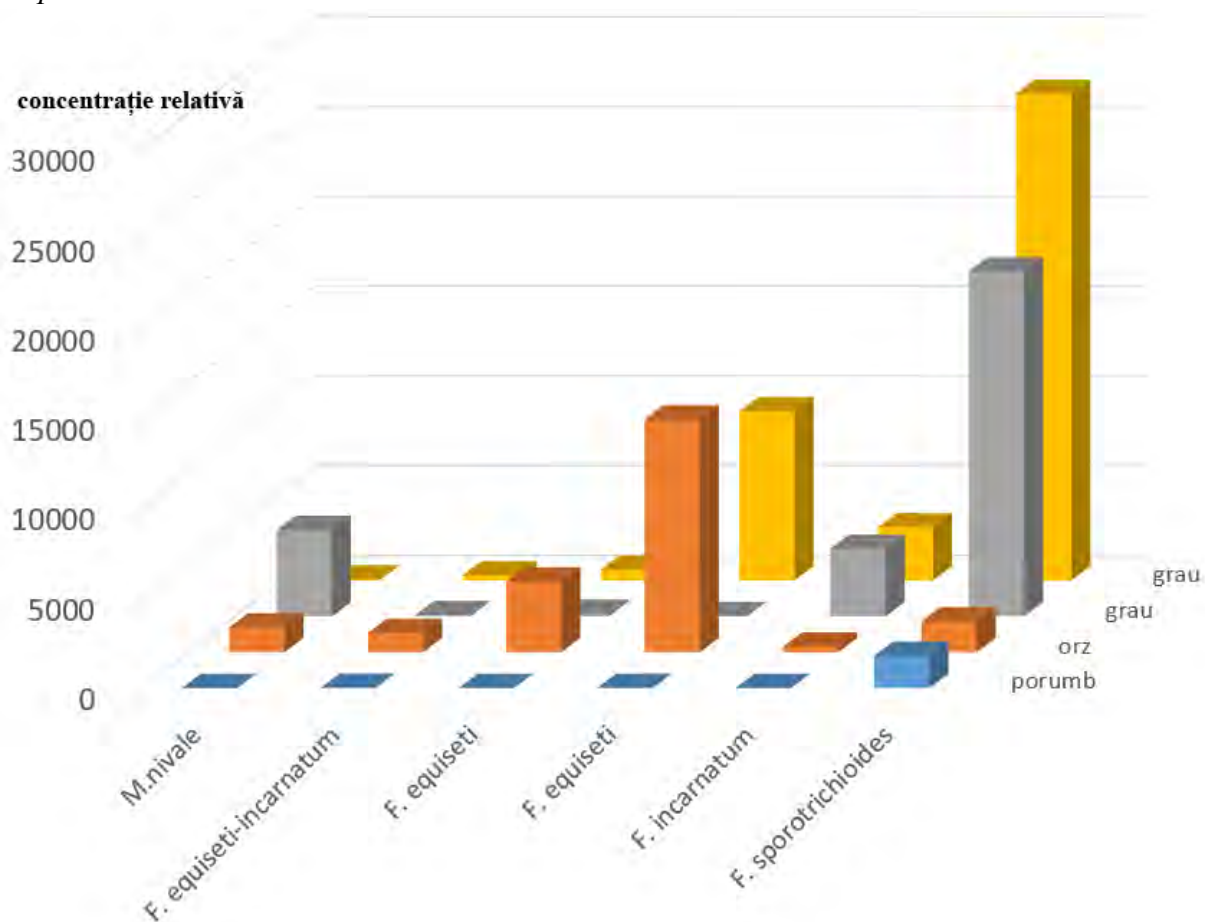
Rezumând datele obținute ca urmare a studiului eșantioanelor de mai sus folosind primerii la gene implicate în biosinteza micotoxinelor, se poate observa că, printre genele studiate, cele mai mari cantități sunt pentru agenții patogeni care conțin gene pentru biosinteza ocratoxinei A și zearalenonei. Agenții patogeni capabili de biosinteza zearalenonei se găsesc, de asemenea, în cel mai mare număr de probe studiate. Unele dintre probele studiate s-au dovedit de a fi infectate cu mucegaiuri capabile să sintetizeze diferite micotoxine. De exemplu, proba 33 (triticale 2018) este infectată cu mucegaiuri care conțin gene pentru sinteza micotoxinelor DON, T2, ocratoxină A, zearalenonă. Eșantionul numărul 37 (grâu de primăvară dur din 2014) este infectat cu mucegaiuri care conțin gene pentru sinteza micotoxinelor zearalenonă și ocratoxină A, eșantionul numărul 32 (grâu Kuialnik din 2019) este infectat cu mucegaiuri care conțin gene pentru sinteza micotoxinelor zearalenonă, DON și T2. Graficul rezumat al conținutului genelor de sinteză a micotoxinelor din probele de ADN studiate este prezentat mai jos (Fig. 27).



**Figura 27. Concentrația relativă a genelor implicate în sinteza micotoxinelor în diferite probe de boabe.**

În continuare (Fig. 28) sunt prezentate rezultatele analizei a două probe de grâu, un eșantion de orz și porumb, folosind perechi de primeri specifice diferitelor specii de *Fusarium*. Figura arată că diferite probe conțin un spectru diferit de agenți patogeni, diferă, de asemenea, și numărul lor. Astfel, în ambele probe de grâu analizate, predomină *F. sporotrichioides* și *F. incarnatum*. *F. equiseti* este prezent într-una din probele de grâu, iar *F. nivale* în cealaltă. În ceea ce privește proba de orz, predomină *F. equiseti*; *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, *F. nivale*, complexul *F. equiseti-incarnatum* se mai găsesc. În proba de porumb, s-au găsit doar cantități relativ mici de

*F.sporotrichioides.*



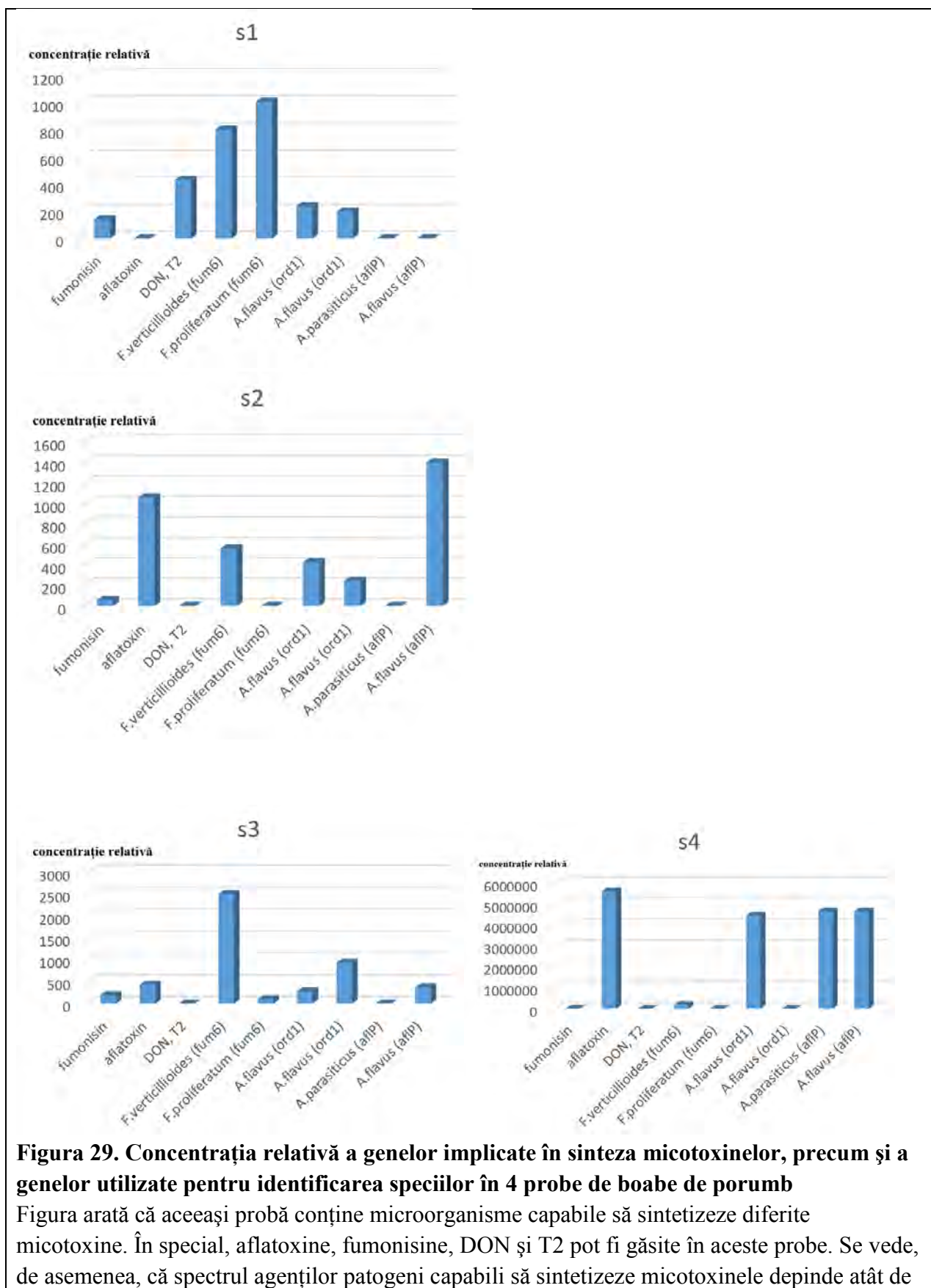
**Figura 28. Concentrația relativă a genelor utilizate pentru identificarea speciilor din genul *Fusarium*.**

În plus, au fost analizate 4 probe de porumb de doi genotipuri de culturi în doi ani diferiți. Analiza a fost efectuată folosind primeri pentru gene implicate în biosinteza micotoxinelor și pentru gene utilizate pentru identificarea speciilor de mucegaiuri. Informații mai detaliate despre eșantioane sunt prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4. Probele de porumb

№	Denumirea	Anul recoltării
S1	Porumbul CP148	2008
S2	Porumbul CP 148	2018
S3	Porumbul CP 137	2008
S4	Porumbul CP 137	2018

Figura 29 prezintă rezultatele analizei acestor probe.



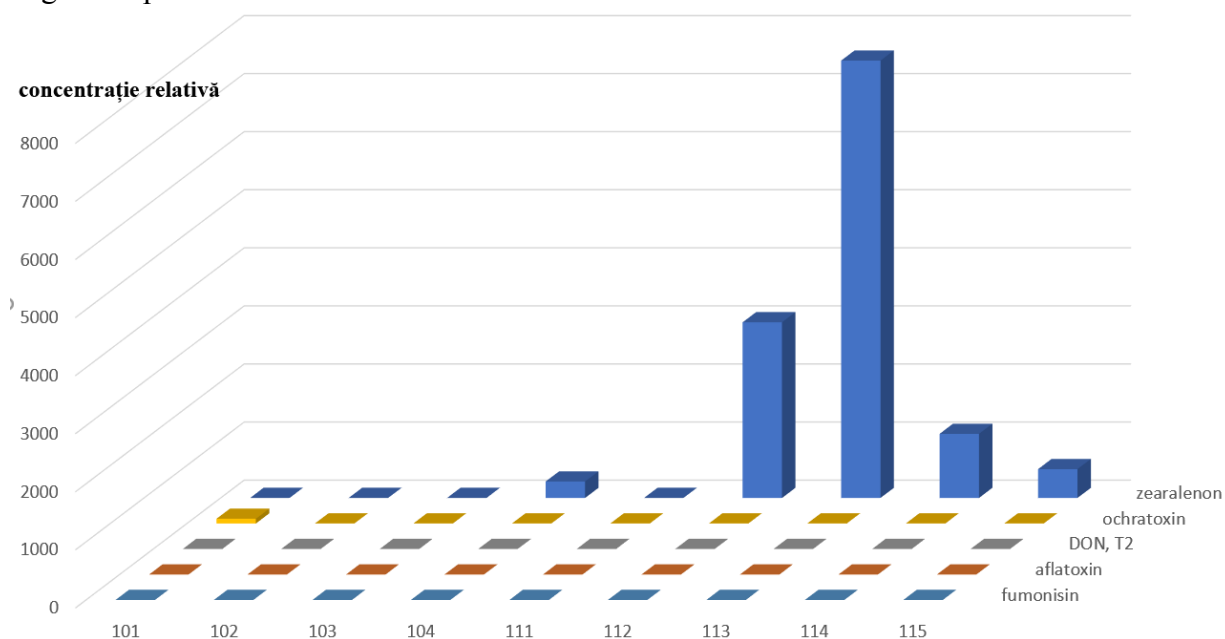
anul recoltării cerealelor, cât și, aparent, de genotipul (de rezistența unui anumit genotip la agenții patogeni care produc micotoxine). Aceste probe au fost depozitate în condiții controlate la +4 grade Celsius. Ca rezultat, în aceste probe, nu am găsit o creștere a numărului de agenți patogeni capabili să sintetizeze micotoxine; în plus, numărul de gene de sinteză a micotoxinelor detectate în probele din 2018 a fost mai mare decât în aceleași genotipuri din 2008. Aceasta confirmă, de asemenea, ipoteza că depozitarea în condiții controlate nu crește numărul producătorilor de micotoxine din probe.

În plus, au fost analizate 9 probe de leguminoase depozitate în condiții controlate. Tabelul 5 oferă informații mai detaliate despre aceste eșantioane.

**Tabelul 5. Probe studiate de fasole și năut**

<b>№</b>	<b>Denumirea</b>	<b>Anul recoltării</b>
101	Fasole	2018
102	Fasole	2018
103	Fasole	2018
104	Fasole	2018
111	Năut	2018
112	Năut	2018
113	Năut	2018
114	Năut	2018
115	Năut	2018

Mai jos (Fig. 30) sunt prezentate rezultatele analizei probelor de leguminoase folosind primerii la gene implicate în sinteza micotoxinelor.



**Figura 30. Concentrația relativă a genelor implicate în sinteza micotoxinelor în probele de boabe de leguminoase.**

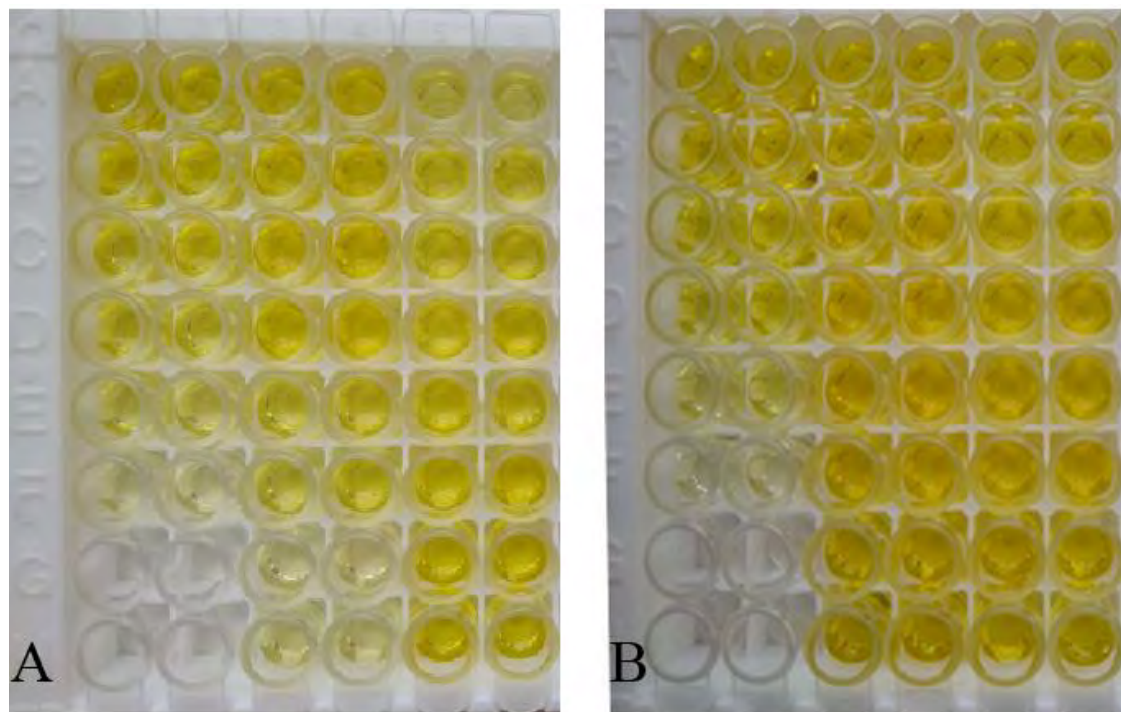
Se poate observa că, în ansamblu, boabele de leguminoase sunt mult mai puțin contaminate cu microorganisme capabile să sintetizeze micotoxine. S-a găsit că o singură probă de fasole și probe de naut conțin microorganisme capabile să sintetizeze zearalenonă. De asemenea, într-o probă de fasole s-a găsit o cantitate relativ mică de microorganisme capabile să sintetizeze ochratoxine.

Astfel, rezultatele obținute indică faptul că probele de cereale pot fi contaminate într-o măsură suficient de mare cu agenți patogeni capabili să sintetizeze micotoxine. Acest lucru este demonstrat atât în analiza prezenței genelor implicate în sinteza micotoxinelor, cât și prin analiza genelor utilizate pentru identificarea speciilor de agenți patogeni capabili să sintetizeze micotoxinele. Mai mult, genele și agenții patogeni potențial capabili să sintetizeze diferite micotoxine pot fi găsite într-o probă. Acest lucru poate complica căutarea și evaluarea concentrației de micotoxine în cereale. Concentrația genelor micotoxinei poate varia, de asemenea, într-o mare măsură. Efectul timpului de stocare asupra cantității de ADN a agenților patogeni capabili să sintetizeze micotoxine nu a fost observat. Condițiile de creștere și recoltare par a fi mai influente. Trebuie remarcat faptul că analiza a fost efectuată pe materialul cultivat pe câmpurile experimentale ale Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor. Măsura în care aceste rezultate pot fi aplicate pe material cultivat pe alte câmpuri necesită cercetări suplimentare. De asemenea, se pare că afectează cantitatea de ADN a ciupercilor micotoxigenice și genotipul plantei (soi, linie). De asemenea, s-a observat că leguminoasele sunt încărcate cu ciuperci micotoxigene într-o măsură mult mai mică decât cerealele. Deși agenții patogeni potențial capabili să sintetizeze micotoxine s-au găsit și în leguminoase.

#### 4. Evaluarea coincidenței rezultatelor, obținute prin metode moleculare, cu rezultatele, obținute prin metode standard

Până acum, a fost estimat numărul de gene (inclusiv gene implicate în sinteza micotoxinelor), ceea ce a făcut posibilă evaluarea prezenței agenților patogeni potențial capabili să sintetizeze micotoxinele în probă și cantitatea acestora. Cu toate acestea, în funcție de condiții, microorganismele micotoxigenice pot produce sau nu micotoxine. Pentru a evalua în ce măsură prezența microorganismelor potențial capabile să sintetizeze micotoxinele corelează cu prezența micotoxinelor în probă, micotoxinele au fost determinate în probe și rezultatele determinării micotoxinelor au fost comparate cu rezultatele determinării genelor asociate cu micotoxine. Cantitatea de micotoxine din probe a fost determinată prin test imunorobent legat de enzime (ELISA) folosind truse comerciale. Această metodă permite determinarea cantitativă și calitativă a micotoxinelor din probe, pe baza legării micotoxinei la anticorpi specifici și detectarea ulterioară. Cantitatea de micotoxină din probă și, prin urmare, cantitatea de anticorp legată de aceasta, este evaluată de modificarea densității optice a soluției de substrat ca urmare a activității peroxidazei de hrean conjugată cu anticorpu. În paralel cu eșantionul, se analizează diluțiile seriale ale soluțiilor standard de micotoxine cu o concentrație cunoscută, se măsoară absorbanta și se trasează un grafic al absorbantei față de concentrație pentru standarde. Această dependență este utilizată pentru a determina concentrația de micotoxine în probele analizate.

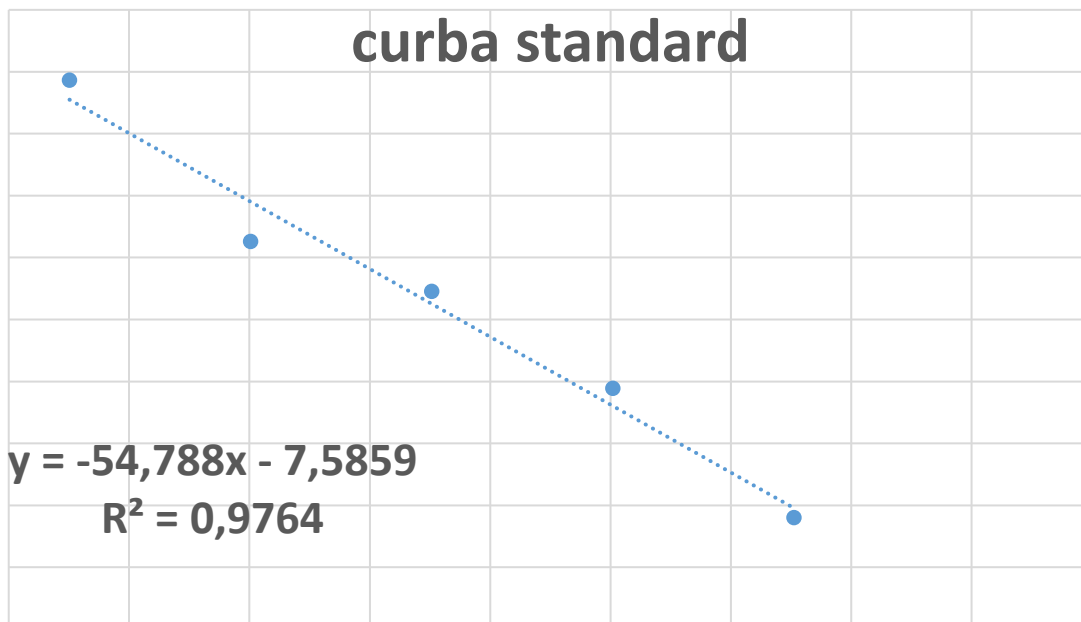
Figura 31 prezintă plăcile de testare ELISA pentru aflatoxină totală și fumonisină.



**Figura 31. Rezultate ELISA pentru aflatoxină totală (A) și fumonisină B1 (B).**

**În continuare se descriu rezultatele determinării conținutului de aflatoxină totală în unele probe de cereale.**

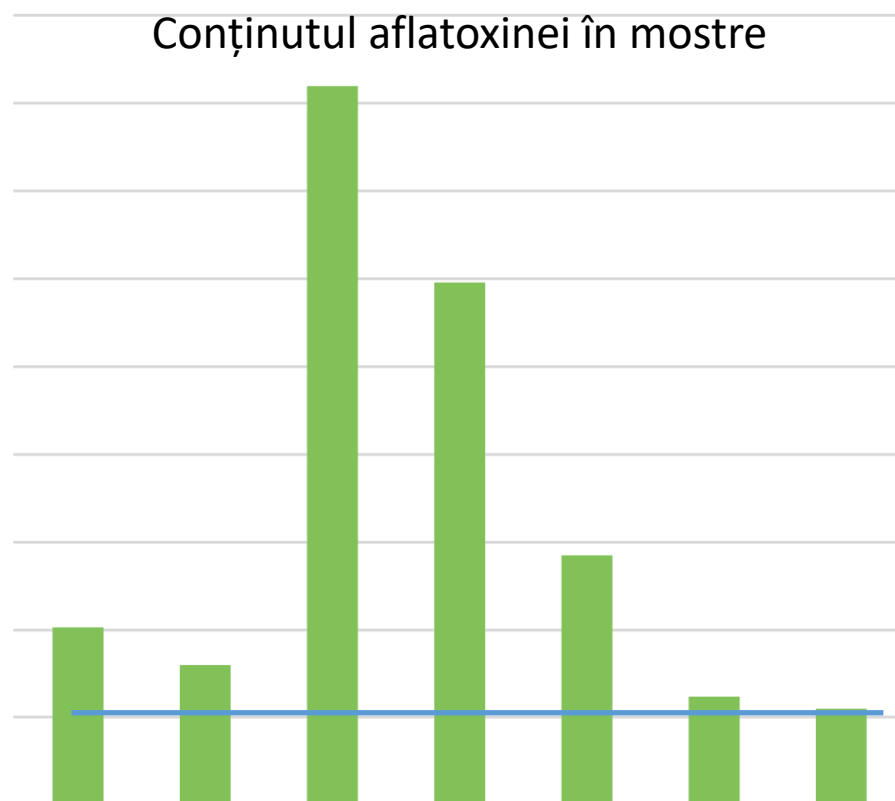
Figura 32 prezintă un grafic al dependenței concentrației logaritmice a aflatoxinei totale într-o probă standard de la valorile absorbantei la o lungime de undă de 450 nm.



**Figura 32. Graficul dependenței concentrației logaritmice a aflatoxinei totale într-o probă standard de valorile absorbantei.**

Pe baza acestei dependențe, s-a determinat concentrația aflatoxinei totale în probele de cereale. Aflatoxina a fost extrasă din probe de cereale folosind metanol.

Probele de cereale sunt descrise în tabelul 3.

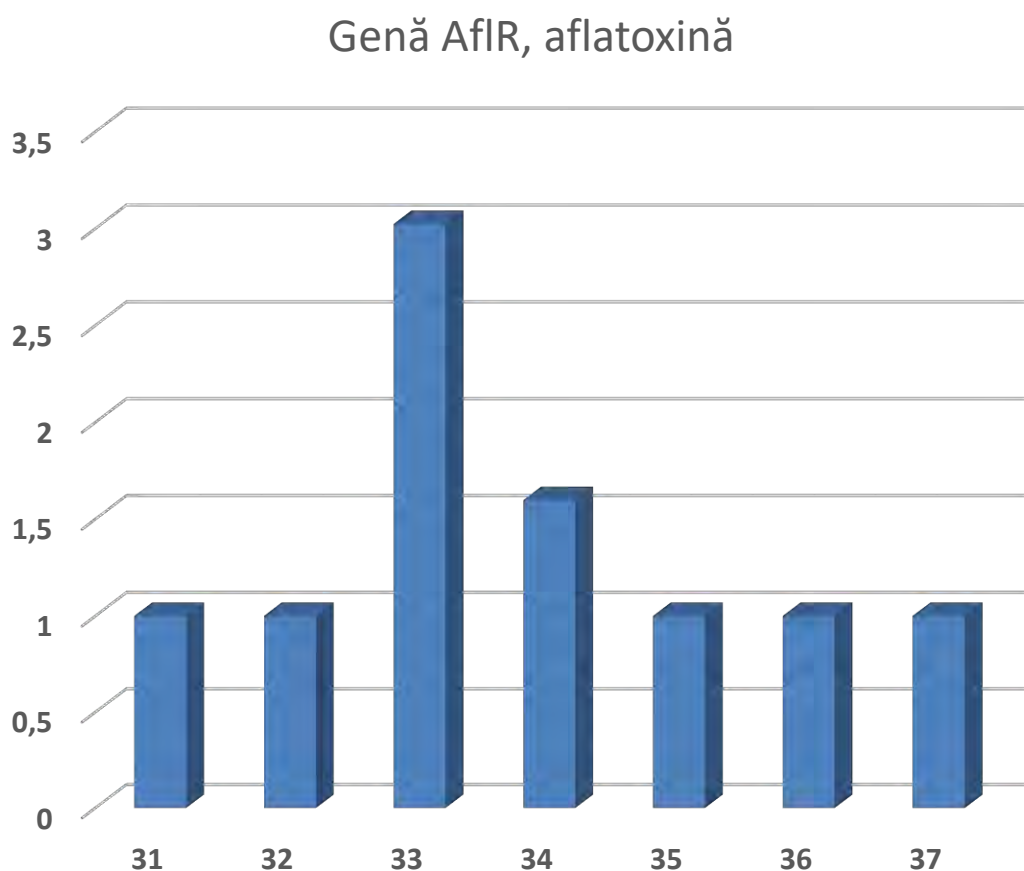




**Figura 33. Rezultatele determinării conținutului total de aflatoxină în probele de grâu și triticales prin metoda ELISA.**

După cum se poate vedea din grafic, cea mai mare cantitate de aflatoxină totală este conținută în probele 33 (triticales de iarnă 2018) și 34 (grâu de iarnă 2018). Linia albastră arată limita de detecție a acestui kit ELISA, care este de 0,1 ppb pentru cereale. Concentrația maximă admisibilă de aflatoxină totală pentru alimentația pentru copii este de 0,1 ppb. Concentrația maximă admisibilă pentru aflatoxina totală din cereale pentru adulți este de 2 ppb, ceea ce înseamnă că aceste cereale sunt potrivite pentru alimentația adulților, dar nu și pentru copii. Mai mult, deoarece sensibilitatea acestui kit ELISA nu depășește concentrația maximă admisibilă de aflatoxină totală pentru alimentația pentru copii, nu este adecvată pentru analiza cerealelor destinate alimentației pentru copii.

Mai jos (Figura 34) sunt rezultatele analizei PCR în timp real a aceluiași probe



**Figura 34. Rezultatele determinării conținutului genei AflR implicate în sinteza aflatoxinei în probe de grâu și triticales prin PCR în timp real.**

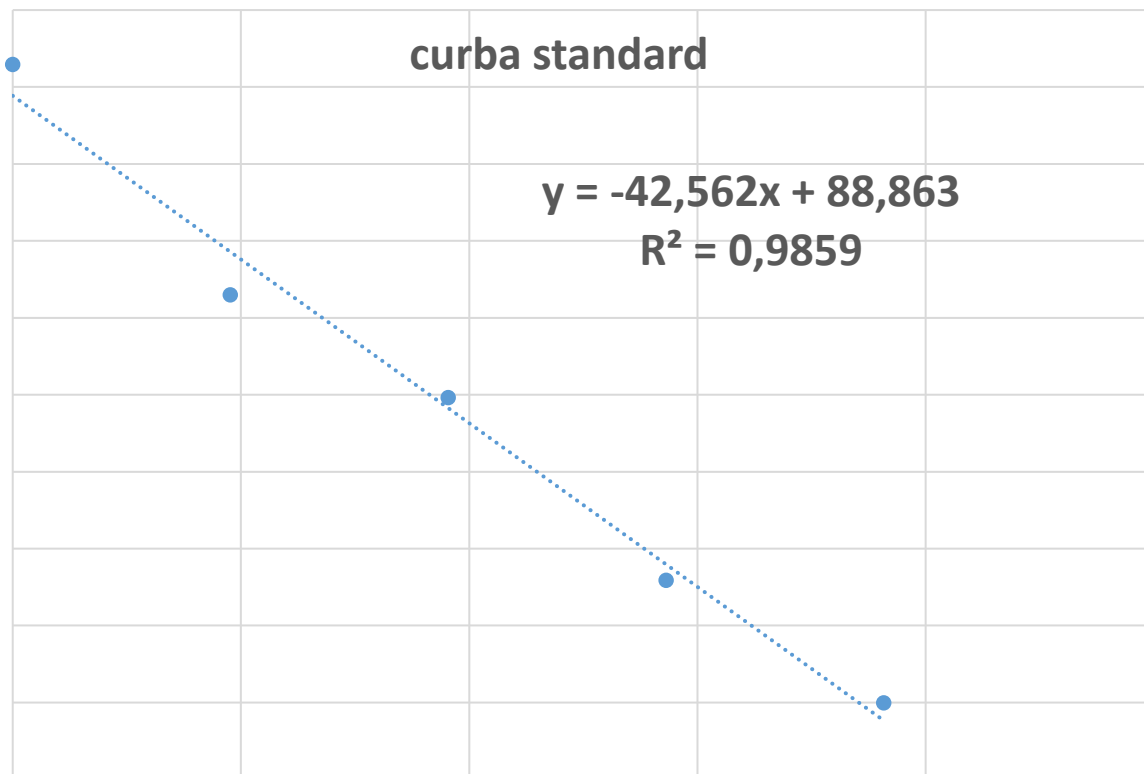
Când se compară figurile 33 și 34, se poate observa că probele 33 și 34 conțin cea mai mare cantitate atât de aflatoxină (Fig. 33), cât și de gena AflR implicată în sinteza aflatoxinei (Fig. 34).

Aceasta înseamnă că am observat o corelație între cantitatea de genă AflR din probele 33 și 34 și conținutul de aflatoxină din aceleași probe. Astfel, rezultatele obținute pot indica faptul că poate exista o corelație între cantitatea de ADN, cel puțin pentru gena AflR, cu cantitatea de

aflatoxină. Pentru fumonisină nu am reușit să identificăm o astfel de corelație. Acest lucru se datorează în principal, aparent, faptului că cantitatea de fumonisină din probele analizate a fost mai mică decât limita de detectare a acestui set.

Următoarele descriu rezultatele determinării conținutului de fumonisină B1 în unele probe de cereale.

Figura 35 prezintă un grafic al dependenței concentrației logaritmice a fumonisinei B1 într-o probă standard de valorile absorbantei la o lungime de undă de 450 nm.



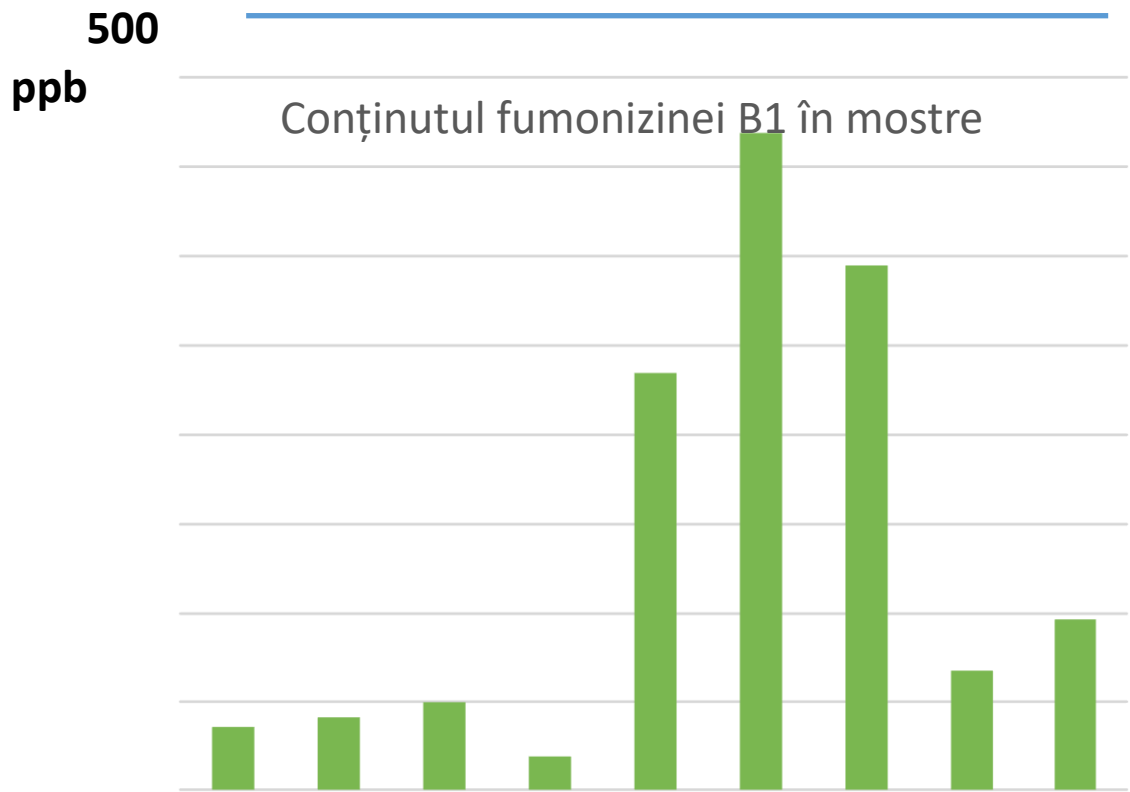
**Figura 35. Graficul dependenței concentrației logaritmice a fumonisinei B1 într-un eșantion standard de valorile absorbantei**

Pe baza acestei dependențe, s-a determinat concentrația de fumonisină B1 în probele de boabe. Fumonisină B1 a fost extrasă din probe de cereale folosind metanol. Probele de cereale sunt descrise în Tabelul 3.

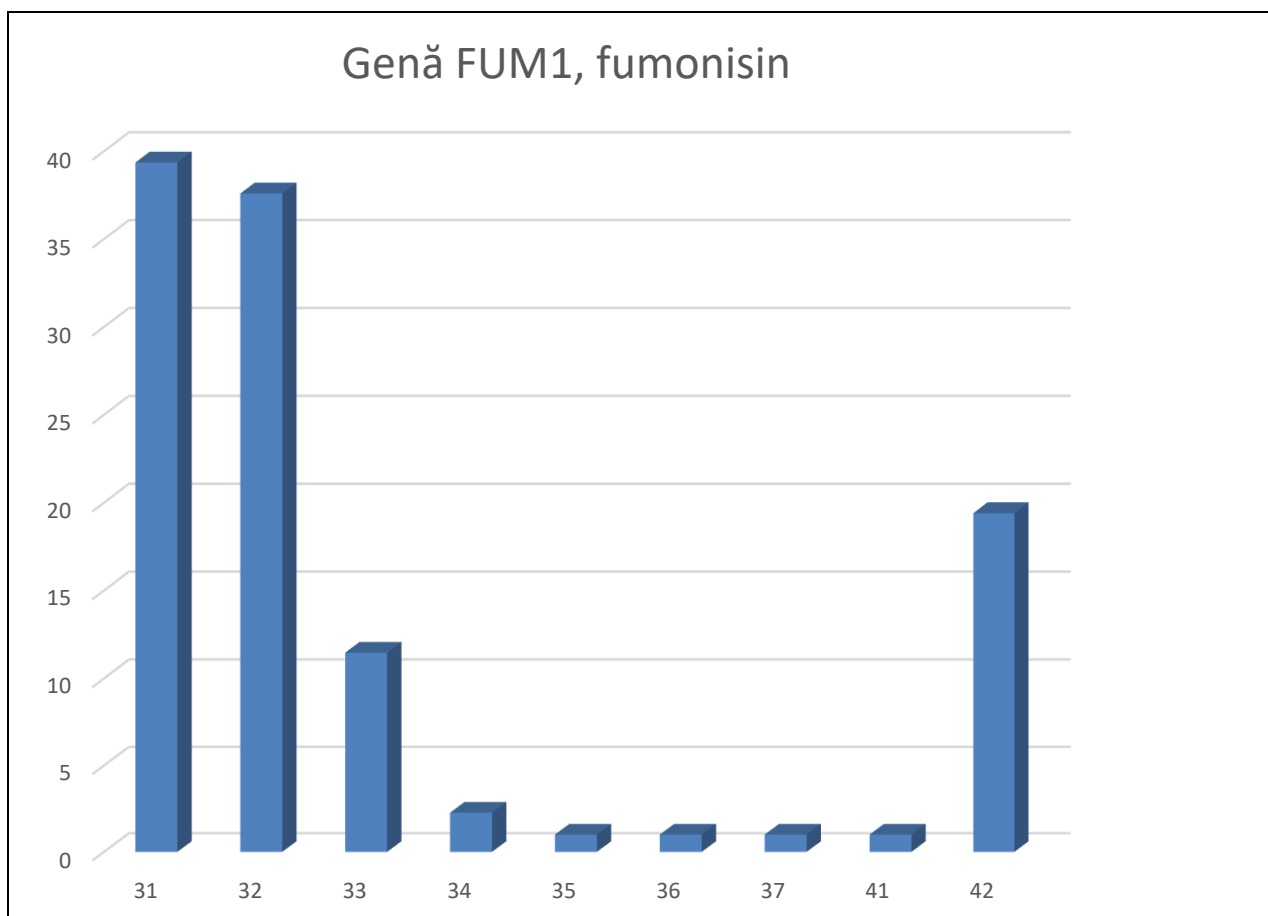
După cum se poate vedea din grafic, cea mai mare cantitate de fumonisină B1 este conținută în probele 36 (grâu de iarnă 2016), 36 (grâu de iarnă 2016), 37 (grâu de primăvară dur Arnaut 7, 2014). Linia albastră arată limita de detecție a acest set pentru cereale, care este de 500 ppb. Aceasta înseamnă că toate fluctuațiile cantității de fumonisină B1 din probe sunt sub limita de detecție și nu sunt fiabile.

Figura 37 prezintă rezultatele analizei PCR în timp real a aceluiași probe. Deoarece conținutul de fumonisină din probe este sub limita de detecție, nu putem spune încă dacă există o corelație între cantitatea de ADN și cantitatea de fumonisină din probe. Cu toate acestea, acest lucru înseamnă, de asemenea, că metoda PCR cantitativă este capabilă să detecteze gene pentru

sinteza fumonisinei mult mai devreme decât limita de detecție pentru fumonisină este atinsă pentru trusa pe care am folosit-o și mult mai devreme decât sunt atinse concentrațiile maxime admisibile pentru fumonisină.



**Figura 36. Rezultatele determinării conținutului de fumonisină B1 în probe de grâu, triticele și orz prin metoda ELISA**



**Figura 37. Rezultatele determinării conținutului genei FUM1 implicate în sinteza fumonisinei B1 în probe de grâu, triticale și orz prin real-time PCR.**

Astfel, studiile prezente confirmă ipotezele noastre că este posibilă o corelație între numărul de gene implicate în sinteza micotoxinelor și conținutul micotoxinelor. În plus, ipoteza a fost confirmată că analiza PCR a conținutului de ADN al genelor implicate în sinteza micotoxinelor poate dezvălui ADN-ul microorganismelor capabile să sintetizeze micotoxinele chiar în stadiul în care metodele standard de detectare a micotoxinelor nu detectează micotoxina. Având în vedere că conținutul micotoxinelor depinde atât de condițiile de creștere, cât și de condițiile de depozitare, identificarea potențialului pentru sinteza micotoxinelor prin identificarea genelor implicate în sinteza micotoxinelor într-o etapă anterioară, când nu au fost încă detectate micotoxine, poate permite ajustarea condițiilor de stocare pentru a reduce riscurile de contaminare cu micotoxine. În plus, diagnosticarea genelor de sinteză a micotoxinelor poate fi utilizată ca analiză preliminară a probabilității acumulării micotoxinei atât în stadiul de creștere a culturii, cât și în stadiul depozitării acesteia. Această analiză va contribui la reducerea riscului de contaminarea alimentelor cu micotoxine și la evaluarea probabilității de apariție a micotoxinelor în timpul depozitării alimentelor, precum și la evaluarea probelor de produse alimentare în care probabilitatea de detectare a micotoxinelor este maximă.

6. Descrierea colaborării între organizația din RM și organizațiile partenere după caz (specificul și continuitatea colaborării)

Pe parcursul implementării proiectului, am menținut o comunicare constantă (telefon, e-mail, Viber) cu partenerii noștri din Belarus. Din păcate, a trebuit să limităm contactele personale (deplasări) din cauza pandemiei COVID-19. Cu toate acestea, pe parcursul derulării proiectului, le-am împărtășit rezultatele proiectării primerilor, evaluării eficienței a acestora și rezultatele analizei primerilor utilizați pe probe de alimente specifice. La rândul lor, partenerii noștri au planificat să utilizeze primerii nou creați pentru a-și analiza produsele și pentru a valida primerii.

7. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de publicații

1. MITIN, V., MITINA, I. *Some aspects of primer design for real time pcr with sybr green as a dye. In: Journal of Engineering Sciences. 2020, nr. 4, pp. 196-191. ISSN 2587-3474 ISSN 2587-3482.*
2. MITINA, I., MITIN, V., TUMANOVA, L., ZGARDAN, D., STURZA, R. *Detection and quantification of mycotoxigenic fungi in maize by real-time PCR. In: Journal of Engineering Science. 2020, Vol. 27(3), pp. 225-231. ISSN 2587-3474. eISSN 2587-3482.*

8. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de prezentări (comunicări, postere, teze/rezumat/abstracte) la foruri științifice

1. МИТИНА И., МИТИН В., ТУМАНОВА Л. *Выявление в почве продуцентов микотоксинов по генам, участвующим в синтезе микотоксинов In: Conferința "Вклад агрофизики в решение фундаментальных задач сельскохозяйственной науки", Санкт-Петербург, Russia, 1-2 octombrie 2020 p. 457-463.*
2. TUMANOVA, L., GRAJDIERU, C., MITIN, V., MITINA, I. *Identification of mycotoxin-producing fungi from several fungal genera associated with maize. Materialele Conferinței Științifice „Știința În Nordul Republicii Moldova: Probleme, Realizări, Perspective” 2020, Vol. 4, p. 114-117 (comunicare, prezentată de Grajdieru C., participanți pasivi -Tumanova L., Mitin V., Mitina I.)*
3. КУЗНЕЦОВА, И., ГРЭЖДИЕРУ, К., ИГНАТОВА, З. *Simpozionul Științific internațional „Biotehnologii avansate-realizări și perspective” (ediția a V-a), 21-22 octombrie 2019, p.78. Chișinău. Влияние предпосевной обработки на инфицированность семян некоторых генотипов озимой пшеницы грибами родов Fusarium и Penicillium.*
4. TUMANOVA, L.; GRAJDIERU, C.; MITIN, V. *Simpozionul Științific internațional „Biotehnologii avansate-realizări și perspective” (ediția a V-a), 21-22 octombrie 2019, p.9. Chișinău. Identification of DNA of pathogens from Fusarium genus in maize plants (Zea mays)*
5. DEAGHILEVA, A.; MITIN, V.; TUMANOVA, L.; GRĂJDIERU, C. *Simpozionul Științific internațional „Biotehnologii avansate-realizări și perspective” (ediția a V-a), 21-22 octombrie 2019, p.15. Chișinău Elaborarea primerilor specifici pentru identificarea moleculară a fungilor din g. Gaeumannomyces.*

## 9. Protecția rezultatelor obținute în formă de obiecte de proprietate intelectuală

## 10. Materializarea rezultatelor obținute

În cooperare cu Universitatea Tehnică a Moldovei privind utilizarea metodelor de biologie moleculară pentru siguranța produselor alimentare:

Zgardan, D., Mitina, I. Aplicații ale biologiei moleculare în oenologia modernă. În monografia colectivă “Principii de dezvoltare a oenologiei moderne și organizarea pieței vitivinicole”, Chișinău: Ed. “Tehnica-UTM”, 2020, 319 p.

În cooperare cu Universitatea Tehnică a Moldovei, Mitina Irina a fost consultant științific privind utilizarea metodelor de biologie moleculară pentru siguranța produselor alimentare la teze:

Alina Pleșca, Diploma studii superioare licența ciclu I

Aliona Staci Diploma studii superioare de masterat, ciclu II

Elena Harghel Diploma studii superioare licența ciclu I

## 11. Colaborări cu organizații de cercetare internaționale, proiecte de cercetare/activități comune cu parteneri externi

Se desfășoară cooperarea cu instituțiile naționale (Universitatea Tehnică a Moldovei), în cadrul proiectului național „Ameliorarea calității și siguranței alimentelor prin biotehnologie și inginerie alimentară”, precum și proiectul din cadrul Joint Operational Programme Romania INTELLIGENT VALORISATION OF AGRO-FOOD INDUSTRIAL WASTES, care se realizează în Universitatea Tehnică a Moldovei.

## 12. Dificultățile în realizarea proiectului

În timpul implementării proiectului, singurele dificultăți cu care ne-am confruntat a fost pandemia COVID-19. În acest sens, în loc de deplasarea planificată inițial și analiza conținutului de micotoxine din alimente în Republica Belarus, am determinat conținutul de micotoxine din alimente în IGFPP prin metoda testului imunosorbent legat de enzime (ELISA). Acest lucru nu a afectat rezultatele finale ale proiectului, dar o metodă neutilizată anterior (ELISA) a fost stăpânită în laborator și au fost instruiți tinerii specialiști.

## 13. Concluzii

Ca rezultat al proiectului, au fost creați și testați experimental primerii pentru identificarea genelor implicate în sinteza următoarelor micotoxine: ocratoxină A, zearalenonă, fumonisină B1, aflatoxine, T2 și DON. Au fost selectate condiții optime de PCR și PCR în timp real și au fost descrise protocoale PCR sau PCR în timp real pentru fiecare pereche de primeri. Primerii au fost, de asemenea, proiectate și testate experimental pentru a identifica o gamă de fungi toxigenici. S-a arătat că conținutul de gene pentru sinteza ocratoxinei A și zearalenonei depășește semnificativ conținutul de gene pentru sinteza altor micotoxine studiate în produsele analizate. Folosind exemplul aflatoxinelor, este prezentată posibilitatea corelației între numărul de gene pentru sinteza micotoxinelor și conținutul micotoxinelor înseși (aflatoxină totală). Folosind fumonisina B1 ca exemplu, este arătată posibilitatea de a detecta gena pentru sinteza fumonisinei B1, începând de la etapa de maturare și depunere în depozitare a cerealelor și în timpul depozitării acestora. S-a demonstrat că genele pentru sinteza micotoxinelor pot fi detectate chiar și în acele etape când conținutul de fumonisină B1 înseși este sub limita de detectare. Acest lucru ar putea însemna că analiza PCR (PCR în timp real) a genelor de sinteză a micotoxinelor poate identifica loturi de cereale care sunt mai susceptibile de a acumula micotoxine în timpul depozitării. Acest lucru va permite o analiză preliminară a cerealelor înainte de depozitare și în timpul depozitării pentru a determina riscul asociat cu micotoxine în cantități care depășesc concentrațiile acceptabile. S-a demonstrat că analiza PCR (PCR în timp real) a alimentelor pentru gene implicate în sinteza micotoxinelor previne apariția și acumularea micotoxinelor în alimente.

As a result of the project, primers for detection of the genes involved in the biosynthesis of the following mycotoxins: ochratoxin A, zearalenone, fumonisin B1, aflatoxins, T2 and DON were developed and experimentally tested. PCR and real-time PCR conditions for each primer pair were optimized, and PCR or real-time PCR protocols were described for each primer pair. Primers for detection and identification of the fungi capable of mycotoxin synthesis were designed and experimentally tested as well. The amount of the genes involved in ochratoxin A and zearalenone synthesis was shown to be higher than that of the genes involved in other mycotoxin synthesis in the analyzed products. Using aflatoxins as an example, the possibility of a correlation between the amount of the gene involved in the mycotoxin synthesis and the amount of the mycotoxin itself (total aflatoxin) was shown. Using fumonisin B1 as an example, the possibility of detection of the gene involved in fumonisin B1 synthesis from the stage of the maturation of the grain to the dispatch for storage was shown. The genes involved in fumonisin B1 synthesis could be detected when the content of fumonisin B1 itself was below the detection level. This can mean that PCR (real-time PCR) analysis of the genes involved in mycotoxin synthesis could help detect the batches of the grain with increased probability of mycotoxin incidence. This would allow the preliminary testing (screening) of the grain before and during storage to evaluate the risk of mycotoxin incidence in the amounts exceeding the allowable concentrations. The potential for using PCR (real-time PCR) analysis of food based on the genes involved in mycotoxin synthesis for preventing mycotoxin incidence and accumulation in food was shown.

Conducătorul de proiect \_\_\_\_\_ / Mitina Irina

Data: 14.01.2021

LS



Executarea devizului de cheltuieli, conform anexei nr.3 din contractul de finanțare nr.10A/BL din 01 ianuarie 2019Cifrul proiectului: 19.80013.51.07.10A/BL

Denumirea codurilor economice	Cheltuieli, mii lei							
	Codul economice	Aprobat	Buget	Cofinanțare	Modificat	Precizat	Executat	Sold
<b>Servicii energetice si comunale</b>	<b>2221</b>	<b>30,9</b>	<b>0,9</b>	<b>30,0</b>	-	-	<b>30,9</b>	-
Energie electrică	222110	16,5	0,9	15,6	-	-	16,5	-
Energie termică	222130	14,4	0	14,4	-	-	14,4	-
<b>Alte servicii</b>	<b>2229</b>	<b>60,3</b>	<b>60,3</b>	<b>0</b>	-	-	<b>60,3</b>	-
Servicii de cercetări științifice contractate	222930	54,2	54,2	0	-	-	54,2	-
Servicii neatribuite altor aliniate	222990	6,1	6,1	0	-	-	6,1	-
<b>Majorarea valorii mașinilor si utilajelor</b>	<b>3141</b>	<b>18</b>	<b>18,0</b>	<b>0</b>	-	-	<b>18</b>	-
Procurarea mașinilor si utilajelor	314110	18	18,0	0	-	-	18	-
<b>Majorarea valorii materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri</b>	<b>3351</b>	<b>70,8</b>	<b>70,8</b>	<b>0</b>	-	-	<b>70,8</b>	-
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri	335110	70,8	70,8	0	-	-	70,8	-
<b>Total</b>		<b>180,0</b>	<b>150,0</b>	<b>30,0</b>			<b>180,0</b>	

Conducătorul organizației \_\_\_\_\_ / Andronic LarisaContabil șef \_\_\_\_\_ / Ungurean GalinaConducătorul de proiect \_\_\_\_\_ / Mitina Irina

Data: 20.01.2021

## Executarea devizului de cheltuieli, conform anexei nr. 2.3 din contractul de finanțare nr. contractului 7B data 26 februarie 2020

Cifrul proiectului: 19.80013.51.07.10A/BL

Denumirea codurilor economice	Cheltuieli, mii lei							
	Codul economice	Aprobat	Buget	Cofinanțare	Modificat	Precizat	Executat	Sold
<b>Remunerarea muncii</b>	<b>21</b>	<b>62,0</b>	<b>62,0</b>	<b>0</b>	-	-	<b>62,0</b>	-
Remunerarea muncii angajaților conform statelor	211180	48,6	48,6	0	-	-	48,6	-
Contribuții de asigurări sociale de stat obligatorii	212100	11,2	11,2	0	-	-	11,2	-
Prime de asigurare obligatorie de asistenta medicală achitate de angajator și angajați pe teritoriul țării	212210	2,2	2,2	0	-	-	2,2	-
<b>Servicii energetice si comunale</b>	<b>2221</b>	<b>30,0</b>	<b>0</b>	<b>30,0</b>	-	-	<b>30,0</b>	-
Energie electrică	222110	15,6	0	15,6	-	-	15,6	-
Energie termică	222130	14,4	0	14,4	-	-	14,4	-
<b>Majorarea valorii materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri</b>	<b>3351</b>	<b>88,0</b>	<b>88,0</b>	<b>0</b>	-	-	<b>88,0</b>	-
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri	335110	88,0	88,0	0	-	-	88,0	-
<b>Total</b>		<b>180,0</b>	<b>150,0</b>	<b>30,0</b>			<b>180,0</b>	

Conducătorul organizației \_\_\_\_\_ / Andronic LarisaContabil șef \_\_\_\_\_ / Ungurean GalinaConducătorul de proiect \_\_\_\_\_ / Mitina Irina

Data: 20.01.2021

Componența echipei proiectului conform contractul de finanțare nr.10A/BL din 01 ianuarie2019Cifrul proiectului 19.80013.51.07.10A/BL

Echipa proiectului conform contractului de finanțare (la semnarea contractului)							
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Salariu lunar, lei	Perioada, luni	Data angajării	Data eliberării
1.	Mitina Irina	1975	cercet. șt. sup.	1000	12	01.01.19	31.12.19
2.	Tumanova Lidia	1958	Șef de laborator	400	12	01.01.19	31.12.19
3.	Deaghileva Angela	1964	cercet. șt. coord.	695	12	01.01.19	31.12.19
4.	Cuznețova Irina	1958	cercet. științific	542	12	01.01.19	31.12.19
5.	Grăjdieru Cristina	1990	cercet. șt. stagiar	500	12	01.01.19	31.12.19
6.	Bahșiev Aighiuni	1993	cercet. șt. stagiar	400	12	01.01.19	31.12.19
7.	Gușan Maria	1953	economist coord	400	12	01.01.19	31.12.19

Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor <b>conform contractului de finanțare</b>	<b>33,3%</b>
---	--------------

Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2020					
Nr	Nume, prenume	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă	Data angajării
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					

Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor <b>la data raportării</b>	<b>33,3%</b>
--	--------------

Conducătorul organizației \_\_\_\_\_ / Andronic LarisaContabil șef \_\_\_\_\_ / Ungurean GalinaConducătorul de proiect \_\_\_\_\_ / Mitina Irina

Data: 20.01.2021

Anexa 2B

**Componența echipei proiectului nr. contractului 7B data 26 februarie 2020**

**Cifrul proiectului 19.80013.51.07.10A/BL**

<b>Echipei proiectului conform contractului de finanțare (la semnarea contractului)</b>						
<b>Nr</b>	<b>Nume, prenume (conform contractului de finanțare)</b>	<b>Anul nașterii</b>	<b>Titlul științific</b>	<b>Norma de muncă conform contractului</b>	<b>Data angajării</b>	<b>Data eliberării</b>
8.	Mitina Irina	1975	cercet. șt. sup.	0.25	01.01.20	31.12.20
9.	Deaghileva Angela	1964	cercet. șt. coord.	0.25	01.06.20	31.07.20
10.	Cuznețova Irina	1958	cercet. științific	0.25	01.02.20 01.06.20	29.02.20 31.08.20
11.	Ignatova Zoia	1959	cercet. științific	0.25	01.07.20	30.08.20
12.	Grăjdieru Cristina	1990	cercet. șt. stagiar	0.25	01.07.20	30.09.20
13.	Bahșiev Aighiuni	1993	cercet. șt. stagiar	0.25	01.07.20	30.09.20
14.	Gamurari Larisa	1963	contabil coord.	0.25	01.03.20	30.06.20

<b>Pondereea tinerilor (%) din numărul total al executorilor conform contractului de finanțare</b>	<b>33,3%</b>
--	--------------

<b>Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2020</b>					
<b>Nr</b>	<b>Nume, prenume</b>	<b>Anul nașterii</b>	<b>Titlul științific</b>	<b>Norma de muncă</b>	<b>Data angajării</b>
8.					
9.					
10.					
11.					
12.					
13.					
14.					

<b>Pondereea tinerilor (%) din numărul total al executorilor la data raportării</b>	<b>33,3%</b>
---	--------------

Conducătorul organizației \_\_\_\_\_ / Andronic Larisa

Contabil șef \_\_\_\_\_ / Ungurean Galina

Conducătorul de proiect \_\_\_\_\_ / Mitina Irina

Data: 20.01.2021

## Fișa de evaluare a rezultatelor privind implementarea proiectului bi/multilateral

**Titlul proiectului:**

**Conducătorul proiectului:**

### *Criteriile de evaluare:*

1. Atingerea scopului, obiectivelor, activităților și rezultatelor declarate în propunerea de proiect cu cele obținute după implementarea proiectului

Descriere narativă – max. 150 cuvinte

Apreciere: 1-5 puncte (ponderea 0,3)

2. Diseminarea rezultatelor obținute (numărul de publicații, brevete, participări la evenimente, etc)

Descriere narativă – max. 150 cuvinte

Apreciere: 1-5 puncte (ponderea 0,2)

3. Valoarea socio-economică a rezultatelor obținute

Descriere narativă – max. 150 cuvinte

Apreciere: 1-5 puncte (ponderea 0,2)

4. Pregătirea cercetători în cadrul proiectului prin doctorat/postdoctorat

Descriere narativă – max. 150 cuvinte

Apreciere: 1-5 puncte (ponderea 0,1)

5. Eficiența colaborării între organizația din R. Moldova și partenerii naționali și de peste hotare

Descriere narativă – max. 150 cuvinte

Apreciere: 1-5 puncte (ponderea 0,1)

6. Posibilitatea de continuare a cercetărilor în cadrul proiectelor internaționale sau de implementare a rezultatelor obținute în cadrul proiectelor bi/multilaterale

Descriere narativă – max. 150 cuvinte

Apreciere: 1-5 puncte (ponderea 0,1)

### *Concluzii:*

Descriere narativă – max. 150 cuvinte

Apreciere: Foarte bine, bine, satisfăcător, nesatisfăcător (barem de aprobare – 20 p)