

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI  
CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA  
UNIVERSITATEA DE STAT „DIMITRIE CANTEMIR”**

**Cu titlu de manuscris**

**C.Z.U.: 581.2:[633.854.78:582.952.6](043.2)**

**TABĂRĂ OLESEA**

**ESTIMAREA MODIFICĂRILOR FIZIOLOGICE ȘI  
MOLECULARE ALE RĂSPUNSULUI DEFENSIV ÎN SISTEMUL  
GAZDĂ-PARAZIT  
(*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.)**

**164.02 – FIZIOLOGIA VEGETALĂ**

**Rezumatul tezei de doctor în științe biologice**

**CHIȘINĂU, 2020**

Teza a fost elaborată în cadrul Centrului de Genetică Funcțională al Universității de Stat „Dimitrie Cantemir” (USDC).

**Conducător științific:**

**DUCA Maria**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician,  
162.01 – Genetica, 164.02 – Fiziologie vegetală

**Referenți oficiali:**

**ȘTEFÎRȚĂ Anastasia**, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător  
**ALUCHI Nicolai**, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

**Componența consiliului științific specializat:**

**BALAU Nicolae**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, m.c. al AȘM,  
*președinte*  
**CAUȘ Maria**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, *secretar*  
**DASCALIUC Alexandru**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar  
**LISNIC Stelian**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător  
**BÎRSAN Ana**, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la „**23**” **ianuarie 2020**, ora **14<sup>00</sup>**, în ședința Consiliului științific specializat **D 164.02-116** din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, MD 2002, str. Pădurii 20, et. 2, mun. Chișinău, Republica Moldova, tel.: +37322770447, fax: +37322556180, e-mail: institut.gtpp@gmail.com

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică „Andrei Lupan” (MD 2028, str. Academiei 5a, mun. Chisinau) și pe pagina web a CNAA/ANACEC (<http://www.cnaa.md>)

Rezumatul a fost expediat la „\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2019.

*Secretar științific al Consiliului  
Științific Specializat*



**CAUȘ Maria**,  
dr. șt. biol., conf. cercet.

*Conducător științific*



**DUCA Maria**,  
acad., dr. hab. șt. biol., prof. univ.

*Autor*



**TABĂRĂ Olesea**

## CUPRINS

<b>REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....</b>	<b>4</b>
<b>1. ASPECTE PRIVIND MECANISMELE DE REZISTENȚĂ ALE PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE.....</b>	<b>6</b>
<b>2. CONDIȚIILE, OBIECTUL ȘI METODELE DE CERCETARE.....</b>	<b>7</b>
<b>3. ESTIMAREA MODIFICĂRILOR FIZIOLOGICE, HISTOLOGICE ȘI BIOCHIMICE ASOCIATE CU REZISTENȚA PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE.....</b>	<b>8</b>
3.1. Aspecte fenotipice ale cultivării plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare.....	8
3.2. Fortificarea pereților celulari la floarea-soarelui.....	9
3.3. Profilul biochimic al rădăcinilor de floarea-soarelui cultivată pe fondal de infestare.....	12
<b>4. ASPECTE MOLECULARE ALE RELAȚIEI <i>Helianthus annuus</i> L. – <i>Orobanche cumana</i> Wallr.....</b>	<b>17</b>
4.1. Analiza profilului de expresie al genelor din calea metabolică a ligninei.....	17
4.2. Studiul <i>pattern</i> -ului de expresie al genelor din calea metabolică a calozei.....	19
4.3. Expresia genelor codificatoare de enzime antioxidante.....	21
<b>CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE.....</b>	<b>27</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>29</b>
<b>LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI.....</b>	<b>30</b>
<b>ADNOTARE (în limba română, engleză și rusă).....</b>	<b>31</b>

## REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea temei.** Problema rezistenței și receptivității plantelor la factorii nefavorabili de mediu este considerată a fi de o maximă importanță atât pentru știința biologică contemporană, cât și pentru sectorul de producere al plantelor de cultură. Această prerogativă este determinată de cerințele actuale ale societății, de promovare a agriculturii eficiente cu utilizarea culturilor rezistente la diferiți factori. Prin rezistența față de patogeni se subînțelege însușirea organismului de a suporta acțiunea distructivă a invadatorului, aceasta reprezentând un fenomen complex care evoluează concomitent cu planta gazdă și patogenul. În acest context, studiul mecanismelor de rezistență constituie o sarcină primordială ce necesită elucidare.

Patosistemul *Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr. (lupoaie) reprezintă un exemplu elocvent pentru evidențierea celor două tipuri de rezistență: verticală (oligogenică) și orizontală (poligenică). Primul tip se manifestă prin mecanisme defensive specifice față de anumite rase fiziologice ale unui patogen și este bazată pe principiul *genă-pentru genă* care a fost eficient până la apariția raselor de lupoaie mai agresive (G-H), ce au depășit genele *Or1-Or6* de rezistență [12, 32].

Al doilea tip are un caracter permanent și se manifestă prin mecanisme nespecifice față de toate rasele patogenului, fără a se modifica în funcție de acestea [31], exprimându-se prin sporirea cantitativă a unor compuși metabolici. Reacția fiziologică a gazdei la infecția cu patogen poartă un caracter de fază prin modificarea parametrilor metabolici de la etapa incipientă de excitare spre dereglare și adaptare. Aceste trei faze se caracterizează prin particularități distinctive în manifestare ca esență fiziologică, ritm și timp de derulare în funcție de faza de dezvoltare a patogenului – germinarea, atașarea și conectarea la sistemul vascular al gazdei [22].

**Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor cercetate.** Interacțiunea dintre gazdă și lupoaie depinde, în mare măsură, de un ansamblu de particularități ale fiecărui organism în parte: ale parazitului (afinitate, agresivitate și virulență), plantei-gazdă (gene de rezistență), precum și de acțiunea factorilor de mediu. Parazitismul constă în absorbția substanțelor nutritive și apei din vasele conducătoare ale rădăcinii de *H. annuus*, la nivelul cărora *O. cumana* formează haustorii [11].

Încercările efectuate pentru a dezvolta metode eficiente de control a lupoaiei la scară mondială nu au produs succese mari și rezultate scontate, deoarece hibrizi obținuți în baza unei singure gene *Or* prezintă o rezistență de scurtă durată și sunt rapid devansați prin apariția raselor mai virulente [20]. Ulterior, în ultimele decade, direcțiile de cercetare au fost axate pe studii genetice ale rezistenței determinate de mecanisme poligenice cantitative [23]. În acest caz, se implică un sistem de protecție complex la nivel morfologic, histologic și metabolic în concordanță cu condițiile de mediu și cele ontogenetice. Complexitatea ei oferă siguranță și

durabilitate, dar implică dificultăți de manipulare, evaluare, acumulare și transfer [28]. Întrucât mecanismele de rezistență nespecifică se realizează față de toate rasele sau izolatele patogenului, nu există interacțiuni specifice hibrid-rasă [32].

Pe parcursul ultimilor decenii în Republica Moldova au fost realizate un șir de studii atât privind mecanismele defensive specifice, cât și cele nespecifice ale plantelor de floarea-soarelui față de lupoaie. Primele încercări de ameliorare în aspectul rezistenței la lupoaie s-au realizat la Institutul de Cercetare a Culturilor de Câmp „Selecția” [4]. Mai recent, germoplasma autohtonă a fost supusă testării potențialului defensiv față de lupoaie prin metode de analiză moleculară [14, 25-27]. Însă, aceste rezultate sunt fragmentare și nu oferă o abordare complexă la diferite nivele a procesului fiziologic de rezistență. Reieșind din cele expuse o direcție importantă în cercetările agro-biologice o reprezintă studiul mecanismelor defensive la diferite nivele funcționale: morfo-anatomic, fiziologic și molecular. Prin urmare, este necesară o mai bună cunoaștere a mecanismelor responsabile de rezistența plantelor la atacul paraziților, pentru îmbunătățirea producției de culturi agricole cu rezistență de lungă durată. Elucidarea fenomenelor implicate în răspunsul imun pe exemplu unui sistem model, permite transpunerea acestora la alte sisteme, astfel, fundamentând problema rezistenței plantelor.

**Scopul** lucrării constă în elucidarea modificărilor fiziologice și moleculare asociate cu rezistență plantelor la atacul lupoaiei ca bază științifică de ameliorare și optimizare a tehnologiei de cultivare a plantelor de floarea-soarelui în Republica Moldova.

Pentru realizarea scopului au fost înaintate următoarele **obiective**:

- Studiul histochimic privind fortificarea pereților celulari ai celulelor rădăcinare de floarea-soarelui în cadrul sistemelor de compatibilitate și incompatibilitate cu *O. cumana*
- Evaluarea răspunsului defensiv prin estimarea activității unor enzime (fenilalanin amonioliază, superoxid dismutazei și ascorbat peroxidazei) la diferite etape de infestare artificială cu *O. cumana*.
- Estimarea cantitativă a expresiei genelor implicate în fortificarea pereților celulari, neutralizarea superoxidului și a peroxidului.
- Analiza integrativă a parametrilor histologici, biochimici și moleculari, pentru validarea și evaluarea utilității acestora în strategiile de ameliorare.

**Ipoteza de cercetare.** Răspunsul plantei la stres este un proces foarte complex, implicând coordonarea ordonată a mii de gene din diferite procese metabolice ale celulei, ce conduc la reorganizarea structurilor celulare și modificarea fluxurilor de substanțe metabolice. Studiile anterioare au abordat ideea existenței unui ciclu adaptiv general de răspuns la stres, influențat de diferiți factori biotici și abiotici, întrucât în majoritatea cazurilor se activează unele și aceleași gene și proteine. Avantajul investigării mecanismelor de rezistență ale culturii de floarea-soarelui

la atacul lupoaiei va permite fundamentarea teoretică cu privire la acțiunile defensive *în baza expresiei genelor* corelate cu *studiul histologic și activitatea enzimatică*, pentru integrarea acestora în contextul studierii schemei ipotetice de implicare a unor gene în manifestarea rezistenței. Mecanismele elucidate în urma analizei, vor putea fi transpuse la alte sisteme gazdă – parazit în programele de selecție și ameliorare pentru obținerea de soiuri și hibrizi rezistenți ai plantelor de cultură.

#### **Sinteza metodologiei de cercetare și justificare a metodelor de cercetare alese.**

Prezentul studiu a avut la bază realizarea experimentului științific de cultivare în vase de vegetație în lipsa infestării (sol necontaminat) și pe fondal de infestare (substrat contaminat cu lupoaie) pentru colectarea materialului vegetal utilizat în studiul sistemic (*de la analiza moleculară la nivel de expresie a genelor până la caracter fenotipic*) al modificărilor determinate de acțiunea patogenului. În scopul obținerii unor date complementare referitor la mecanismele de rezistență nespecifică au fost utilizate metode calitative (*colorarea cu Safranin O și Aniline Blue*), cantitative (*morfometrie, spectrofotometrie, RealTime-PCR*) și statistico-matematice de analiză comparativă și integrativă.

## **CONȚINUTUL TEZEI**

În *introducere* este sistematizată și expusă pe scurt informația privind situația actuală în domeniul de cercetare, este motivată actualitatea problemei propuse spre soluționare, sunt determinate scopul și obiectivele lucrării, este indicată ipoteza și sinteza metodologiei de cercetare cu justificarea metodelor de analiză alese și sumarul compartimentelor tezei.

### **1. ASPECTE PRIVIND MECANISMELE DE REZISTENȚĂ ALE PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE**

În acest compartiment sunt reflectate viziunile actuale din literatura de specialitate privind rezistența orizontală ale plantelor de floarea-soarelui la *O. cumana* în funcție de etapele de dezvoltare ale rizopatogenului și formarea patosistemului. Capitolul de față descrie mecanismele defensive care se activează la diverse etape de formare a patosistemului: *pre-atașament, post-atașament (pre-haustorial)* și *post-haustorial*. O atenție deosebită se acordă fortificării pereților celulari, blocării vaselor conducătoare prin acumulări a diferitor compuși și rolului speciilor reactive de oxigen care au funcția de semnalizare și activare a răspunsului defensiv. Astfel, au fost trecute în revistă cele mai recente aspecte ale mecanismelor nespecifice de rezistență care se manifestă la nivel histologic, biochimic și molecular, cunoașterea cărora va facilita ameliorarea acestei culturi.

## 2. CONDIȚIILE, OBIECTUL ȘI METODELE DE CERCETARE

**Caracteristica materialului de studiu.** În calitate de obiect de cercetare au servit șase genotipuri de floarea-soarelui, dintre care patru rezistente (Favorit, LC-1093A, PR64LE20 și LG-5542) și două sensibile (Performer și LG-5525) la acțiunea parazitului, oferite de INCDA Fundulea, România și Î.C.S. Limagrain Moldova S.R.L., Republica Moldova. Pentru facilitarea descrierii, genotipurile rezistente au fost notate convențional cu R, iar cele sensibile cu S. Favorit R și LC-1093A R conține gena *Or6* care conferă rezistență specifică față de rasa fiziologică F de lupoaie, iar genotipurile LG-5542 R și PR64LE20 R sunt rezistente la rasele G și, respectiv, H. Genotipul Performer S nu prezintă nici o genă *Or* [24]. Pentru crearea fondalului de infestare artificială au fost utilizate semințele de lupoaie colectate din localitatea Sîngera, Republica Moldova în anul 2014, care conform rezultatelor obținute aparțin rasei F și manifestă o intensitate de atac înaltă asupra genotipurilor de floarea-soarelui [7].

**Condiții de cultivare.** Infestarea artificială și creșterea plantelor de floarea-soarelui s-a realizat în vase de vegetație de 5 l în substrat infestat uniform cu semințe de lupoaie nepreconđionate în raport de 37 mg la 200 g amestec de sol cu nisip. Genotipurile cultivate în substrat neinfestat au servit în calitate de martor.

**Prelevarea materialului.** Probele de țesut radicular de floarea-soarelui au fost colectate în dinamică pe parcursul a 67 de zile, când plantele prezentau butoni florali, în concordanță cu cele patru etape de dezvoltare a patogenului: formarea primelor atașamente (18-21 de zile), dezvoltarea tuberculilor (35 de zile), formarea lăstarului subteran (53 de zile) și lăstarului aerian (67 de zile).

**Metode de cercetare.** Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost utilizate următoarele metode: observații fenologice, măsurări morfometrice ale înălțimii, evidențierea acumulărilor de caloză și lignină prin colorări histochemice ale secțiunilor radiculare transversale [2], cuantificarea activității enzimatică (fenilalanin amonia-liazei, superoxid dismutazei și ascorbat peroxidazei) prin spectrofotometrie [33], determinarea conținutului proteic prin metoda Bradford [3], extragerea ARN-ului cu TRI reagent, cuantificarea ARN-ului prin spectrofotometrie, electroforeză în gel de agaroză a ARN-ului și produșilor de amplificare, transcripția inversă, RealTime-PCR [18], metode bioinformatică și statistice de prelucrare a datelor. La genotipurile cultivate pe fondal de infestare analiza nivelului de expresie a genelor studiate a fost exprimată în raport exp./martor (*fold change*) și diferențele au fost considerate statistic semnificative când *fold change* a fost  $\leq -1,5$  sau  $\geq 1,5$  și valoarea *p* sub 0,05 [18].

### 3. ESTIMAREA MODIFICĂRILOR FIZIOLOGICE, HISTOLOGICE ȘI BIOCHIMICE ASOCIATE CU REZISTENȚA PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE

Strategiile plantelor de a se opune invaziei patogenului se realizează la diferite nivele de organizare a materiei vii: molecular, subcelular, celular, organ, organism, populațional etc. și se formează cu contribuția diferitor mecanisme: genetice, biochimice, fiziologice, morfo-anatomice ce sporesc capacitatea gazdei de a supraviețui, a se autoreproduce și dezvolta în condiții variabile de mediu.

#### 3.1. Aspecte fenotipice ale cultivării plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare

Aspectul morfo-fenotipic al genotipurilor de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare cu *O. cumana* reprezintă rezultatul reacției de răspuns și însumează totalitatea mecanismelor defensive, conferind capacitatea de adaptare și menținerea echilibrului intern.

***Dinamica formării patosistemului floarea-soarelui – lupoaie.*** Ciclul vital al *Orobanche cumana* cuprinde o serie de etape ontogenetice bine definite spațial și temporar, care reprezintă ținte potențiale pentru strategiile defensive ale plantei-gazdă. Astfel, specificul interacțiunii dintre gazdă și parazit este determinat de schimbul și recunoașterea semnalelor moleculare de către ambii parteneri [22]. În vederea identificării și selectării corecte a etapelor ciclului vital al lupoaiei, a fost montată o experiență prealabilă. Astfel, analiza dezvoltării ontogenetice gazdă-parazit, realizată în decursul a 67 de zile, cu evaluarea periodică a permis selectarea etapelor de analiză experimentală: formarea primelor atașamente 18-21 de zile, dezvoltarea tuberculilor - 35 de zile; formarea lăstarilor subterani și a celor aerieni - 53 și, respectiv, 67 de zile [22].

***Modificările fenotipice ale dezvoltării plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare.*** Plantele martor (atât genotipurile rezistente cât și cele sensibile) au fost cultivate în sol neinfestat și au prezentat o dezvoltare normală începând cu prima etapă de colectare (18 zile) și finalizând cu ultima (67 de zile). Plantele de floarea-soarelui cultivate pe substrat infestat au prezentat un tablou fenotipic așteptat la formele rezistente și cele sensibile. Genotipurile Performer S și LG-5525 S au fost infestate intens de către parazit, la toate etapele de dezvoltare ale acestuia, formând tuberculi și lăstari de lupoaie pe rădăcinile plantelor gazdă. În sistemul compatibil patogenul se hrănește pe contul gazdei, și aceasta se răsfrânge asupra parametrilor cantitativi, determinând reducerea cu aproximativ 40% a dimensiunilor plantelor.

Genotipurile rezistente nu au prezentat semne fenotipice de infestare - lipsesc bulbii și lăstarii fixați pe rădăcinile de floarea-soarelui cultivată pe substrat infestat și nu se constată devieri majore ale dimensiunilor liniare. Astfel, presupunem că genotipurile care au format



sisteme incompatibile cu lupoaia și își pot activa doar două tipuri de mecanisme defensive la etapa de *pre-atașament* și cea *post-atașament* cu o posibilitate mai redusă.

### 3.2. Fortificarea pereților celulari la floarea-soarelui

Un rol semnificativ în mecanismele de apărare la nivel *post-atașament* și *post-haustoriale* revine barierelor fizice determinate de acumularea compușilor fenilpropanoidici. Principalele reacții defensive reprezintă lignificarea pereților celulari dependentă de peroxidaze, încapsularea pe suprafața parenchimului cortical, depozitarea carbohidraților, dezorganizarea haustoriului. Acestea periclitizează supraviețuirea rizopatogenului și determină necroza atașamentelor și bulbilor ca efect al lipsei unor conexiuni viabile, fără acces la apă și nutrienți [21, 22]. Totodată, un alt eveniment important în răspunsul gazdei la patogen este acumularea calozei în structurile membranare, proces observat la numeroase plante inclusiv la floarea-soarelui infestată cu *O. cumana* [11].

**Determinarea acumulării ligninei în țesutul radicular de floarea-soarelui.** Analiza secțiunilor transversale ale plantelor crescute în absența infestării (martor) a relevat profilele histochimice (nivel de acumulare a ligninei și aspectul morfo-anatomic) practic identice la genotipurile rezistențe și sensibile, pe toată perioada de studiu (Figura 3.1).

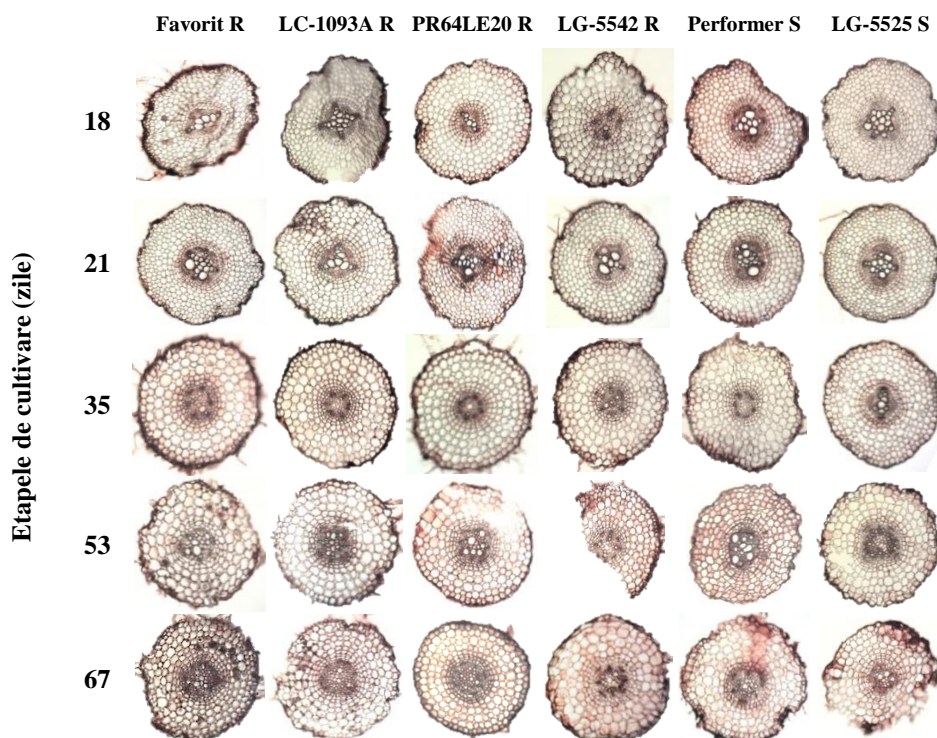


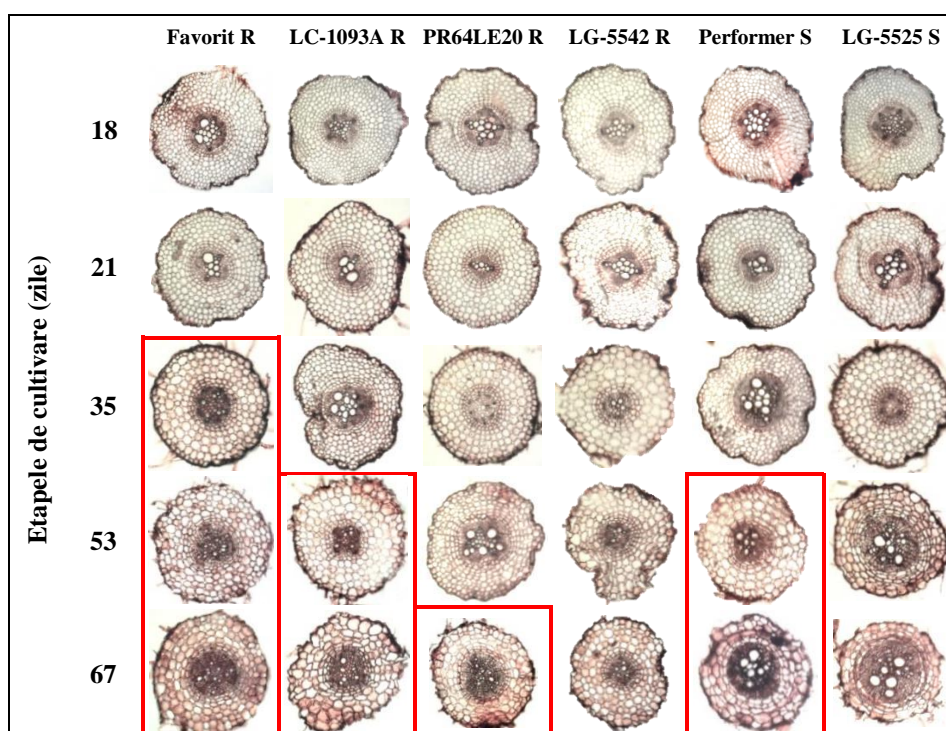
Fig. 3.1. Identificarea histochimică a ligninei ( $\times 160$  de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în sol neinfestat.

În aspect comparativ, studiul histochimic al rădăcinilor genotipurilor de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare cu lupoaie au evidențiat acumularea suplimentară de lignină, fapt ce denotă declanșarea mecanismelor defensive care variază în funcție de stadiul de dezvoltare a gazdei și patogenului, de genotip și de natura genetică a acestuia.

Astfel, activarea metabolismului ligninei, ca reacție de apărare împotriva invaziei lupoaiei a fost atestată la genotipul Favorit R după 35 de zile de co-cultivare, urmat de genotipul LC-1093A R după 53 de zile și genotipul PR64LE20 R după 67 de zile (Figura 3.2) [10].

După formarea lăstarilor subterani și aeriени s-a atestat o acumulare mai intensă a ligninei în secțiunile obținute din limitele zonei de penetrare și conectare a patogenului cu rădăcinile genotipului Performer S (Figura 3.2). Deși, la Performer S, după 50 zile se declanșează reacția de răspuns, acest fapt nu-i permite plantei să lupte cu patogenul, deoarece el este infestat intens, pe rădăcinile unui individ s-au depistat peste 30 de tuberculi și lăstari.

Spre deosebire de Performer S, genotipul LG-5525 S nu a prezentat lignificarea suplimentară a pereților celulari în țesuturile radiculare supuse analizei (Figura 3.2) [10].

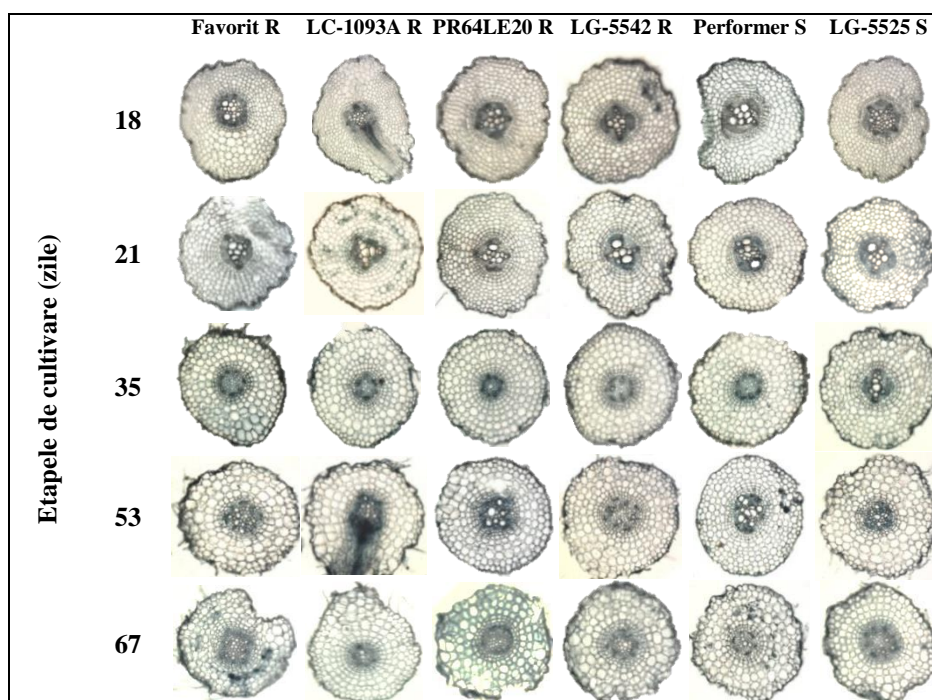


**Fig. 3.2. Identificarea histochimică a ligninei ( $\times 160$  de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare artificială cu lupoaie.**

*În chenar roșu sunt marcate secțiunile cu acumulări suplimentare*

O particularitate comună pentru genotipurile sensibile infestate a fost faptul că cilindrul central s-a dilatat ca rezultat al conexiunii cu patogenul și al interacțiunii dintre membrii patosistemului.

**Evidențierea acumulării calozei în peretele celular al celulelor rădăcinilor de floarea-soarelui.** Analiza secțiunilor transversale ale probelor martori nu a indicat diferențe în nivelul de acumulare a calozei la toate genotipurile studiate pe toată perioada experimentală (Figura 3.3).



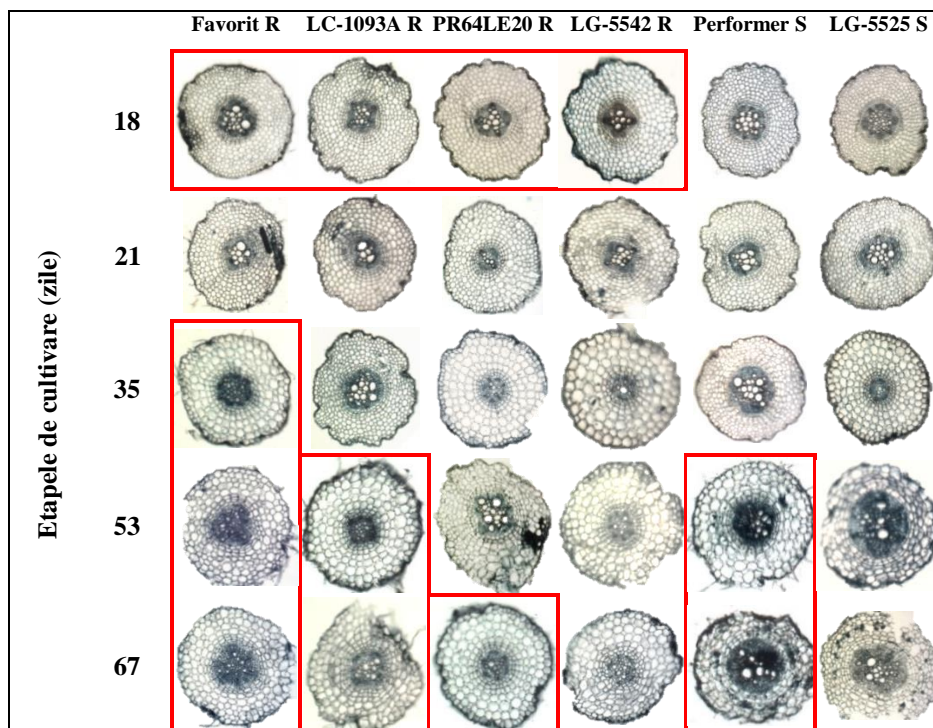
**Fig. 3.3. Identificarea histochimică a calozei ( $\times 160$  de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în sol neinfestat.**

Profilului histochimic al acumulării calozei, ca mecanism de răspuns al plantelor de floarea-soarelui la atacul parazitului *O. cumana*, a demonstrat că în cazul tuturor sistemelor incompatibile dintre gazdă și patogen se activează calea de biosinteză polimerului și depozitarea acestuia în pereții celulari ai celulelor epidermei la etapa de 18 zile. Reacția dată a apărut în urma recunoașterii biochimice stabilite între rădăcinile gazdei și semințele germinate de lupoaie. La următoarele etape conținutul compusului a scăzut. Totuși, în dinamică sinteza suplimentară de caloză s-a relevat la genotipurile Favorit R, LC-1093A R și PR64LE20 R începând cu etapele de 35, 53 și, respectiv, 67 de zile.

În cazul celor două sisteme de compatibilitate dintre gazdă - patogen, rezultatele au fost diferite. Astfel, la genotipurile Performer S cantități ridicate de caloză au fost detectate în pereții celulari ai cilindrului central, în special la etapele de formare a lăstarilor subterani și aerieni (Figura 3.4) [10].

Se constată că la genotipurile menționate, la nivel histochimic, mecanismele defensive se activează doar după formarea conexiunii cu patogenul, adică pot fi asociate rezistenței *post-haustoriale*.

Al doilea genotip sensibil nu a manifestat acumularea compusului nici la o etapă de analiză.



**Fig. 3.4. Identificarea histochimică a calozei ( $\times 160$  de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare artificială cu lupoaie.**

*În chenar roșu sunt marcate secțiunile cu acumulări suplimentare*

Evaluarea prezenței și acumulării suplimentare a ligninei și calozei la genotipurile de floarea-soarelui supuse infestării artificiale cu lupoaie a permis evidențierea activării mecanismelor defensive la trei genotipuri rezistente și la unul sensibil.

### 3.3. Profilul biochimic al rădăcinilor de floarea-soarelui cultivată pe fondal de infestare

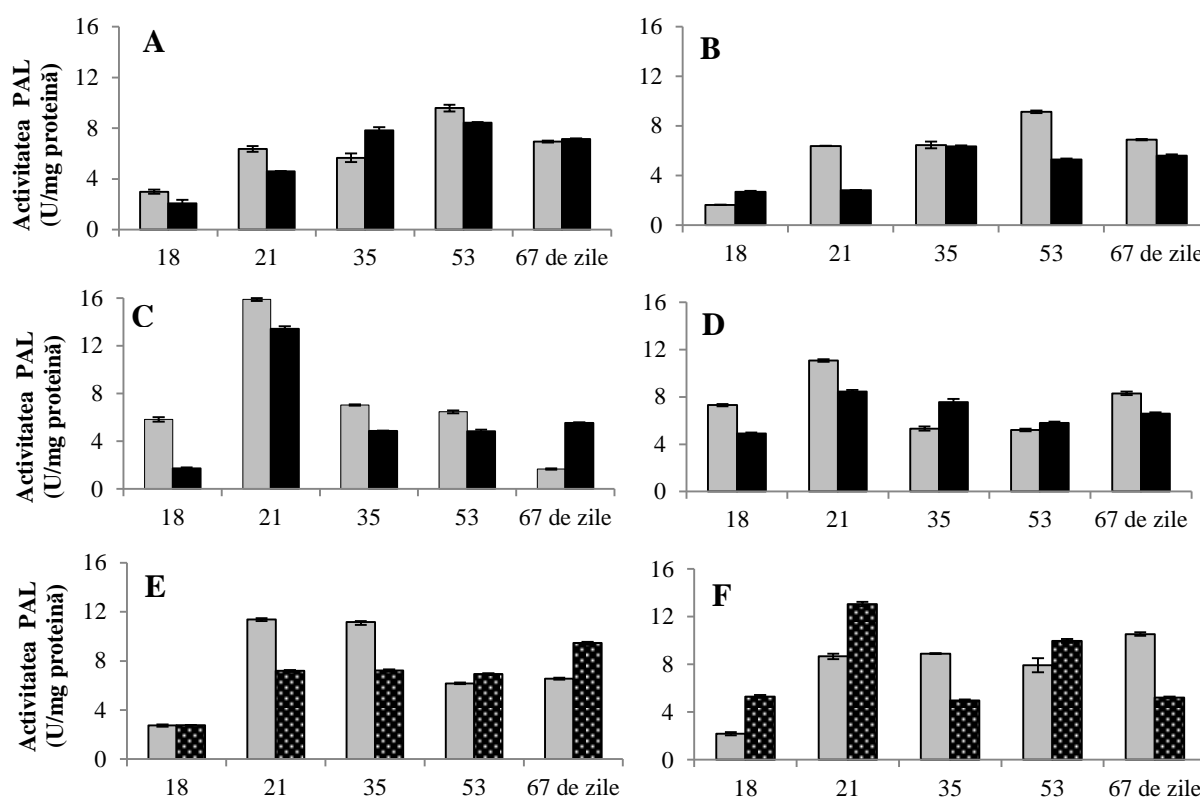
Modificările biochimice depind de nivelul de sensibilitate a plantelor față de factorii de stres, de perioada de dezvoltare, de durata de acțiune a patogenului etc. Una dintre primele modificări biochimice observate după recunoașterea patogenului este explozia oxidativă și generarea de SRO, urmată, de activarea enzimelor responsabile de fortificarea pereților celulari.

**Activitatea fenilalanin amonia-liazei.** Acumularea compușilor fenilpropanoidici și fortificarea pereților celulari reprezintă un mecanism esențial în apărarea plantelor gazdă față de patogenii din grupul *Orobanchaceae* la nivel *post-atașament* și *post-haustorial*. Sinteza acestor compuși este demarată de enzima fenilalanin amonia-liaza (PAL) sub acțiunea căreia se realizează dezaminarea non-oxidativă a L-fenilalaninei, care ulterior, după mai multe transformări, generează trei tipuri de lignină [16].

În ansamblu, activitatea enzimei PAL evaluată în dinamică la genotipurile rezistente cultivate în lipsa infestării a prezentat profiluri diferite, determinând repartizarea acestora în două grupe: primul grup - Favorit R și LC-1093A R la care acest parametru sporește până la a 53-a zi (cu valori de peste 9 U/mg proteină) și apoi diminuează și al doilea grup cu PR64LE20 R și LG-

5542 R – în cazul cărora activitatea crește până la a 21-a zi după care descrește (Figura 3.5 A-D). Genotipul Performer S în condiții normale a manifestat cea mai mare funcționalitate a proteinei PAL la 21 și 35 de zile de cultivare, care s-a redus aproape în jumătate la 53 și 67 de zile (Figura 3.5 A). La LG-5525 S activitatea enzimei a sporit de la 18 zile, menținându-se aproximativ la un nivel constant la următoarele trei etape de vegetație (Figura 3.5 B) [9].

În aspect comparativ, activitate al PAL la genotipurile Favorit R și LG-5542 R supuse infestării artificiale a manifestat valori mai sporite față de probele martor la 35 de zile de cultivare cu 38% ( $p=9*10^{-4}$ ) și, respectiv, 42% ( $p=3*10^{-4}$ ), iar la genotipul PR64LE20 R la 67 de zile de 3,3 ori ( $p=1*10^{-4}$ ) (Figura 3.5 A, C, D). Activitatea enzimei PAL la genotipul LC-1093A R cultivat pe fondal de infestare a prezentat valori mai mici față de martor (Figura 3.5 B).



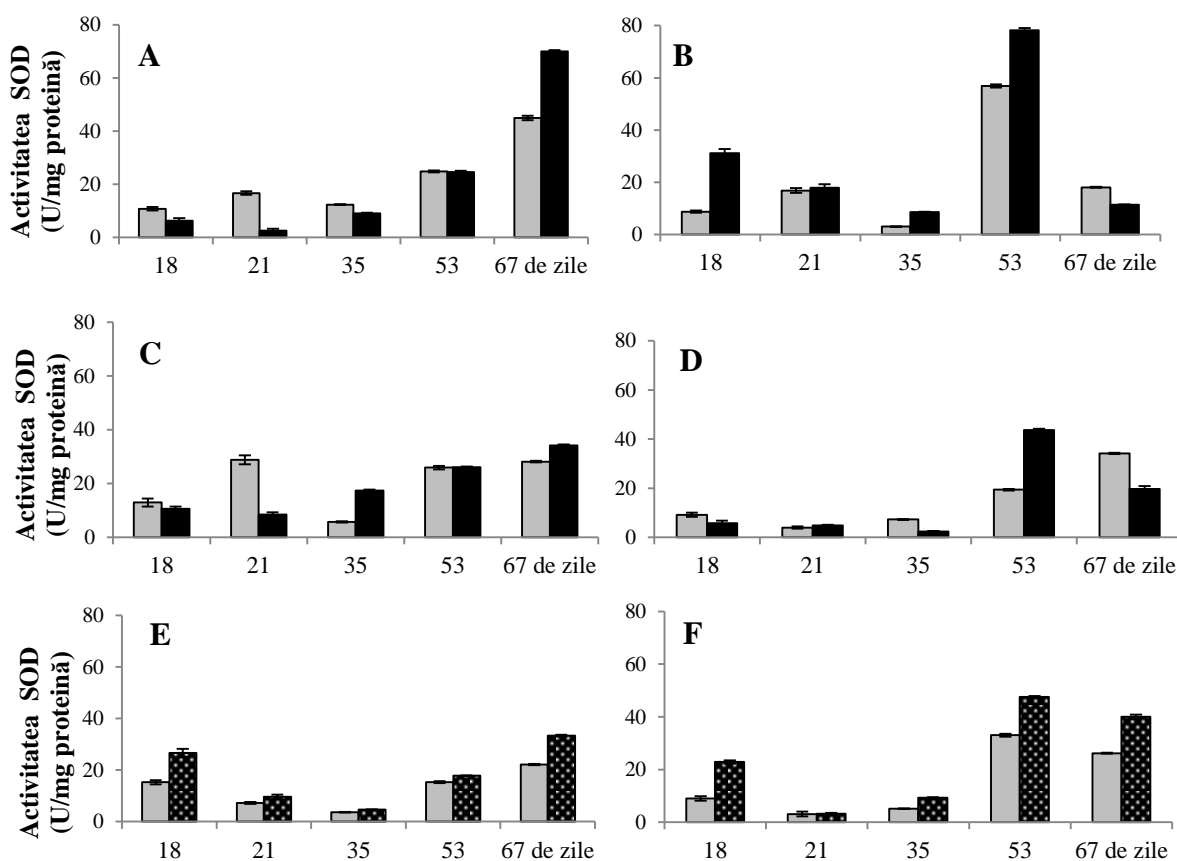
**Fig. 3.5. Activitatea fenilalanin amonia-liazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui**  
A – Favorit R, B – LC-1093A R, C – PR64LE20 R, D – LG-5542 R, E – Performer S, F – LG-5525 S.  
■ Martor ■ Cultivat pe fondal de infestare ■ Infestat

Penetrarea țesuturilor radiculare a genotipurilor sensibile de către patogen a determinat declanșarea unei reacții de răspuns, exprimată prin modificarea diferită a activității enzimei PAL. Astfel, la genotipul Performer S activitatea PAL a sporit cu 12% ( $p=2*10^{-4}$ ) și 44% ( $p=1*10^{-4}$ ) doar la ultimele etape de dezvoltare a patosistemului care corespund cu dezvoltarea lăstarilor subterani și aerieni (Figura 3.5 E), iar în cazul celui de-al doilea genotip LG-5525 S, majorarea activității enzimatică de 2,4 ori ( $p=1*10^{-4}$ ) s-a înregistrat la etapa de 18-21 de zile (Figura 3.5 F) [9].

Generalizând rezultatele privind activitatea enzimei fenilalanin amonia-liazei la genotipurile rezistente și sensibile la infecția artificială cu *O. cumana* putem conchide că sporirea activității enzimei PAL determină acumularea suplimentară a ligninei în pereții celulelor cilindrului central, pentru a preveni invazia patogenului și conectarea acestuia la vasele conducătoare ale gazdei [5].

**Activitatea enzimatică a superoxid dismutazei.** Celulele vii supuse stresului în momentul interacțiunii cu parazitul, produc și acumulează specii reactive de oxigen (SRO) printre care superoxidul ( $O_2^-$ ).  $O_2^-$  este dismutat de către enzimele grupului superoxid dismutazelor (SOD; CE 1.15.1.1) în oxigen și peroxid de hidrogen. Recunoașterea de către receptorii membranari ai patogenilor și producerea SRO ca răspuns la invazia acestora reprezintă o reacție de apărare care asigură diminuarea creșterii și dezvoltării agresorului [19].

În ansamblu, activitatea enzimelor SOD a prezentat o tendință de diminuare la etapele de 21-35 de zile, urmată de creșterea acesteia până la fazele finale ale experimentului atât la plantele martor, cât și la cele supuse stresului (Figura 3.6).



**Fig. 3.6. Activitatea superoxid dismutazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui**  
A – Favorit R, B – LC-1093A R, C – PR64LE20 R, D – LG-5542 R, E – Performer S, F – LG-5525 S.  
□ Martor      ■ Cultivat pe fondal de infestare      ▨ Infestat

Analiza activității SOD la formele cultivate în lipsa infestării a pus în evidență profilele biochimice diferite, caracterizate prin alternarea activității enzimice (Figura 3.6 A-F). Cele mai

mari valori ale activității SOD au fost semnalate la etapa de 53 de zile (genotipurile LC-1093A R și LG-5525 S cu valori de 33,01 și 56,89 U/mg proteină) și de 67 de zile (Favorit R, LG-5542 R și Performer S cu valori cuprinse între 22,14 - 44,93 U/mg proteină).

Comparând rezultatele obținute pentru cele patru genotipuri rezistente cultivate în substrat infestat s-a constatat că, activitatea SOD a manifestat două tendințe. Astfel, genotipurile Favorit R și PR64LE20 R s-au caracterizat prin sporirea activității de la 21 de zile până la etapa finală, primul genotip prezentând valori mai mari (Figura 3.6 A, C). Celelalte două genotipuri (LC-1093A R și LG-5542 R) se remarcă prin valori maxime a parametrului studiat la etapa de 53 de zile de cultivare - de 78,17 U/mg proteină ( $p=1*10^{-4}$ ) și, respectiv, 43,68 U/mg proteină ( $p=1*10^{-4}$ ) (Figura 3.6 B, D).

Activitatea SOD la genotipurile sensibile de floarea-soarelui a fost influențată de infestarea cu *O. cumana*, prezentând o dinamică similară. La ambele patosisteme, acest parametru a fost mai mare comparativ cu martorul pe toată perioada de cultivare, demonstrând valori sporite (de 26,58 U/mg proteină și respectiv 22,81 U/mg proteină) la atașarea primelor apresorii (18 zile), când s-a format legătura intimă dintre gazdă și patogen și s-au activat mecanismele defensive *post-atașament*. Cea mai mare activitate a enzimelor de 33,28 U/mg proteină ( $p=1*10^{-4}$ ) și, respectiv, 47,56 U/mg proteină ( $p=1*10^{-4}$ ), a fost însă, stabilită la etapa de formare a lăstarilor, atunci când plantele sunt epuizate din cauza pierderii substanțelor nutritive.

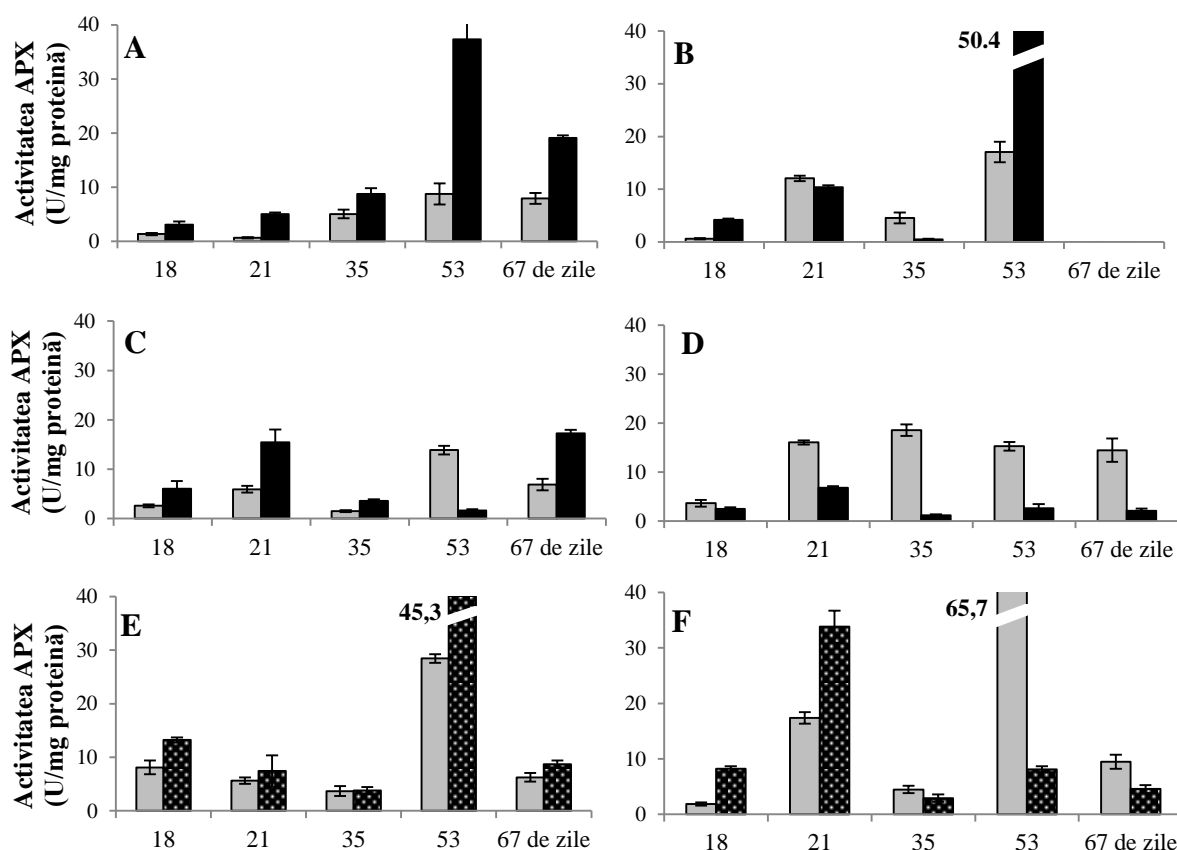
**Activitatea enzimelor ascorbat peroxidazei.** Ca rezultat al dismutării superoxidului se obține peroxid de hidrogen, care formează un potențial biochimic destabilizator pentru structurile celulare. În acest context, un rol semnificativ revine ascorbat peroxidazelor (APX) care catalizează conversia  $H_2O_2$  în  $H_2O$  și  $O_2$ , folosind ascorbatul ca un donator de electroni [6].

Activitatea ascorbat peroxidazelor la toate genotipurile cultivate pe sol neinfestat s-a caracterizat prin valori ce alternează pe toată perioada experimentală. De menționat faptul că, cinci genotipuri au prezentat cel mai înalt nivel al activității APX la etapa de 53 de zile de cultivare cu valori de 8,75 U/mg proteină la Favorit R, 17,07 U/mg - la LC-1093A R, 13,87 U/mg - la PR64LE20 R, 28,43 U/mg și 65,67 U/mg la Performer S și LG-5525 S. La genotipul LG-5545 R cultivat în absența infestării a relevat la a doua etapă sporirea activității de patru ori ulterior, aceasta menținându-se, comparativ, cu mici devieri, în limitele valorilor de 14,46-18,59 U/mg proteină pe toată perioada de cultivare (Figura 3.7 D).

Trei din genotipurile rezistente (Favorit R, LC-1093A R și PR64LE20 R) supuse stresului biotic au manifestat sporirea activității enzimelor APX (Figura 3.7 A-C). La primele două, dinamica este similară, cu un maxim de funcționalitate a enzimei la 53 de zile de cultivare cu valori de 37,34 U/mg proteină ( $p=6*10^{-4}$ ) și, respectiv, 50,37 U/mg proteină ( $p=32*10^{-4}$ ) (Figura 3.7 A, B). La genotipul PR64LE20 R cea mai înaltă valoare a activității APX a fost înregistrată la etapa finală de 67 de zile (Figura 3.7 C). O particularitate relevantă a fost pusă în evidență la

genotipul LG-5542 R care s-a caracterizat prin inhibiția activității APX la formele cultivate în sol infestat în raport cu martorul, pe parcursul întregii perioade experimentale (Figura 3.7 D).

Formarea patosistemelor dintre genotipurile sensibile și lupoai a determinat în ambele cazuri intensificarea activității ascorbat peroxidazei la unele etape de dezvoltare. Infestarea genotipului Performer S a determinat sporirea bruscă a funcționalității APX cu 16,86 U/mg proteină la etapa de dezvoltare a lăstarilor subterani (Figura 3.7 E). Dinamica activității enzimelor APX la cea de-a doua combinație de compatibilitate LG-5525 S – *O. cumana* s-a caracterizat prin valori mai crescute față de martor de 4,4 ori ( $p=1*10^{-4}$ ) și, respectiv, de 1,9 ori ( $p=8*10^{-4}$ ) la primele etape de atașare a apresorilor la rădăcinile gazdei (Figura 3.7 F).



**Fig. 3.7. Activitatea ascorbat peroxidazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui**  
A – Favorit R, B – LC-1093A R, C – PR64LE20 R, D – LG-5542 R, E – Performer S, F – LG-5525 S.  
□ Martor      ■ Cultivat pe fondal de infestare      ▣ Infestat

Mecanismele specifice de rezistență evaluate la nivel histo-anatomic și biochimic au relevat faptul că reacția fiziologică de răspuns la acțiunea factorilor nefavorabili depinde de natura genetică individuală a fiecărui genotip. Astfel, la cele patru genotipuri rezistente față de acțiunea patogenului, reacția defensivă se manifestă în mod diferit. În cazul celor două genotipuri sensibile mecanismele activate au fost insuficiente pentru a reduce invazia și dezvoltarea patogenului.



#### **4. ASPECTE MOLECULARE ALE RELAȚIEI *Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.**

În ultimele două decenii un accent deosebit se acordă studiului mecanismelor de rezistență la nivel molecular. În acest sens un progres în cunoașterea modificărilor expresiei genelor la infecția cu *O. cumana* a fost realizată de Letousey și colab. (2007), care au estimat *pattern*-ele de transcripție a 15 gene implicate în procesele de rezistență nespecifică [17]. Genele analizate fac parte din diferite căi metabolice cum ar fi: transducerea semnalelor, activarea răspunsului defensiv al plantelor, detoxifierea în urma stresului oxidativ, calea metabolică a acidului jasmonic și salicilic, reorganizarea peretelui celular etc.

În vederea elucidării unor aspecte ale răspunsului defensiv, a fost studiată activitatea transcripțională a 14 gene implicate în căile de sinteză a ligninei, calozei și enzimelor PAL, SOD și APX.

Pentru analizele moleculare au fost selectate trei genotipuri - Favorit R, care a manifestat mecanisme de rezistență de la etapa de 35 de zile (acumulare de lignină și caloză, activitate sporită a enzimei PAL), PR64LE20 R, care s-a caracterizat printr-o reacție similară doar că la etapa de 67 de zile și genotipul sensibil Performer S, care a prezentat acumulări de lignină și caloză.

##### **4.1. Analiza profilului de expresie al genelor din calea metabolică a ligninei**

Lignificarea observată în secțiunile transversale ale rădăcinilor plantei gazdă și activitatea enzimei PAL a condus la studiul expresiei genelor implicate în calea de biosinteză a acestui compus. La floarea-soarelui până în prezent a fost descrisă o singură genă *PAL*, care analizată concomitent cu gena - trans-cinamat 4-monooxigenaza (*C4H*), pe fondal de infestare cu *O. cumana in vitro*, a pus în evidență un efect de supraexpresie atât la genotipul rezistent, cât și la cel sensibil [17].

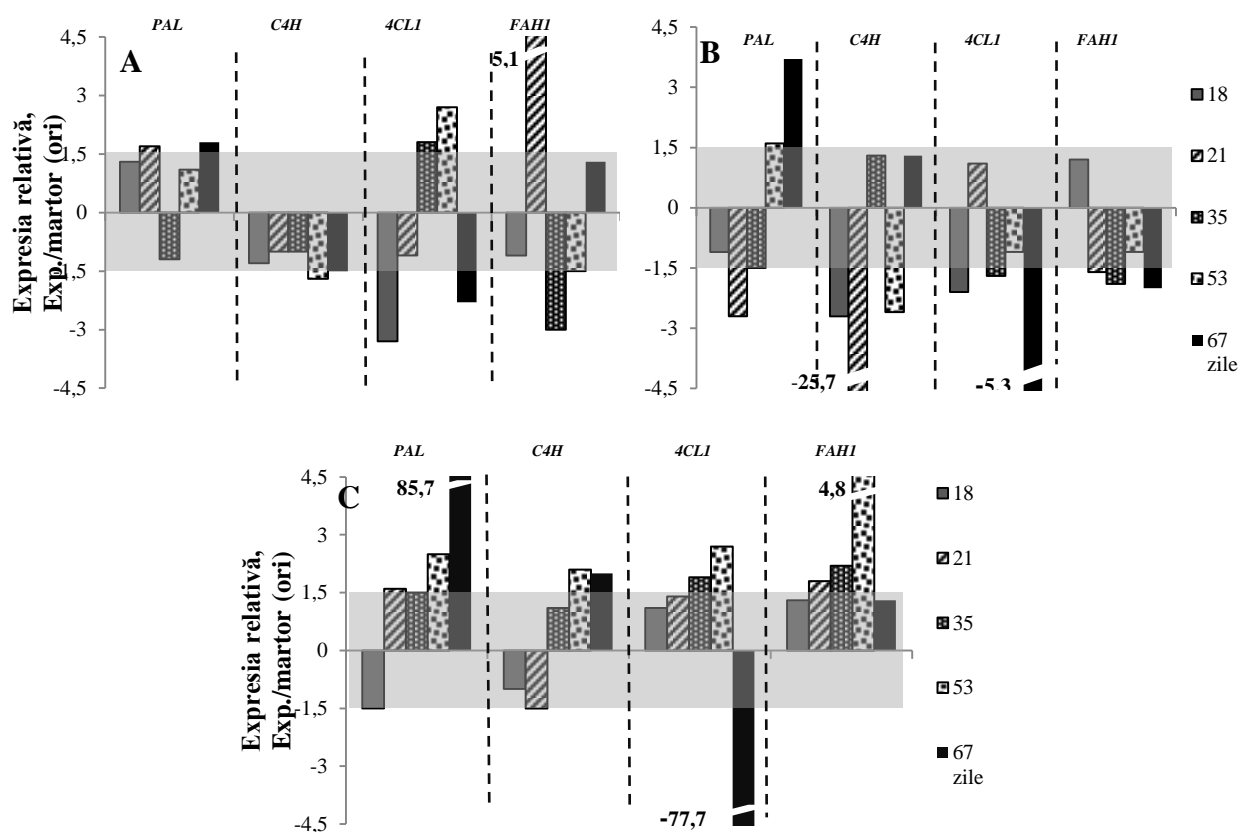
Cu toate că fortificarea pereților celulari reprezintă un mecanism de rezistență *post-atașament*, nivelul de expresie al genelor implicate în calea metabolică a ligninei a subliniat caracteristici specifice și comune, în funcție de natura genetică a genotipurilor [29].

Astfel, activitatea transcripțională a genelor (*PAL*, *C4H*, *4CLI* - 4-coumarate-CoA ligaza și *FAHI* - acidul ferulic 5-hidroxilaza 1) a prezentat valori ale expresiei relative cuprinse între 0,003-2,483 un. c. pentru gena *PAL*, 0,064-1,267 un. c. pentru gena *C4H* și 0,005-0,446 un. c. pentru gena *FAHI* la genotipurile cultivate în absența infestării. Gena *4CLI* a cuprins valori într-un diapazon foarte vast de la 0,04 până la 330,4 un. c.

Genotipul Favorit R supus stresului biotic a prezentat un tablou variat al activității transcripționale, remarcându-se, în special două gene *4CLI* și *FAHI*, care și-au modificat

expresia. La fazele inițiale de dezvoltare, gena *4CLI* a fost subexpresată de 3,3 ori față de proba de referință, ulterior activitatea a sporit după 35 și 53 de zile de cultivare, supraexpresia cuprinzând valori de 1,8 ori și, respectiv, 2,7 ori față de martor. Gena *FAHI*, la fel, a manifestat două extreme în activitate, prin supraexpresie de 5,1 ori la 21 de zile și subexpresie de 3 ori la 35 zile. Conținutul de ARNm al genelor *PAL* și *C4H* s-a menținut în limita martorului, cu unele abateri ne semnificative (Figura 4.1 A) [9].

Activitatea transcripțională a genelor metabolismului ligninei la genotipul PR64LE20 R a fost diferită față de primul genotip. Astfel, genele *4CLI*, *C4H* și *FAHI* au prezentat valori cuprinse în limitele martorilor sau subexpresie pe toată perioada experimentală (Figura 4.1 B). Gena *PAL* a manifestat activitate variată față de celelalte gene - subexpresie de 2,7 ori la 21 de zile și supraexpresie de 3,7 ori la 67 de zile [9].



**Fig. 4.1. Expresia relativă a genelor *PAL*, *C4H*, *4CLI*, *FAHI* (fold change) la floarea-soarelui**  
A – Favorit R, B - PR64LE20 R, C – Performer S.

Nivelul transcripțiilor analizați la momentul formării primelor atașamente dintre lupoai și genotipul Performer S a pus în evidență valori cuprinse în limitele normei de reacție pentru toate cele patru gene, cu unele mici excepții de supraexpresie (Figura 4.1). Totodată, s-a relevat supraexpresia transcripțională a trei (*PAL*, *C4H*, *FAHI*) din cele patru gene la etapa de formare a

lăstarilor subterani și aerieni cu valori maxime (de 85,7 ori) pentru *PAL*. Profilul expresiei modificate al genei *PAL* a fost asemănător după intensitate cu cel al genei *4CL1* dar opus după tendință (reprezia genei de 77,7 ori), ceea ce indică o acțiune de reglare genică prin *retro-inhibiție*. (Figura 4.1 C) [9].

#### **4.2. Studiul *pattern*-ului de expresie a genelor din calea metabolică a calozei**

Încetinirea invaziei patogenilor în țesutul atacat, datorită acumulării calozei, permite plantei să își reorganizeze metabolismul astfel, încât se activează expresia genelor specifice care determină inducerea răspunsurilor de apărare suplimentare.

Actualmente, la floarea-soarelui este identificată o familie de 4 gene, care codifică glucan sintaze (*GSLI-4*). Conform literaturii de specialitate, dintre acestea, doar *GSL1* a prezentat activitate de transcripție în țesut calusal inoculat cu lupoaie a plantulelor crescute *in vitro*, începând cu prima zi de infestare și până la ziua a 8-a [17].

În vederea studierii mecanismelor defensive la nivel molecular, a fost estimată activitatea genelor *GSLI-4* asociate metabolismului calozei în planta gazdă cultivată *in vivo* la diferite etape de invazie a patogenului.

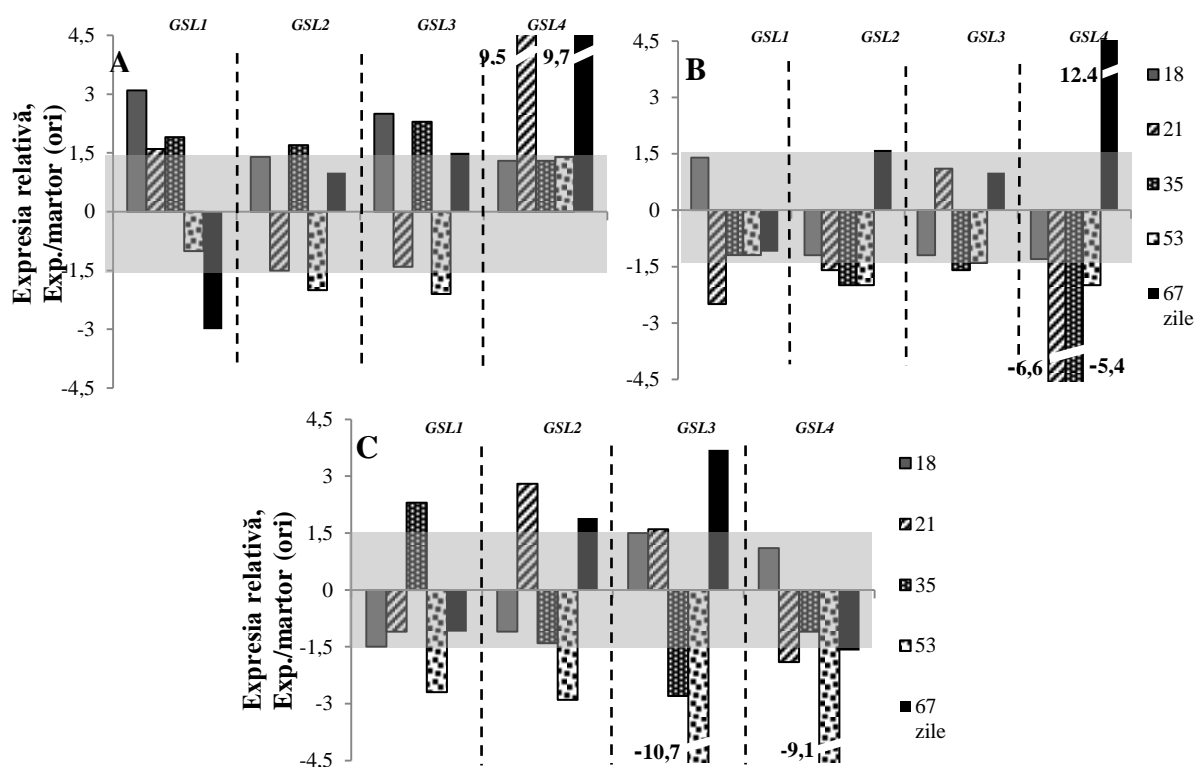
Nivelul de expresie a genelor ce codifică glucan sintazele la genotipurile cultivate în lipsa infestării a indicat valori cuprinse între 0,008-0,256 un. c. pentru gena *GSL1* și 0,002-1,800 un. c. pentru *GSL4* la care intervalele de date au fost mai mari. Pentru genele *GSL2* și *GSL3* au fost caracteristice valori ale expresiei relative cuprinse între 0,011-0,093 un. c. și, respectiv, 0,001-0,051 un. c.

Investigarea profilului de expresie a genelor *GSLI-4* la genotipurile rezistente și cel sensibil de floarea-soarelui supuse infestării cu lupoaie a demonstrat profile diferite, în funcție de natura genetică a acestora. Astfel, în cadrul sistemului de incompatibilitate gazdă – parazit (Favorit R - lupoaie), nivelul de expresie a transcripților *GSL1* a fost mai mare față de martor, la primele trei etape de analiză - 18, 21 și 35 de zile (de 3,1; 1,6 și, respectiv, 1,9 ori), spre deosebire de cel al genelor *GSL2* și *GSL3*, a căror activitate s-a evidențiat doar la 18 și 35 de zile. În ceea ce privește, *GSL4* s-a constatat un maxim de activitate doar în perioadă formării primelor atașamente ale patogenului, peste 21 de zile (de 9,5 ori), precum și la etapa de 67 de zile (de 9,7 ori) (Figura 4.2 A) [30].

Al doilea genotip rezistent față de primul s-a caracterizat prin aspecte diferite ale activității genelor. Astfel, transcripții *GSL2* și *GSL4* au indicat aceeași dinamică a valorilor cantitative a ARNm, determinată prin subexpresie la 18-53 de zile, urmată de supraexpresie la 67 de zile, doar că rezultatele pentru *GSL2* au fost puțin mai mici. Gena *GSL3* a cuprins valori în

limitele matorului la toate etapele de analiză, iar *GSL1* a fost subexpresată de 2,5 ori, doar la 21 de zile de cultivare pe fondal de infestare (Figura 4.2 B).

În cazul patosistemului Performer – *O. cumana* sporirea conținutului de transcripti a trei gene coincide cu etapele de stabilire a contactului intim: *GSL2* și *GSL3* la formarea primelor atașamente și dezvoltarea lăstarilor aerieni, iar *GSL1* după formarea haustoriilor. Gena *GSL1* a indicat un nivel de expresie mai intens de 2,3 ori față de mator la etapa de formare a lăstarilor subterani (35 de zile), atunci când deja s-a produs infestarea și patogenul s-a conectat cu vasele conducătoare ale rădăcinii gazdei, urmată de subexpresia de 2,7 ori la etapa de dezvoltare a lăstarilor subterani. Activitatea genei *GSL4* a prezentat valori în limitele matorului sau de subexpresie cu un maxim de 9,1 ori. Profilul de transcriptie a genelor *GSL2* și *GSL3* s-a remarcat printr-o tendință similară și a pus în evidență valori crescute la două etape de dezvoltare a patosistemului: de formare a primelor atașamente (21 de zile) și a lăstarilor aerieni (67 de zile). Astfel, cantitatea de transcripti ai genei *GSL2* a fost de 2,8 ori și, respectiv, de 1,9 ori mai mare, iar a secvenței *GSL3* de 1,6 ori și, respectiv, de 3,7 ori (Figura 4.2 C).



**Fig. 4.2. Expresia relativă a genelor *GSL1-4* (fold change) la floarea-soarelui**

A – Favorit R, B - PR64LE20 R, C – Performer S.

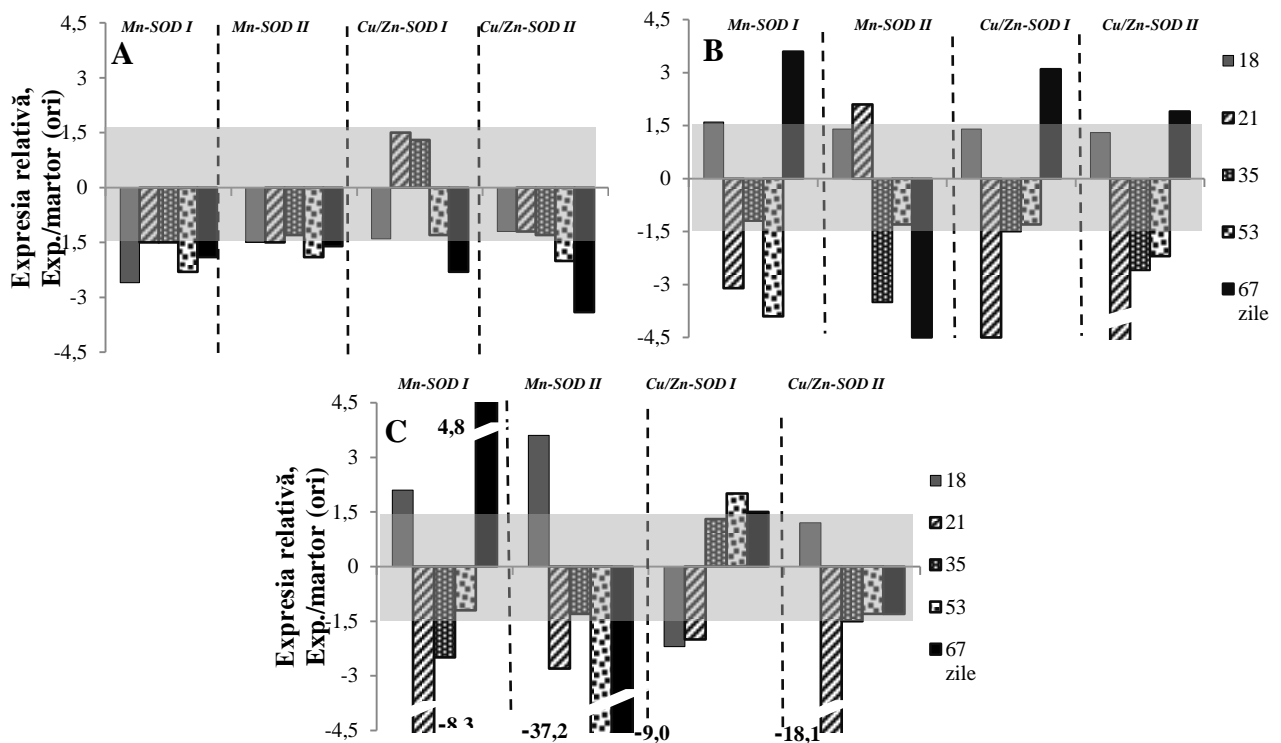
La toate genotipurile studiate a fost constatată o dependență corelativă pozitivă între activitatea genelor *GSL2* și *GSL3* la diferite etape de dezvoltare ontogenetică al plantelor gazdă cultivate în substrat infestat [30].

### 4.3. Expresia genelor codificatoare de enzime antioxidante

Printre primele modificări biochimice, observate după recunoașterea patogenului, se numără explozia oxidativă determinată de generarea SRO [19]. Sistemul de apărare antioxidantă al plantelor, include compuși enzimatici și non-enzimatici. Enzimele de protecție includ catalazele, peroxidazele, ascorbat peroxidazele, superoxid dismutazele etc. [13].

**Profilul transcripțional a genelor ce codifică superoxid dismutazele.** Nivelul de expresie relativă al genelor *Mn-SOD I* și *Cu/Zn-SOD I* la genotipurile cultivate în sol neinfestat a fost cuprins în intervale mici de 0,003-0.181 un. c. și respectiv de 0,016-0,585 un. c. Activitatea transcriptului *Cu/Zn SOD II* a prezentat valori ce au variat într-un interval moderat de 0,017-1,800 un. c., pe când conținutul de ARNm pentru *Mn-SOD II* s-a integrat într-un diapazon foarte mare de 0,241-183,500 un. c.

Genotipului Favorit R cultivat pe fondal de infestare a demonstrat valori ale expresiei genelor *SOD* ce nu au depășit limita matorului a la primele trei etape de analiză. Însă la etapele finale ale experimentului 53-67 de zile, conținutul de transcripti *SOD* s-a diminuat, cu valoare minimă de subexpresie, determinată pentru gena *Cu/Zn-SOD II* (de 3,4 ori) la etapa de 67 de zile (Figura 4.3 A).



**Fig. 4.3.** Expresia relativă a genelor *SOD* (fold change) la diferite genotipuri de floarea-soarelui  
A – Favorit R, B - PR64LE20 R, C – Performer S.

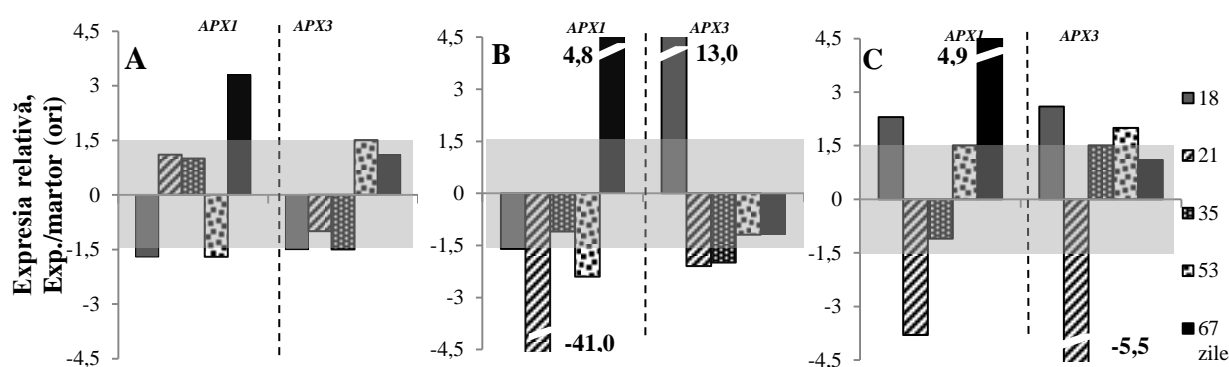
Genotipul PR64LE20 R, spre deosebire de Favorit R, s-a caracterizat printr-un profil ce alternează de la valori în limita matorului spre subexpresie și apoi supraexpresie. Această tendință a fost caracteristică pentru trei gene: *Mn-SOD I*, *Cu/Zn-SOD I - II* (Figura 4.3 B).

În cazul patosistemului Performer S - lupoaie, conținutul ARN-ului mesager al superoxid dismutazelor a prezentat un *pattern* variat la toate genele. Activitatea acestora a înregistrat valori în limita matorului în opt cazuri din 20. Genele *SOD* cu cofactorul Mn au manifestat valori de supraexpresie a transcripturilor de 2,1 și, respectiv, 3,6 ori la etapa de formare a primelor atașamente. Profilul de expresie al transcripturilor *SOD* cu cofactorul Cu/Zn s-a caracterizat prin subexpresie la formarea primelor atașamente, cu indici ai expresiei de 2,0-2,2 ori mai mici față de mator pentru gena *Cu/Zn-SOD I* și de 18,1 ori pentru gena *Cu/Zn-SOD II* (Figura 4.3 C).

***Influența stresului biotic asupra activității genelor ce codifică ascorbat peroxidazele la floarea-soarelui.*** Ascorbat peroxidazele aparțin super-familiei de peroxidaze specifice la plante. Diferite izoforme sunt clasificate în sub-familii în funcție de localizarea lor subcelulară.

Nivelul de activitate a acestora printre genotipurile cultivate în substrat neinfestat a cuprins intervale mai mari pentru gena *APX1* 0,052-2,108 un. c. și mai diminuate 0,023-0,883 un. c. pentru gena *APX3*.

*Pattern*-ul de expresie al genei responsabile de sinteza enzimei citosolice *APX1* la genotipul Favorit R s-a caracterizat prin subexpresie slabă la două etape (18 și 53 de zile cu aceeași valoare de 1,7 ori pentru ambele) și supraexpresie de 3,3 ori la ultima etapă. Evaluarea în dinamică a conținutului transcriptului *APX3* a relevat valori în limitele matorului pe toată perioada de cultivare în condiții de stres biotic (Figura 4.4 A).



**Fig. 4.4. Expresia relativă a genelor *APX1*, *APX3* (fold change) la floarea-soarelui**  
A – Favorit R, B - PR64LE20 R, C – Performer S.

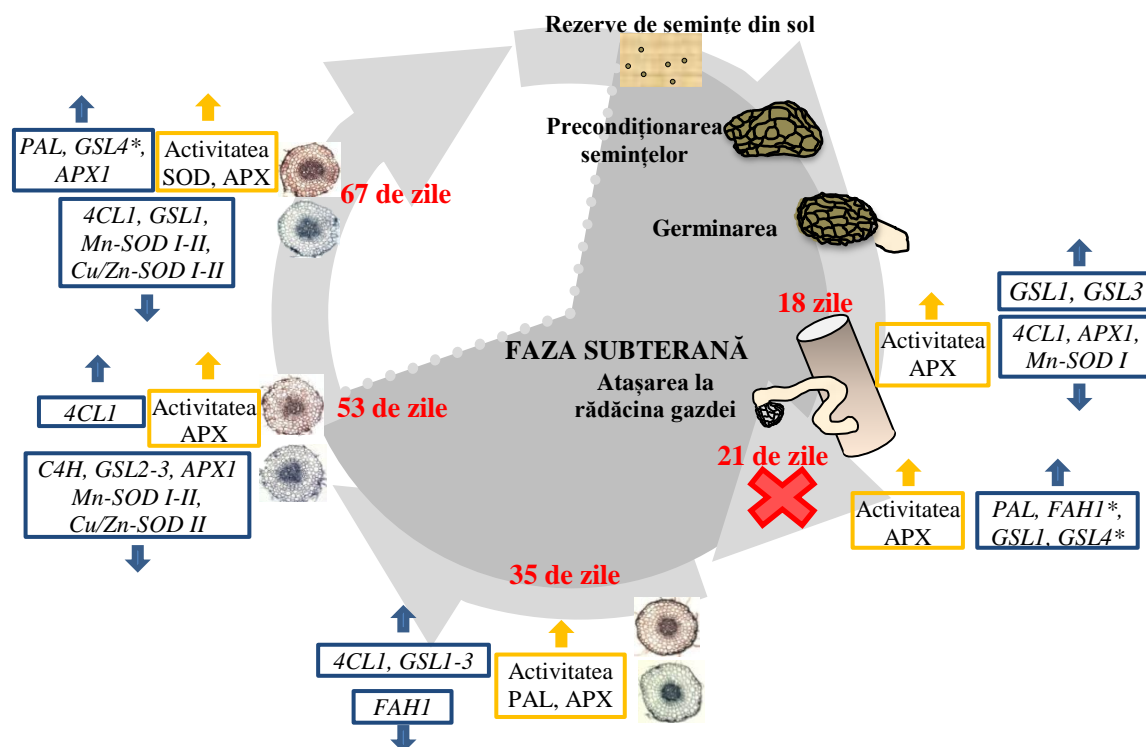
Analiza valorilor de expresie a transcriptului *APX1* la al doilea genotip rezistent, a indicat un profil asemănător cu cel al genotipului Favorit R, doar că valorile au fost semnificativ mai mari (subexpresie de 41,0 ori a fost semnalată la 21 de zile și supraexpresie de 4,8 ori la 67 de

zile) (Figura 4.4 B). Transcriptul *APX3* a manifestat activitate foarte înaltă de 13,0 ori la etapa de 18 zile, urmată de o ușoară subexpresie de 2,0 ori la 21 și 35 de zile (Figura 4.4 B).

În cazul genotipului Performer S *pattern*-ul de expresie al genelor ascorbat peroxidazelor s-a manifestat în funcție de particularitățile genetice și fiziologice ale acestuia. Deși, acest genotip a fost infestat, conținutul de ARNm pentru transcriptul *APX* a fost inițial supraexpresat de 2,3-2,6 ori, urmat de inhibarea genei prin subexpresie de 3,8-5,5 ori peste 3 zile, care până la etapa de dezvoltare a lăstarilor să revină la supraexpresie (Figura 4.4 C).

### Sinteza rezultatelor obținute

În aspect integrativ al tuturor modificărilor fiziologice și moleculare ale răspunsului defensiv, genotipul Favorit R a demonstrat o capacitate înaltă de a menține un echilibru homeostatic al parametrilor interni pe întreaga perioadă de acțiune a factorului stresogen (17/14 cazuri subexpresie/supraexpresie din 70 de cazuri). Modificările tranzitorii în acumularea transcripturilor corelează direct cu cea a produșilor de expresie (acumularea compușilor și activitatea enzimelor la etapa de 35 de zile), ceea ce demonstrează reglarea proceselor defensive la diferite nivele ale căilor metabolice, astfel încât, să corespundă stării fiziologice noi, adaptive, condiționată de semințele de *O. cumana* din rizosferă (Figura 4. 5).

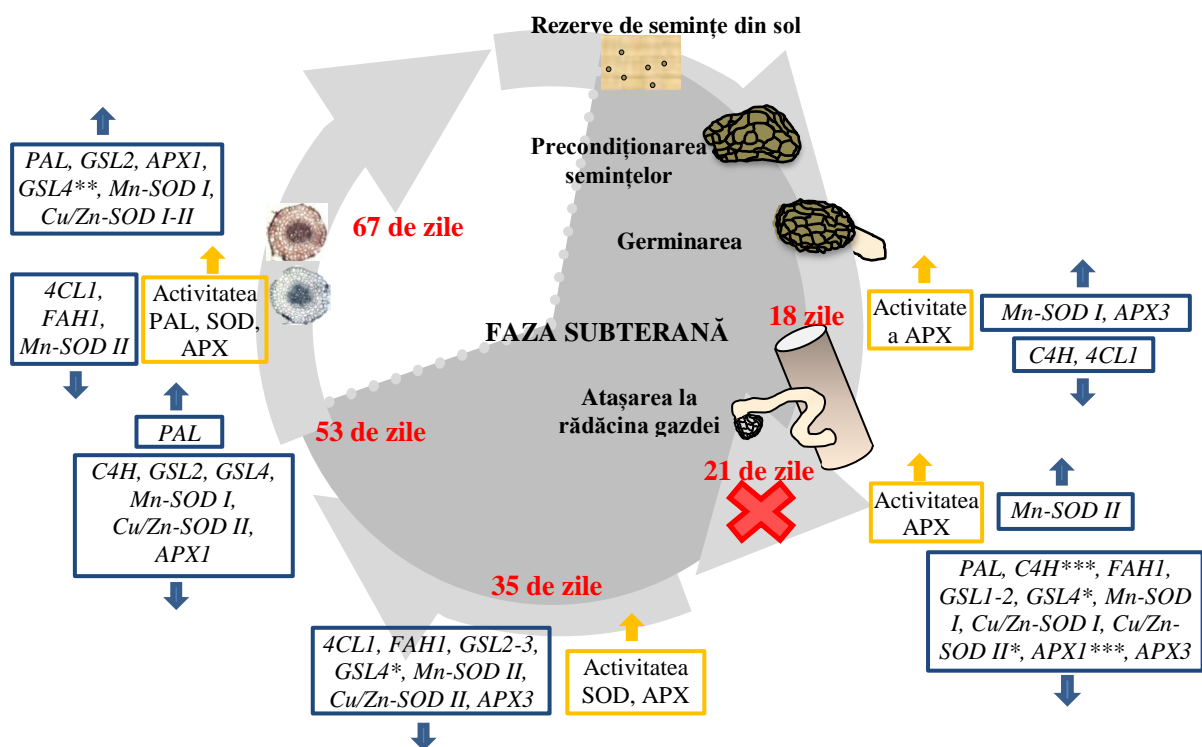


**Fig. 4.5. Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului Favorit R**

Genele fără indice – gene cu expresie slabă; \*- gene cu expresie moderată; ↑ supraexpresie a genelor; ↓ subexpresie a genelor; ↑ activitate enzimatică sporită.

Menținerea fluctuațiilor în limitele normei, pe întreaga perioadă de studiu, relevă semnalizarea celulară continuă, deși cu o intensitate mai mică a factorului de stres. În favoarea acestei concluzii sunt acumulările de lignină și caloză în cilindrul central, care indică asupra unor posibile procese defensive *post-atașament*.

Capacitatea de reglare în formarea răspunsului defensiv indus de semințele de lupoaie la al doilea genotip rezistent - PR64LE20 R nu s-a caracterizat prin periodicitate și ritm similar genotipului Favorit R. Tendința de minimalizare a devierilor de la normă prin capacitatea de reglare stoichiometrică a parametrilor studiați, a manifestat o stare de alarmă, aproape pe întreaga perioadă, exprimată preponderent prin represia sintezei ARNm (30 de cazuri din 70) (Figura 4.6).



**Fig. 4.6. Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului PR64LE20 R**

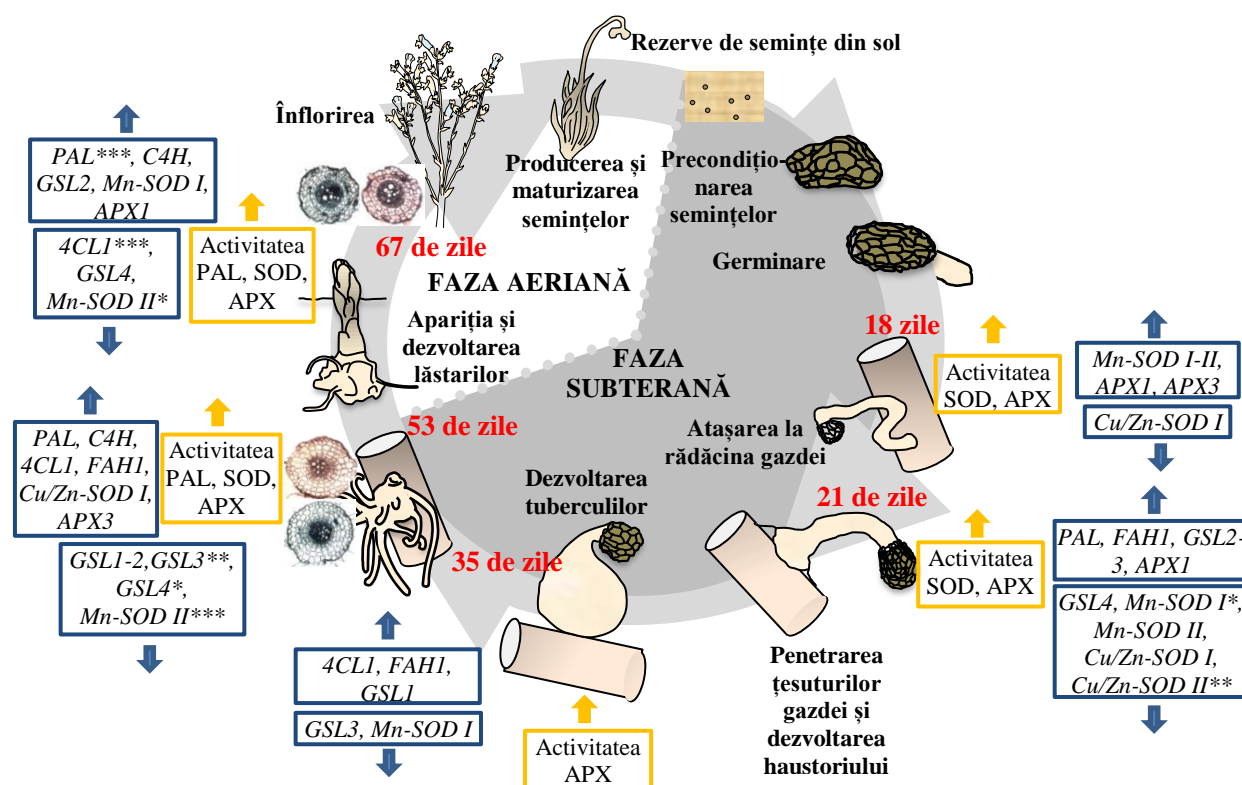
Genele fără indice – gene cu expresie slabă; \* - gene cu expresie moderată; \*\* - gene cu expresie puternică; \*\*\* - gene cu expresie foarte puternică; ↑ - supraexpresie a genelor; ↓ - subexpresie a genelor; ↑ - activitate enzimatică sporită.

Neafectarea creșterii și dezvoltării plantelor în contrast cu fluctuațiile mari în activitatea de expresie a genelor, activitatea enzimelor și conținutul de lignină și caloză, sugerează asupra unei strategii a organismului de a direcționa energia metabolică spre obținerea unei stări fiziologice optime pentru adaptarea și dezvoltarea rezistenței la stres. Astfel, reacțiile de apărare manifestate prin impregnarea pereților celulari cu fenilpropanoide și glucani, sporirea activității enzimelor și nivel de supraexpresie ale genelor studiate ce corelează direct s-a constatat doar la etapa de 67 de zile. Fenotipul plantelor neinfestare de *O. cumana*, asociat cu profilul temporal al



perturbațiilor la nivel molecular, biochimic și histologic demonstrează redistribuirea energiei și a resurselor interne spre alte procese de răspuns cu repercusiuni minore pentru creșterea în continuare a plantelor.

Spre deosebire de ambele genotipuri rezistente, la care s-au constatat reacții compensatorii, coordonate în acumularea transcripților, enzimelor și componentelor peretelui celular fără a perturba creșterea și dezvoltarea plantelor de floarea-soarelui pe fundal de infestare, în cazul genotipului Performer S s-a constatat o intensificare semnificativă a stării de stres, manifestată prin ritmul mult mai sporit în acumularea secvențelor transcrise (23 de cazuri) și al activității enzimelor PAL, SOD și APX (Figura 4.7).



**Fig. 4.7. Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului Performer S**

Genele fără indice – gene cu expresie slabă; \* - gene cu expresie moderată; \*\* - gene cu expresie puternică; \*\*\* - gene cu expresie foarte puternică; ↑ - supraexpresie a genelor; ↓ - subexpresie a genelor; ↑ - activitate enzimatică sporită.

Modificările histochimice, biochimice și moleculare din calea metabolică a ligninei sunt reacții active în cazul acestui patosistem (acumulare suplimentară de lignină, activitate enzimatică PAL sporită și nivel de supraexpresie a genelor din această cale la etapele de dezvoltare a lăstarilor). Activitatea APX sporită a corelat cu profilul de expresie a genelor APX studiate pe tot parcursul dezvoltării patosistemului. În cazul metabolismului calozei – acumularea suplimentară a acestui compus a fost atestată la etapa de dezvoltare a lăstarilor, însă *pattern*-ul de expresie la acel moment s-a caracterizat prin subexpresie a celor patru gene *GSL*.

Rezultate similare au fost puse în evidență și în cazul activității enzimelor SOD corelate cu expresia genelor ce le codifică, la etapa de formare a atașamentelor (21 de zile). Această destabilizare a stării fiziologice poate fi relaționată unor deficiențe în procesarea post-transcripțională a produșilor de expresie.

Fenotipul morfologic al acestui genotip caracterizat prin întârziere în dezvoltare corespunde cu profilul molecular, indicând asupra unei incapacități de minimalizare a fluctuațiilor parametrilor interni, cauzând pierderi de energie și substanță, importante în procesele de apărare.

## CONCLUZII GENERALE

1. Analiza histochimică (cap. 3.2) privind fortificarea pereților celulari în secțiunile radiculare de floarea-soarelui din cadrul sistemelor de incompatibilitate cu *O. cumana* a evidențiat activarea depozitării suplimentare a ligninei și calozei la diferite etape de dezvoltare la 3 genotipuri rezistente dintre cele patru luate în studiu. Printre acestea se remarcă genotipul Favorit R, care a manifestat cel mai înalt nivel de acumulare a ligninei și calozei începând cu etapa de dezvoltare de 35 de zile. În cazul patosistemelor dintre genotipurile sensibile și lupoaie, doar Performer S a indicat un nivel suplimentar de acumulare a ligninei și calozei în pereții celulari după dezvoltarea lăstarilor subterani și aerieni. Totuși această reacție de apărare nu îi permite gazdei să lupte cu invazia patogenului [9, 10].
2. Activitatea enzimatică la genotipurile de floarea-soarelui supuse infestării (cap. 3) a prezentat tendințe variate, dependente de genotip și faza de dezvoltare a plantelor gazdă. Astfel, activitatea PAL și ascorbat peroxidazei au crescut la Favorit R, PR64LE20 R și Performer S pe toată perioada ontogenetică [9]. Activitatea enzimelor SOD a pus în evidență o dinamică similară de diminuare a activității de la prima etapă până la 21-35 de zile, urmată de creșterea acesteia până la finele cultivării. Sistemele de incompatibilitate dintre genotipurile rezistente și lupoaie s-au caracterizat prin sporirea activității SOD la ultimele două etape de co-cultivare. În cadrul patosistemelor (Performer – *O. cumana* și LG-5525 – *O. cumana*) activitatea SOD s-a menținut mai ridicată față de martor pe toată perioada de dezvoltare, reacție determinată de interacțiunea dintre membrii sistemului.
3. Investigarea *pattern*-elor de expresie a 14 gene (cap. 4) implicate în fortificarea pereților celulari prin acumulări suplimentare cu lignină, caloză și metabolismul SRO în cazul a trei variante de studiu: normă, incompatibilitate *H. annuus* L. – *O. cumana* Wallr. și patosistem a evidențiat activarea diferitor reacții defensive în funcție de genotip. Astfel, genotipul Favorit R s-a caracterizat printr-un echilibru de supra-/subexpresie a genelor, pe când PR64LE20 R a manifestat un profil molecular remarcat prin diminuarea activității genelor analizate. În cadrul patosistemului Performer S – *O. cumana*, gazda a manifestat o luptă activă cu invazia patogenului prin intensificarea expresiei [9, 30].
4. Analiza rezultatelor histologice, biochimice și moleculare (cap. 4) și corelația acestora a permis să constatăm declanșarea unor mecanisme comune implicate în fortificarea pereților celulari (expresia genelor, activitatea enzimatică și acumularea de lignină și caloză) ca reacție defensivă a tuturor genotipurilor, exprimată temporar diferit (Favorit R – 35 de zile, PR64LE20 R - 67 de zile și Performer S – 53 de zile). La genotipurile

rezistente predomină procesele de inhibare ale activității genelor (cu raportul de 17/14 subexpresate/supraexpresate din 70 cazuri la Favorit R, și respectiv, 30/11 la PR64LE20 R), pe când la Performer se remarcă supraexpresia genelor (16/23).

5. Rezistența la lupoaiie a genotipului Favorit R (gena *Or6*; rasa F) a fost asigurată de manifestarea timpurie a reacției de răspuns și menținerea homeostatică ulterioară a tuturor parametrilor investigați. Această strategie reprezintă rezultatul activării mecanismelor nespecifice de rezistență la nivel de *post-atașament*. Activarea mecanismelor din calea fenilpropanoidelor și glucanilor la genotipul PR64LE20 R (rasa G) se constată mult mai târziu și este suplimentată de activitatea enzimelor antioxidante. Astfel, reacțiile de apărare ale acestui genotip sugerează asupra unei acțiuni defensive a organismului direcționată spre obținerea unei stări fiziologice optime pentru adaptarea și dezvoltarea rezistenței la stres.

## RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Datele obținute și expuse în lucrarea de față sunt recomandate pentru a fi implementate în curriculumul universitar pentru studii superioare de licență. Informațiile vin în completarea cursurilor de Botanică și Fitopatologie (aspecte ale ciclului vital al patogenului), Fiziologie vegetală (mecanisme de rezistență nespecifică) și Genetică (interacțiunile dintre gene).
2. Genotipul Favorit R poate fi recomandat în calitate de donator de gene pentru strategiile de obținere a hibrizilor rezistenți față de atacul lupoaiiei, din cadrul programelor de ameliorare și obținerea germoplasmei cu rezistență nespecifică care este mai stabilă față de variabilitatea genetică și rasială a *O. cumana*.
3. Primerii elaborați pentru determinarea profilului de expresie a 14 gene implicate în fortificarea pereților celulari și sinteza enzimelor antioxidante, se recomandă a fi utilizați în testarea potențialului de rezistență a germoplasmei de floarea-soarelui la *Orobancha cumana* și aplicarea acestora ca indicatori ai rezistenței în programele de ameliorare și producere a hibrizilor.

## BIBLIOGRAFIE

1. BLOUNT, J.W., et al. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. In: *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, pp. 107-116.
2. BORDALLO, J.J., et al. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. In: *New Phytologist.*, 2002, vol. 154(2), pp. 491-499.
3. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Ann. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248-254.
4. BUCIUCEANU, M., și colab. Crearea materialului inițial rezistent la lupoaie pentru ameliorarea florii-soarelui. În: *Tezele conferinței jubiliare consacrate celor 50 de ani de activitate ICCC*, Chișinău, UASM, 1994, pp. 31-32.
5. CAUSTON, H.C., et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. In: *Mol. Biol. Cell*, 2001, vol. 12, pp. 323-337.
6. CAVERZAN, A., et al. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. In: *Genet. Mol. Biol.*, 2012, vol. 35(4 (suppl)), pp. 1011-1019.
7. DUCA, M., ACCIU, A., CLAPCO, S. Geographical distribution and characteristics of *O. cumana* populations in the Republic of Moldova. În: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2017, Nr. 2(332), pp. 65-76.
8. DUCA, M., și colab. **Considerații generale privind mecanismele rezistenței plantelor la antofitele parasite din familia *Orobanchaceae*. În: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2016, Nr. 2(329), pp. 7-16.**
9. DUCA, M., TABARA, O. **Histochemical aspects of *Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr. pathosystem. În: *Analele Științifice ale Universității "Al. I. Cuza", s. II a, Biologie vegetală*, 2016, vol. 62, fas. 2, pp. 19-28.**
10. DUCA, M., TABĂRĂ, O., NECHIFOR, V., PORT, A. **Lignificarea pereților celulari la *Helianthus annuus* L. ca răspuns la atacul *Orobanche cumana* Wallr. În: *Buletinul AȘM, Științele Vieții*, 2017, Nr. 3(333), pp. 84-96.**
11. ECHEVARRÍA-ZOMENO, S., et al. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. In: *Journal of Experimental Botany*, 2006, vol. 57(15), pp. 4189-4200.
12. FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. In: *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971, vol. 9, pp. 275-296.
13. FOLEY, R.C., et al. Reactive oxygen species play a role in the infection of the necrotrophic fungi, *Rhizoctonia solani* in wheat. In: *PLoS ONE*, 2016, vol. 11(3), e0152548, doi:10.1371/journal.pone.0152548
14. GLIJIN, A., ACCIU, A., GÎSCĂ, I. Molecular analysis of *Orobanche cumana* Wallr. from different geographical regions. In: *Proc. 3rd Int. Symp. Conserv. of Plant Diversity*, Chișinău, 2014, pp. 16-17.
15. HOLTER, N.S., et al. Dynamic modeling of gene expression data. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98(4), pp. 1693-1698, doi:10.1073/pnas.98.4.1693
16. HYUN, M.W., et al. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase In: *Mycobiology*, 2011, vol. 39(4), pp. 257-265.
17. LETOUSEY, P., et al. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. In: *Plant Pathology*, 2007, vol. 56, pp. 536-546.
18. LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. In: *Methods*, 2001, vol. 25(4), pp. 402-408.
19. MENDOZA, M. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. In: *Biotehnologia vegetal*. 2011, vol. 11, pp. 67-75.
20. PĂCUREANU-JOIȚA, M. Current situation of sunflower broomrape around the world. In: *Abstract book of 4<sup>th</sup> International Symposium on Broomrape in Sunflower*, Bucharest, Romania, 2018, pp. 21.
21. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanche crenata* and *Vicia sativa*. In: *Journal of Experimental Botany*, 2006, vol. 57, pp. 931-942.
22. PÉREZ-DE-LUQUE, A., MORENO, M.T., RUBIALES, D. Host plant resistance against broomrapes (*Orobanche* spp.): defence reactions and mechanisms of resistance. In: *Ann. Appl. Biol.*, 2008, vol. 152, pp. 131-141.
23. PÉREZ-VICH, B., et al. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2004a, vol. 109, pp. 92-102.
24. PRICOP, S.M., CRISTEA, S., PETCU, E. Results on the virulence of the *Orobanche cumana* Wallr. populations in Dobrogea, Romania. In: *Romanian agricultural research*, 2011, vol. 28, pp. 237-242.
25. ROTARENCO, V. *Aspecte morfo-fiziologice de interacțiune gazdă-parazit (Helianthus annuus L. – Orobanche cumana Wallr.)* Teză de doctor, Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, 2010, 128 p.
26. ȘESTACOVA, T. et al. **Expression of some antioxidant genes in sunflower infected with broomrape. În: *Analele Șt.ale Univ. „Al.I. Cuza”, Sec. Genetică și Biologie Moleculară*, TOM XVI, Fascicula 3, 2015, pp. 97-106.**
27. ȘESTACOVA, T., et al. Expression of defence-related genes in sunflower infected with broomrape. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016, vol. 30(4), pp. 685-691.
28. ȘESTACOVA, T., TABĂRĂ, O. **Mecanisme genetico-moleculare ale rezistenței plantelor la stresul biotic. În: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2015, Nr.3(327), pp. 14-27.**
29. Tabara, O., Port, A. Duca, M. **Pre-haustorial and post-haustorial resistance of sunflower infected with broomrape. În: *Abstract book of 4<sup>th</sup> International Symposium on Broomrape in Sunflower*, București, România, 2018, pp. 43.**
30. TABĂRĂ, O., NECHIFOR, V., PORT, A. **Expresia genelor *GSLI-4* în rădăcinile de floarea-soarelui infectată cu lupoaie. În: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2017, Nr.2(332), pp. 85-93.**
31. VAN DER PLANK, J.E. Horizontal (polygenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight. In: *American Potato Journal*, 1966, vol. 43(2), pp. 43-52.
32. VRÂNCEANU, A., et al. Some aspects of the interaction *Helianthus annuus* L/ *Orobanche cumana* Wallr. and its implications in sunflower breeding. In: *Pieterse AH., Verkleij JAC., Ter-Borg Sj. Eds. Biology and management of Orobanche: Proceedings of the Third International Workshop on Orobanche and related Sruga research*. Amsterdam, 1986, pp. 181-189.
33. WEYDERT, C.J and CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. In: *Nature protocols*, 2010, vol. 5(1), pp. 51-66, doi:10.1038/nprot.2009.197.

## LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

### **• Articole în reviste științifice de peste hotare**

1. Duca M., **Tabara O.** Histochemical aspects of *Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr. pathosystem. Analele Științifice ale Universității ”Al. I. Cuza”, Iași, s. II a, Biologie vegetală, 2016, vol. 62, fas. 2, p. 19-28.

### **• Articole în reviste științifice naționale acreditate (de tipul B)**

2. **TABĂRĂ O.** Nivelul transcripțional al ascorbat peroxidazelor (*APX1* și *APX3*) la *Helianthus annuus* L. infestat cu *Orobanche cumana* Wallr. In: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2019, vol. 2(338), p. 104-112.
3. **Tabără O.** Activitatea superoxid dismutazei la plantele de floarea-soarelui infestate artificial cu lupoaie. *Buletinul AȘM. Științele Vieții*, 2019, Nr. 1(337), p. 106-111.
4. Duca M., **Tabără O.**, Nechifor V., Port A. Lignificarea pereților celulari la *Helianthus annuus* L. ca răspuns la atacul *Orobanche cumana* Wallr. *Buletinul AȘM. Științele Vieții*, 2017, Nr. 3(333), p. 84-96.
5. **Tabără O.**, Nechifor V., Port A. Expresia genelor *GSL1-4* în rădăcinile de floarea-soarelui infectată cu lupoaie. *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2017, Nr.2(332), p. 85-93.
6. Duca M., Port A., Clapco S., Zgardan D., **Tabără O.** Considerații generale privind mecanismele rezistenței plantelor la antofitele parasite din familia *Orobanchaceae*. *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2016, Nr.2(329), p. 7-16.
7. Șestacova T., **Tabără O.** Mecanisme genetico-moleculare ale rezistenței plantelor la stresul biotic. *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2015, Nr.3(327), p. 14-27.

### **• Materiale în lucrările conferințelor științifice internaționale: - desfășurate peste hotare**

8. Duca M. **Tabără O.**, Clapco S. Some aspects of sunflower (*Helianthus annuus* L.) resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). Internațional Conference of Agriculture and Food engineering, Iași, România, 18-19 octombrie 2018, p. 58.
9. **Tabara O.**, Port A. Duca M. Pre-haustorial and post-haustorial resistance of sunflower infected with broomrape. 4<sup>th</sup> International Symposium on Broomrape in Sunflower, București, România, 2-4 iulie 2018, p. 43.
10. Duca M., **Tabara O.**, Nechifor V., Port A. Impact of *Orobanche cumana* Wallr. on callose accumulation in sunflower roots. International Plant Breeding Conference, Kyrenia, Turcia, 15-20 Octombrie, 2017, p. 87.
11. **Tabara O.** Mechanism of sunflower – broomrape resistance interaction. Abstract book of the XI International scientific conference for students and Phd students. Ucraina, Lvov. 20-23 aprilie 2015, p. 536-537.

### **• Materiale în lucrările conferințelor științifice internaționale: - desfășurate în Republica Moldova**

12. Duca M., Port A., **Tabara O.** Some aspects of response mechanism of *Helianthus annuus* L. to *Orobanche cumana* Wallr. Eucarpia, International Congress on Oil and Protein Crops, Chișinău, Republica Moldova, 20-24 mai 2018, p. 129.
13. Ursu V., **Tabără O.** Investigation of attachment formation in sunflower-broomrape pathosystem. The International Conference ”Life Science in the Dialogue of Generations: Connections between Universities, Academia and Business Community” Republica Moldova, 25 martie 2016, p. 54.
14. **Tabără O.** Aspecte histochemice și genetico-moleculare ale interacțiunii gazdă-parazit. Culegere de teze ale Conferinței științifice internaționale a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei – Viziuni ale tinerilor cercetători”, 10 martie 2015, p. 91.
15. **Tabara O.**, Anisimova I., Rotaru T. PAL – key enzyme in *Helianthus annuus* L. defensive response to *Orobanche cumana* Wallr. Abstract book of ”The Xth International Congress of Geneticists and Breeders” 28 june – 1 july 2015, p. 153.

### **• Materiale în lucrările conferințelor științifice naționale**

16. **Tabără O.** Mecanisme de rezistență nespecifică a florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.) infectată artificial cu lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.). Simpozion Național cu Participare Internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, Republica Moldova, 3-4 octombrie 2016, p. 52.

### **• Alte lucrări științifice: articole în culegeri naționale**

17. **Tabără O.** Evaluarea expresie genelor implicate în formarea barierei mecanice ca răspuns la acțiunea factorilor biotici. Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători”, Republica Moldova, Chișinău, 15 iunie 2017, vol I. p. 258-263.
18. **Tabără O.** Interacțiunea dintre *Orobanche cumana* Wallr. și *Helianthus annuus* L.: aspecte histoanatomice. Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători”, Republica Moldova, Chișinău, 25 mai 2016, vol II. p. 225-230.

## ADNOTARE

**Tabără Olesca „Estimarea modificărilor fiziologice și moleculare ale răspunsului defensiv în sistemul gazdă-parazit (*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.)”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2020.**

Teza include introducerea, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 328 de titluri, 103 de pagini de text de bază din 137 de pagini totale, 10 tabele, 33 de figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 18 lucrări științifice.

**Cuvinte cheie:** *Helianthus annuus* L., *Orobanche cumana* Wallr., rezistență nespecifică, mecanisme defensive *post-atașament* și *post-haustoriale*, interacțiunea gazdă-parazit, sistem de compatibilitate și incompatibilitate.

**Domeniu de studiu:** 164.2 – Fiziologie vegetală

**Scopul lucrării:** Elucidarea modificărilor fiziologice și moleculare asociate cu rezistența plantelor la atacul lupoaiei ca bază științifică de ameliorare și optimizare a tehnologiei de cultivare a plantelor de floarea-soarelui în Republica Moldova.

**Obiectivele cercetării:** Studiul histochimic privind fortificarea pereților celulari ai secțiunilor radiculare de floarea-soarelui în cadrul sistemelor de compatibilitate și incompatibilitate cu *O. cumana*; Evaluarea răspunsului defensiv prin estimarea activității unor enzime (fenilalanin amonia-liaza, superoxid dismutaza și ascorbat peroxidaza) la diferite etape de infestare artificială cu *O. cumana*; Estimarea cantitativă a expresiei genelor implicate în fortificarea pereților celulari, neutralizarea superoxidului și peroxidului; Analiza integrativă a parametrilor histologici, biochimici și moleculari, pentru validarea și evaluarea utilității acestora în strategiile de ameliorare.

**Noutatea și originalitatea științifică:** S-a efectuat evaluarea amplă a modificărilor histologice (acumularea ligninei și calozei), biochimice (activitatea fenilalanin amonia-liazei, superoxid dismutazei și ascorbat peroxidazei) și moleculare (expresia unor gene implicate în fortificarea pereților celulari și sinteza enzimelor antioxidante) la genotipurile sensibile și rezistente de floarea-soarelui în condiții de infestare artificială cu lupoaie la cinci etape de dezvoltare a patogenului. În baza corelațiilor pozitive dintre expresia genelor, activitatea enzimatică și acumularea de metaboliți secundari, pentru prima dată s-a constatat declanșarea unor mecanisme comune implicate în fortificarea pereților celulari ca reacție defensivă a tuturor genotipurilor, exprimată temporar diferit. Rezistența la lupoaie a genotipului Favorit (gena *Or6*; rasa F) este asigurată de manifestarea timpurie a reacției de răspuns (35 zile) și menținerea homeostatică ulterioară a tuturor parametrilor investigați. Activarea mecanismelor din calea fenilpropanoidelor și glucanilor la genotipul PR64LE20 (rasa H) se constată mult mai târziu (67 zile) și este suplimentată de activitatea enzimelor antioxidante.

**Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante:** constă în *fundamentarea științifică* a cunoștințelor actuale despre mecanismele nespecifice de rezistență a plantelor la infestarea cu holoparazite, în dinamică, *ce a contribuit* la formularea principiilor științifice ca bază a optimizării tehnologiei de cultivare a plantelor de floarea-soarelui în Republica Moldova, *permițând valorificarea* acestora în programele de ameliorare și de obținere a hibridilor rezistenți prin utilizarea unor donori de gene de la genotipurile rezistente.

**Semnificația teoretică:** Studiul realizat reprezintă o bază metodologică fundamentală ce aprofundează cunoștințele despre mecanismele de rezistență ale plantelor de floarea-soarelui la lupoaie; fortificarea pereților celulari intru prevenirea invaziei patogenului; participarea enzimelor antioxidante în menținerea statutului redox și asigurarea răspunsului defensiv la atacul lupoaiei.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** Integrarea rezultatelor obținute la nivel histologic, biochimic și molecular reprezintă o bază teoretică pentru direcția de ameliorare și protecție a plantelor față de rizopatogeni vegetali. De asemenea, unele informații vin în completarea cursurilor de Botanică și Fitopatologie (aspecte ale ciclului vital al patogenului), Fiziologia vegetală (mecanisme de rezistență) și Genetică (interacțiunile dintre gene). Se recomandă utilizarea genotipului rezistent Favorit în calitate de donori de gene pentru strategiile de obținere a hibridilor rezistenți din cadrul programelor de ameliorare a rezistenței nespecifice la atacul lupoaiei.

**Implementarea rezultatelor științifice:** Datele obținute în lucrare servesc în calitate de material științifico-didactic la predarea cursului de Fitopatologie și Fiziologie vegetală. Primerii elaborați pentru determinarea profilului de expresie se recomandă a fi utilizați în testarea potențialului de rezistență la *Orobanche cumana* a germoplasmei de floarea-soarelui.

## ANNOTATION

**Tabara Olesea "Estimation of the physiological and molecular changes of the defensive response in the host-parasite system (*Helianthus annuus* L. - *Orobanche cumana* Wallr.)"**, PhD thesis in Biological Sciences, Chisinau, 2020.

The thesis includes introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, the bibliography with 328 sources, 103 pages basic text out of 137 total pages, 10 tables, 33 figures. The obtained results are published in 18 scientific papers.

**Key words:** *Helianthus annuus* L., *Orobanche cumana* Wallr, nonspecific resistance, post-attachment and post-haustorial defensive mechanisms, host-parasite interaction, compatibility and incompatibility system.

**Field of study:** 164.2 - Plant physiology

**The purpose of the paper** consists in evaluation of the physiological and molecular changes associated with plant resistance against broomrape attack as the scientific basis for breeding programs and improvement of sunflower cultivation technologies in the Republic of Moldova.

**Research objectives:** Histochemical analysis of cell wall reinforcement in sunflower root cells within compatibility and incompatibility systems with *O. cumana*; Evaluation of defensive response by estimation of the activity of some enzymes (phenylalanine ammonia-lyase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase) at different stages of artificial infection with *O. cumana*; Quantitative mRNA expression of genes involved in reinforcement of cell wall, metabolism of superoxide and peroxide radical; Integrative analysis of histological, biochemical and molecular patterns for validation and assessment of their use in breeding strategies.

**Novelty and scientific originality:** Extensive evaluation of histological (accumulation of lignin and callose), biochemical (activity of phenylalanine ammonia-lyase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase) and molecular (expression of genes involved in cell wall reinforcement and synthesis of antioxidant enzymes) changes in susceptible and resistant sunflower genotypes have been performed at five developmental stages of broomrape under conditions of artificial infestation. Based on the positive correlations between gene expression, enzymatic activity and accumulation of secondary metabolites, for the first time it was found that common mechanisms involved in the fortification of cell walls were triggered as a defensive reaction in all genotypes, being expressed at different developmental stages. The resistance of genotype Favorit (*Or6 gene*; race F) against broomrape is ensured by the early manifestation of the response reaction (35 days) and the subsequent homeostatic maintenance of all investigated parameters. The activation of mechanisms from phenylpropanoids and glucans pathways in the genotype PR64LE20 (race H) is found much later (67 days) and it is supplemented by the activity of antioxidant enzymes.

**The obtained results that contribute to solve an important scientific problem** consist in *scientific foundation* of the current knowledge related to the non-specific mechanisms of plant resistance to holoparasite infection, in dynamics, *which contributed to* the formulation of scientific principles as a basis for improvement of sunflower cultivation technologies in the Republic of Moldova, *allowing their* application in breeding and obtaining of resistant hybrids by using gene donors from resistant genotypes.

**Theoretical significance.** The study represents a fundamental methodological basis that deepen the knowledge related the mechanisms of resistance of the sunflower against broomrape; the reinforcement of cell walls to prevent pathogen invasion; the role of antioxidant enzymes in maintaining of redox status and ensuring the response to broomrape attack.

**Applicative value of the work.** Integrative approach of the results obtained at the histological, biochemical and molecular level represents a theoretical and fundamental basis for the direction of plant breeding and plant protection against root pathogens. Also, some information completes the courses of Botany and Phytopathology (aspects of broomrape life cycle), Plant physiology (resistance mechanisms) and Genetics (gene interaction). It is recommended to use the genotype Favorit as a gene donor for strategies of obtaining resistant hybrids in the breeding programs oriented to non-specific resistance.

**Implementation of scientific results.** The obtained data serve as a scientific material in the teaching of the course of Phytopathology and Plant Physiology. Developed specific primers are recommended for testing the expression profile of sunflower germplasm to broomrape resistance.



## АННОТАЦИЯ

**Табэрэ Олеся, «Оценка физиологических и молекулярных изменений защитного ответа в системе хозяин-паразит (*Helianthus annuus* L. - *Orobanche cumana* Wallr.)», диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук, Кишинев, 2020.**

Работа включает введение, четыре главы, общие выводы и рекомендации, библиографию из 328 источников, 137 страниц общего объема, 10 таблиц, 33 рисунков. Полученные результаты отражены в 18 научных публикациях.

**Ключевые слова:** *Helianthus annuus* L., *Orobanche cumana* Wallr, неспецифическая устойчивость, защитные механизмы, взаимодействие хозяина с паразитом, система совместимости и несовместимости.

**Область исследований:** 164.2 - Физиология растений

**Целью данной работы является:** Изучение физиологических и молекулярных изменений, связанных с устойчивостью растений к заражению, как научная основа для усовершенствования и оптимизации технологий выращивания подсолнечника в Республике Молдова.

**Задачи исследования:** Гистохимическое исследование, касающееся укрепления клеточных стенок клеток корня подсолнечника в системах совместимости и несовместимости с *O. cumana*; Оценка защитного ответа путем определения активности некоторых ферментов (фенилаланин-аммиак-лиазы, супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы) на разных стадиях искусственного заражения *O. cumana*; Количественная оценка экспрессии генов, участвующих в утолщение клеточной стенки, метаболизме супероксида и пероксида; Анализ взаимосвязей гистологических, биохимических и молекулярных параметров с целью выявления новых аспектов устойчивости к заражению.

**Новизна и научная оригинальность.** Была проведена комплексная оценка гистологических (накопление лигнина и калозы), биохимических (активность фенилаланин-аммиак-лиазы, супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы) и молекулярных (экспрессия генов, участвующих в обогащении клеточной стенки и синтез антиоксидантных ферментов) изменений у чувствительных и устойчивых генотипах подсолнечника на пяти стадиях развития патогена в условиях искусственного заражения заразой. На основе положительной корреляции между экспрессией генов, энзиматической активностью и накоплением вторичных метаболитов впервые было обнаружено, что у всех изученных генотипах, на разных стадиях развития, запускаются одинаковые механизмы, участвующие в укреплении клеточных стенок. Устойчивость генотипа Фаворит (ген *Orb*; раса F) к заражению обеспечивается ранним проявлением ответной реакции (35 дней) и последующим гомеостатическим поддержанием всех исследуемых параметров. Активация механизмов фенилпропаноидного пути у генотипа PR64LE20 (раса H) обнаружена значительно позже (67 дней) и дополняется активностью антиоксидантных ферментов.

**Полученные результаты, которые способствуют решению важной научной проблемы:** В работе представлены новые данные о неспецифических механизмах устойчивости растений к голопаразитной инфекции, что способствует выявлению аспектов защитной реакции в системах совместимости и несовместимости хозяин - патоген.

**Теоретическая значимость.** Исследование является фундаментальной методологической основой, углубляющей знания о механизмах устойчивости подсолнечника к заражению; об утолщение клеточных стенок для предотвращения проникновения патогенов; об участии антиоксидантных ферментов в поддержании окислительно-восстановительного статуса и обеспечении ответной реакции на влияние зарази.

**Прикладная ценность:** Интегрирование результатов, полученных на гистологическом, биохимическом и молекулярном уровнях, предоставляют теоретическую и фундаментальную основу для выявления устойчивых к заражению генотипов подсолнечника и защиты растений. Кроме того, полученные данные служат научно-учебным дополнением к курсам по Ботанике и Фитопатологии (аспекты жизненного цикла зарази), Физиологии растений (механизмы устойчивости). Рекомендуется использовать генотип Фаворит в качестве донора генов для получения устойчивых гибридов в селекционных программах.

**Внедрение научных достижений.** Полученные данные служат научно-образовательным материалом при преподавании курса Фитопатологии и Физиологии растений. Рекомендуется использовать разработанные праймеры для определения профиля экспрессии генов при тестировании устойчивости гермоплазмы подсолнечника к *Orobanche cumana*.

**TABĂRĂ OLESEA**

**ESTIMAREA MODIFICĂRILOR FIZIOLOGICE ȘI MOLECULARE  
ALE RĂSPUNSULUI DEFENSIV ÎN SISTEMUL GAZDĂ-PARAZIT  
(*HELIANTHUS ANNUUS L. – OROBANCHE CUMANA WALLR.*)**

**164.02 – FIZIOLOGIA VEGETALĂ**

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

---

Aprobat spre tipar: *data*

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Coli de tipar.: ...

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Tiraj ... ex...

Comanda nr. ....

---

Denumirea și adresa instituției unde a fost tipărit autoreferatul