

**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 – FIZIOLOGIE VEGETALĂ

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

DUCA Maria

doctor habilitat în științe biologice,
profesor universitar,
academician

Autor:

TABĂRĂ Olesea

CHIȘINĂU, 2020

© Tabără Olesea, 2020

CUPRINS

ADNOTARE (în limba română, engleză și rusă)	5
LISTA ABREVIERILOR	8
LISTA FIGURILOR	9
LISTA TABELELOR	11
INTRODUCERE	12
1. ASPECTE PRIVIND MECANISMELE DE REZISTENȚĂ ALE PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE	18
1.1. Rezistența <i>pre-atașament</i> a plantelor de floarea-soarelui infestate cu lupoaie	18
1.1.1. <i>Strigolactonele – stimulatori de germinare</i>	19
1.1.2. <i>Caracteristica strigolactonelor ca substanțe fiziologic active</i>	21
1.1.3. <i>Inhibiția și reducerea producției de stimulatori de germinare</i>	22
1.1.4. <i>Evidența plantelor parazite prin testul de germinare suicidală</i>	23
1.1.5. <i>Inhibitori de germinare și antagoniștii strigolactonelor</i>	24
1.2. Rezistența <i>post-atașament</i> a plantelor de floarea-soarelui infestate cu lupoaie	25
1.2.1. <i>Aspecte biochimice a interacțiunii gazdă-parazit</i>	26
1.2.2. <i>Fortificarea pereților celulari prin acumularea de lignină</i>	28
1.2.3. <i>Biosinteza și acumularea calozei ca răspuns la infestarea cu patogeni</i>	31
1.2.4. <i>Acumularea altor compuși în peretele celular</i>	32
1.2.5. <i>Căile de semnalizare a acidului salicilic și jasmonic</i>	33
1.3. Rezistența <i>post-haustorială</i> a plantelor de floarea-soarelui infestate cu lupoaie	35
1.3.1. <i>Acumularea de fitoalexine</i>	35
1.3.2. <i>Ocluzia vaselor xilemice ale gazdei</i>	36
1.3.3. <i>Necroza și moartea tuberculilor</i>	37
1.3.4. <i>Formarea sistemelor de incompatibilitate și compatibilitate</i>	37
1.4. Concluzii la capitolul 1	38
2. CONDIȚIILE, OBIECTUL ȘI METODELE DE CERCETARE	40
2.1. Obiectul de studiu și condițiile de cultivare	40
2.2. Metode histochemice de evidențiere a calozei și ligninei	42
2.3. Metode de studiere a activității enzimatică	42
2.4. Analiza expresiei genelor potențial implicate în mecanismele de rezistență	44
2.5. Metode statistice de prelucrare a datelor	47
2.6. Concluzii la capitolul 2	47
3. ESTIMAREA MODIFICĂRILOR FIZIOLOGICE, HISTOLOGICE ȘI BIOCHIMICE ASOCIATE CU REZISTENȚA PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE	48

3.1. Aspecte fenotipice ale cultivării plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare	48 49
3.1.1. <i>Dinamica formării patosistemului floarea-soarelui – lupoaie</i>	
3.1.2. <i>Modificările fenotipice ale dezvoltării plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare</i>	51
3.2. Fortificarea pereților celulari la floarea-soarelui	52
3.2.1. <i>Determinarea acumulării ligninei în țesutul radicular de floarea-soarelui</i>	53
3.2.2. <i>Evidențierea acumulării calozei în peretele celular al celulelor rădăcinilor de floarea-soarelui</i>	57
3.3. Profilul biochimic al rădăcinilor de floarea-soarelui cultivată pe fondal de infestare	60
3.3.1. <i>Activitatea fenilalanin amonia-liazei</i>	60
3.3.2. <i>Activitatea enzimatică a superoxid dismutazei</i>	63
3.3.3. <i>Activitatea enzimatică a ascorbat peroxidazei</i>	67
3.4. Concluzii la capitolul 3	70
4. ASPECTE MOLECULARE ALE RELAȚIEI <i>Helianthus annuus</i> L.– <i>Orobancha cumana</i> Wallr.	72
4.1. Analiza profilului de expresie al genelor din calea metabolică a ligninei	72
4.2. Studiul <i>pattern</i>-ului de expresie al genelor din calea metabolică a calozei	80
4.3. Expresia genelor codificatoare de enzime antioxidante	86
4.3.1. <i>Profilul transcripțional al genelor ce codifică superoxid dismutazele</i>	86
4.3.2. <i>Influența stresului biotic asupra activității genelor ce codifică ascorbat peroxidazele la floarea-soarelui</i>	91
4.4. Concluzii la capitolul 4	98
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE	100
BIBLIOGRAFIE	103
ANEXE	130
Anexa 1. Aspectul fenotipic al genotipurilor Favorit R și PR64LE20 R	130
Anexa 2. Aspectul fenotipic al genotipului Performer S	131
Anexa 3. Act de implementare a rezultatelor științifice în instruire	132
Anexa 4. Act de implementare a rezultatelor științifice în cercetare	133
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	134
CV-UL AUTORULUI	135

ADNOTARE

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

Teza include introducere, 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., *Orobancha 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 rezistență 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 hibrizilor 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 donator de gene pentru strategiile de obținere a hibrizilor 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 *Orobancha 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. - *Orobanchе 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., *Orobanchе 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 зарази́хе, 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 утолщении клеточной стенки, метаболизме супероксида и пероксида; Анализ взаимосвязей гистологических, биохимических и молекулярных параметров с целью выявления новых аспектов устойчивости к зарази́хе.

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 зарази́хой. 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 *Or6*; раса F) к зарази́хе 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 голопаразитарной 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 зарази́хе; об утолщении клеточных стенок для предотвращения проникновения патогенов; об участии антиоксидантных ферментов в поддержании окислительно-восстановительного статуса и обеспечении ответной реакции на влияние зарази́хи.

Прикладная ценность: Интегрирование результатов, полученных на гистологическом, биохимическом и молекулярном уровнях, предоставляют теоретическую и фундаментальную основу для выявления устойчивых к зарази́хе генотипов подсолнечника и защиты растений. Кроме того, полученные данные служат научно-учебным дополнением к курсам по Ботанике и Фитопатологии (аспекты жизненного цикла зарази́хи), 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 *Orobanchе cumana*.

LISTA ABREVIERILOR

AJ	acid jasmonic
APX	ascorbat peroxidaza
AS	acid salicilic
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Instrumentul de Bază de Căutare a Alinierilor Locale)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Acidul etilendiaminotetraacetic)
EST	Expressed Sequence Tags (Secvențe expresate marcate)
Exp.	Experiență
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride (clorură de nitro tetrazoliu albastru)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centrul Național pentru Informații Biotehnologice)
PAL	fenilalanin amonia-liaza
pb	perechi de baze
SOD	superoxid dismutaza
SRO	Specii Reactive de Oxigen
un. c.	unități convenționale

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1.	Structura unor strigolactone naturale și GR24 (sintetic)	20
Fig. 1.2.	Calea de biosinteză a fenilpropanoidelor	30
Fig. 2.1.	Cultivarea plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare în vase de vegetație	41
Fig. 2.2.	Etapele de realizare a cercetării	41
Fig. 2.3.	Electroforeza ARN-ului extras din rădăcinile de floarea-soarelui la etapa de 53 de zile în gel de agaroză de 1%	44
Fig. 2.4.	Electroforeza în gel de agaroză 1,4% a produșilor de amplificare RT-PCR la floarea-soarelui la 18 zile	46
Fig. 3.1.	Dezvoltarea <i>O. cumana</i> pe rădăcinile genotipului Performer S	50
Fig. 3.2.	Identificarea histochimică a ligninei (×160 de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în sol neinfestat	54
Fig. 3.3.	Identificarea histochimică a ligninei (×160 de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare artificială cu lupoaie	55
Fig. 3.4.	Identificarea histochimică a calozei (×160 de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în sol neinfestat	58
Fig. 3.5.	Identificarea histochimică a calozei (×160 de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare artificială cu lupoaie	59
Fig. 3.6.	Activitatea fenilalanin amonia-liazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui	62
Fig. 3.7.	Activitatea superoxid dismutazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui	65
Fig. 3.8.	Activitatea ascorbat peroxidazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui	69
Fig. 4.1.	Expresia relativă a genelor: <i>PAL</i> , <i>C4H</i> , <i>4CL1</i> , <i>FAH1</i> (<i>fold change</i>) la genotipul Favorit R	75
Fig. 4.2.	Expresia relativă a genelor: <i>PAL</i> , <i>C4H</i> , <i>4CL1</i> , <i>FAH1</i> (<i>fold change</i>) la genotipul PR64LE20 R	75
Fig. 4.3.	Expresia relativă a genelor: <i>PAL</i> , <i>C4H</i> , <i>4CL1</i> , <i>FAH1</i> (<i>fold change</i>) la genotipul Performer S	76
Fig. 4.4.	Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor din calea de biosinteză a ligninei ($R^2=1$)	77
Fig. 4.5.	Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genei <i>PAL</i> și activității enzimei fenilalanin amonia-liazei ($R^2=1$)	78

Fig. 4.6.	Expresia relativă a genelor <i>GSL1-4</i> (<i>fold change</i>) la genotipul Favorit R	82
Fig. 4.7.	Expresia relativă a genelor <i>GSL1-4</i> (<i>fold change</i>) la genotipul PR64LE20 R	82
Fig. 4.8.	Expresia relativă a genelor <i>GSL1-4</i> (<i>fold change</i>) la genotipul Performer S	83
Fig. 4.9.	Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor glucan-sintazelor ($R^2=1$)	85
Fig. 4.10.	Expresia relativă a genelor <i>SOD</i> la genotipul Favorit R	88
Fig. 4.11.	Expresia relativă a genelor <i>SOD</i> (<i>fold change</i>) la genotipul PR64LE20 R	88
Fig. 4.12.	Expresia relativă a genelor <i>SOD</i> (<i>fold change</i>) la genotipul Performer S	89
Fig. 4.13.	Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor <i>SOD</i> și activității <i>SOD</i> ($R^2=1$)	90
Fig. 4.14.	Expresia relativă a genelor <i>APX</i> (<i>fold change</i>) la genotipurile rezistente	92
Fig. 4.15.	Expresia relativă a genelor <i>APX</i> (<i>fold change</i>) la genotipul Performer S	93
Fig. 4.16.	Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor <i>APX</i> și activității <i>APX</i> ($R^2=1$)	94
Fig. 4.17.	Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului Favorit R	95
Fig. 4.18.	Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului PR64LE20 R	96
Fig. 4.19.	Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului Performer S	97

LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1.	Caracteristica primerilor utilizați în studiu	45
Tabelul 2.2.	Clasificarea genelor în funcție de activitatea transcripțională	46
Tabelul 3.1.	Înălțimea plantelor la faza de butonizare după 67 de zile de cultivare	52
Tabelul 3.2.	Activitatea enzimei PAL (U/mg proteină) la floarea-soarelui	61
Tabelul 3.3.	Activitatea enzimei SOD (U/mg proteină) la floarea-soarelui	64
Tabelul 3.4.	Activitatea enzimei APX (U/mg proteină) la floarea-soarelui	68
Tabelul 4.1.	Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul ligninei	74
Tabelul 4.2.	Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul calozei	81
Tabelul 4.3.	Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul superoxidului	87
Tabelul 4.4.	Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul peroxidului	92

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate. Problema rezistenței și receptivității plantelor la factorii nefavorabili de mediu este considerată a fi de o maximă valoare atât pentru știința biologică contemporană, cât și pentru sectorul de producere a plantelor de cultură, ceea ce prezintă un impact economic major pentru întreaga lume. Această prerogativă este determinată de cerințele actuale ale societății de promovare a agriculturii eficiente. În consecință, în fața specialiștilor din domeniu stă sarcina de a obține culturi rezistente la diferiți factori limitativi [325]. Prin rezistența față de patogeni se subînțelege însușirea organismului de a suporta mai ușor sau mai greu 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.

Floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) reprezintă o cultură promovată pe scară largă în Republica Moldova, datorită valorii nutritive înalte și capacității de rezistență la secetă [81]. Această cultură se află pe locul trei după grâu și porumb, ocupând o cincime din suprafețele arabile ale republicii [148] astfel, depășind limitele admisibile în rotația culturilor [85] care ulterior, favorizează sporirea frecvenței și agresivității patogenilor. Printre numeroșii agenți infecțioși ale acestei culturi – *Orobanche cumana* Wallr. condiționează pierderi esențiale, datorită unui patrimoniu genetic sărac de floarea-soarelui cu potențial mare de rezistență, precum și lipsei unui control eficient al măsurilor agrotehnice [4, 6, 148]. *O. cumana* (lupoaia) este pe larg răspândită în arealul Europei de sud-est, regiunea Mediterană și Spania [90, 192]. Interacțiunea dintre gazdă și parazit 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 [78, 82, 84, 92]. Parazitismul constă în absorbția substanțelor nutritive și apei din vasele conducătoare ale rădăcinii de *H. annuus*, la nivelul cărora *O. cumana* formează haustorii [90, 160].

Patosistemul *H. annuus* – *O. cumana* 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 bazat 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 [10, 16, 107].

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 [279], exprimându-se prin sporirea cantitativă a unor compuși metabolici. Reacția fiziologică a gazdei la infestarea cu patogen poartă un caracter de fază prin modificarea parametrilor metabolici de la etapa incipientă

de excitare spre dereglare și adaptare [324]. Aceste trei faze se caracterizează prin particularități distinctive în manifestare ca esență fiziologică, ritm și timp de derulare în funcție de etapa de dezvoltare a patogenului – germinarea, atașarea și conectarea la sistemul vascular al gazdei [118].

Încercările efectuate pentru a dezvolta metode eficiente de control al acestui parazit nu au avut succese mari, deoarece obținerea hibrizilor de floarea-soarelui rezistenți la acest patogen au fost rapid depășite prin apariția raselor noi de lupoaie [83, 179, 180, 192, 212, 239]. Mecanismele de rezistență a plantelor de floarea-soarelui pe baza sistemului *genă-pentru-genă* (rezistența verticală) a fost studiat la linii de floarea-soarelui rezistente la atacul *O. cumana*, dar până la moment nici o genă R de rezistență nu este total efectivă [293]. Acest tip de rezistență a fost ușor de obținut prin ameliorare, cu un nivel înalt de eficiență specific rasială. Actualmente se cunosc peste 6 gene care sunt devansate de rasele fiziologice A-H ale lupoaiei [192, 212, 227, 292]. Ulterior, direcțiile de cercetare au fost axate pe studii genetice ale rezistenței determinate de mecanisme poligenice cantitative [158, 226, 240, 251]. Aceste gene prezintă nu doar funcții de apărare în timpul stresului biotic, dar realizează și alte funcții metabolice. 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. Întrucât mecanismele de rezistență nespecifică se realizează împotriva tuturor raselor sau izolatelor patogenului, nu există interacțiuni specifice soi-rasă [292]. Totalitatea reacțiilor defensive activate la floarea-soarelui asigură rezistență față de parazitul angiosperm *O. cumana*, caracterizată printr-un număr redus de atașamente parazitare și necroza acestora [166, 316]. Astfel, se poate de presupus, că combinarea informației genetice cu cea metabolică va contribui la înțelegerea bazelor moleculare ale rezistenței plantelor, ceea ce ar eficientiza ameliorarea plantelor de cultură pe viitor.

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” [1]. Mai recent, au fost analizate unele aspecte ale răspunsului defensiv la germoplasma autohtonă prin metode de analiză moleculară [7, 9, 118, 252, 253]. 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, cunoașterea

mecanismelor defensive ale plantelor la atacul patogenilor, este necesară pentru îmbunătățirea tehnologiei de obținere a plantelor de floarea-soarelui 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 lupoarei 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 rădăculare de floarea-soarelui în cadrul sistemelor de compatibilitate și incompatibilitate cu *O. cumana*
- Evaluarea răspunsului defensiv prin estimarea activității unor enzime (fenilalanin amonia-liazei, 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 complex, implicând coordonarea complexelor de gene implicate în controlul diferitor procese metabolice ale celulei și reorganizarea structurilor celulare cu modificarea fluxurilor de substanțe metabolice. Studiile anterioare au abordat ideea existenței unui ciclu adaptiv general de răspuns la stresul generat de diferiți factori biotici și abiotici, întrucât în majoritatea cazurilor se activează unele și aceleași gene și proteine. Avantajul investigării mecanismelor de rezistență a culturii de floarea-soarelui la atacul lupoarei va permite fundamentarea teoretică cu privire la mecanismele de manifestare a rezistenței 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 răspunsului defensiv. 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 justificarea metodelor de cercetare alese a avut la bază realizarea experimentului științific de cultivare în vase de vegetație pe fondal de infestare și în lipsa acesteia. Cercetarea a fost axată pe studiul sistemic (analiza la nivel molecular și de

genă – până la caracter fenotipic), al unor modificări determinate de acțiunea patogenului. În scopul obținerii unor date complementare referitor la mecanismele de rezistență nespecifică au fost aplicate metode calitative (*colorarea cu Safranin O și Aniline Blue*), cantitative (*morfometrie, spectrofotometrie, RT-PCR*) și statistico-matematice de analiză comparativă și integrativă. Aceste cercetări au permis de a urmări dinamica modificărilor ce au loc la trei faze de apărare a plantelor: iritare, dereglare și adaptare la infestarea artificială cu parazitul *O. Cumana* și care se realizează la nivel de organizare moleculară, de țesut și organism. Utilizarea metodelor contemporane de investigare a permis obținerea informației despre mecanismele care asigură rezistența plantelor la atacul lupoaiei.

Sumarul compartimentelor tezei

Lucrarea cuprinde adnotarea prezentată în limbile română, engleză și rusă, lista abrevierilor, introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

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.

Capitolul 1, ASPECTE PRIVIND MECANISMELE DE REZISTENȚĂ ALE PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE vine să argumenteze necesitatea cercetărilor. Se menționează, că rezistența reprezintă un mecanism complex de reacții, care se manifestă la diferite nivele de organizare. Capitolul de față, include o sinteză a datelor recente din literatura de specialitate privind tipurile de mecanisme defensive din cadrul patosistemului *H. annuus – O. cumana*. În funcție de etapele de dezvoltare ale lupoaiei se activează în planta gazdă trei tipuri de mecanisme de apărare: *pre-atașament, post-atașament* și *post-haustoriale*. Pornind de la sinteza datelor din literatură rezultă scopul și obiectivele prezentei lucrări: estimarea modificărilor fiziologice și moleculare ale răspunsului defensiv ale plantelor de floarea-soarelui la atacul lupoaiei prin studiul histochimic privind fortificarea pereților celulari ai celulelor radiculare în funcție de compatibilitate și incompatibilitate cu *O. cumana*; evaluarea reacțiilor de răspuns prin determinarea activității unor enzime la diferite etape de infestare artificială cu *O. cumana* și estimarea cantitativă a expresiei genelor enzimelor implicate în fortificarea pereților celulari, reducerea stresului oxidativ și analiza co - relațională a parametrilor enumerați.

Capitolul 2, CONDIȚIILE, OBIECTUL ȘI METODELE DE CERCETARE conține descrierea: metodologiei utilizată pentru realizarea studiului; caracteristica obiectului de studiu și

condițiile de efectuare a experiențelor. Pentru evidențierea reacției de răspuns la infestarea artificială cu lupoaie au fost utilizate metode histochimice pentru determinarea acumulărilor suplimentare de caloză și lignină. Activitatea enzimatică a fost estimată prin metode spectrofotometrice, iar *pattern*-ul de expresie ale genelor luate în studiu – prin PCR în timp real (RT-PCR).

Capitolul 3, ESTIMAREA MODIFICĂRILOR FIZIOLOGICE, HISTOLOGICE ȘI BIOCHIMICE ASOCIATE CU REZISTENȚA PLANTELOR DE FLOAREA-SOARELUI LA LUPOAIE include date privind etapele de formare și dezvoltare a patosistemului și efectele infestării asupra plantelor de floarea-soarelui. De asemenea, sunt analizate și descrise mecanismele defensive estimate la nivel histologic și biochimic în dinamică la genotipurile rezistente și sensibile de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare artificială cu lupoaie. Rezultatele obținute pun în evidență fortificarea pereților celulari prin acumularea suplimentară a ligninei și calozei ca reacție de răspuns la acțiunea factorului de stres biotic. Este expusă descrierea detaliată a modificării activității enzimelor antioxidante (SOD și APX) și a enzimei cheie din metabolismul ligninei (PAL), ce reflectă variabilitatea acestora și intensificarea reacțiilor de protecție ale plantelor.

Capitolul 4, ASPECTE MOLECULARE ALE RELAȚIEI *Helianthus annuus* L.–*Orobanche cumana* Wallr., cuprinde date privind activitatea transcripțională a unor gene implicate în mecanismele de fortificare a pereților celulari din rădăcinile de floarea-soarelui supuse infestării artificiale cu lupoaie în dinamică în funcție de etapele de dezvoltare a patogenului. Analiza expresiei a patru gene din calea metabolică a ligninei (*PAL*, *C4H*, *4CL1* și *FAH1*) și a patru gene implicate în sinteza calozei (*GSL1-4*) a relevat o variabilitate înaltă a nivelului de expresie la genotipurile luate în studiu. În capitol este expusă descrierea detaliată a *pattern*-urilor de expresie a genelor superoxid dismutazelor și ascorbat peroxidazelor dependente atât de genotip, cât și de etapa de cultivare pe fondal de infestare. Analiza expresiei acestor gene combinate cu activitatea enzimelor și conținutul de lignină și caloză aduc contribuții noi în elucidarea fenomenului de rezistență nespecifică ale plantelor de floarea-soarelui față de lupoaie.

Concluziile generale și recomandările conțin o sinteză a principalelor rezultate ale cercetărilor efectuate, structurate conform capitolelor descrise.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele obținute sunt reflectate în **18** lucrări științifice, **un** articol în reviste recenzate peste hotare, **șase** articole în reviste recenzate naționale dintre care **două** în monoautorat, **două** articole în culegeri și **nouă** comunicări în cadrul unor foruri științifice naționale/internaționale.

Volumul și structura tezei. Teza include: adnotarea, prezentată în limbile română, engleză și rusă; lista abrevierilor, introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 328 de surse, 10 tabele, 33 de figuri, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

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.

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

Mecanismele de apărare ale plantei în fața potențialilor patogeni au o mare complexitate. Pentru inițierea unui singur mecanism defensiv este necesară activitatea sau biosinteza *de novo* a mai multor enzime, care la rândul lor generează producerea unei game variate de metaboliți. În plus, un singur metabolit poate fi utilizat de mai multe căi metabolice, a căror țintă finală nu induce același tip de răspuns de apărare. Planta are capacitatea de a activa dintre zecile de posibilități, mecanismul de apărare optim [122, 184].

Reacția de apărare este influențată de: a) etapa ontogenetică al plantei gazdă; b) tipul agentului patogen; c) calea de atac „aleasă de agresor”; d) intensitatea și durata atacului; e) condițiile mediului înconjurător etc. Astfel, mai multe răspunsuri de apărare activate în planta gazdă determină rezistența ei față de agresor, care reprezintă un proces ce depinde de: a) specia, varietatea și populația din care face parte planta gazdă; b) specia și rasa sau populația parazitului; c) factorii abiotici din mediul ambiant [3, 159, 190]. Manifestarea rezistenței poate fi diminuată prin diferite strategii care blochează stadiile de dezvoltare ale parazitului precum: germinarea, formarea apresorului și atașamentului, inducția haustorului, penetrarea țesuturilor vegetale de către parazit și conectarea acestuia la sistemul vascular, dezvoltarea, creșterea și înflorirea [175, 251]. Chiar și în cadrul unei culturi, se pot întâlni răspunsuri diferite la același nivel de infectare [103].

În literatura de specialitate mecanismele de rezistență împotriva rizoparaziților au fost clasificate în trei grupe în funcție de etapele de dezvoltare ale patogenului: *pre-atașament*, *post-atașament* (*pre-haustoriale*) și *post-haustoriale* [175, 176; 225, 283].

1.1. Rezistența *pre-atașament* a plantelor de floarea-soarelui infestate cu lupoaie

Acest grup de mecanisme se manifestă la etapa autonomă de dezvoltare a patogenului, ce se caracterizează prin germinarea și formarea apresorului. Mecanismele *pre-atașament* acționează în endodermul sau cortexul rădăcinii potențialei plante gazdă pentru a evita sau a împiedica germinarea semințelor, creșterea apresorului și atașarea rizoparazitului. Aceste procese se caracterizează prin absența sau reducerea producerii stimulatoarelor de germinare și a reducerii ratei germinației prin secreția inhibitorilor de către planta gazdă [99, 301].

Până în prezent, au fost identificate trei tipuri diferite de compuși ce au rol de stimulatori de germinare pentru rizoparazite: dihidrochinone, sesquiterpen lactone și strigolactone printre care ultimul grup sunt cei mai studiați [48, 216] și reprezintă cei mai puternici stimulatori,

provocând germinarea la concentrații mai mici de 10 pM [152]. Până în prezent, au fost izolate o mulțime de strigolactone din exsudatele diferitor plante gazdă și non-gazdă și studiată capacitatea de inducere a germinării semințelor de patogeni de către acestea [301].

1.1.1. Strigolactonele – stimulatori de germinare

Strigolactonele pot fi clasificate în două grupuri distincte din punct de vedere structural: canonice și non-canonice. Cele canonice conțin sistemul inelar ABCD, iar cele non-canonice – nu au inelul A, B sau C, dar au partea inelului enol eter-D, care este esențială pentru activitățile biologice. Cea mai simplă structură non-canonică este reprezentată de carlactonul – produs intermediar al căii de biosinteză al strigolactonelor. La plante, grupul compușilor canonic și metaboliții săi oxidați, cum ar fi acidul carlactonic și metil carlactonatul, sunt prezenți în țesuturile rădăcinii și tulpinii. La unele specii de plante, inclusiv ovăzul negru (*Avena strigosa*), floarea-soarelui (*H. annuus*) și porumbul (*Zea mays*), strigolactonele non-canonice sunt stimulative majore de germinare din exsudatele rădăcinii. Diferite specii de plante, cum ar fi roșiile (*Solanum lycopersicum*) eliberează în rizosferă acidul carlactonic, iar plopul (*Populus* spp.) – metil carlactonatul [312].

Strigolul și acetatul de strigil sunt primele strigolactone descrise și au fost izolate din exsudatele de bumbac – plante non-gazdă pentru *Striga* [67], acest fapt denotă spectrul vast al de acțiune al acestor compuși. Actualmente se cunosc peste 14 compuși purificați din secrețiile radiculare ale diferitor specii de plante (Figura 1.1.) [311].

H. annuus produce, de asemenea, stimulatori de germinare însă, *O. cumana* este receptivă doar la guaianolidil-sesquiterpen lactone și dehidrocoster lactone, care sunt considerate a fi principalele stimulente exsudate de floarea-soarelui [144]. Un alt studiu de analiză calitativă a conținutului de strigolactone efectuat la infestarea plantelor de floarea-soarelui a evidențiat prezența a mai multor tipuri. Orobanchil acetat a fost detectat atât în rădăcini, cât și în frunze, iar 5-deoxistrigol, sorgolacton și orobanchol au fost identificați exclusiv în rădăcinile plantulelor de floarea-soarelui, sorgomol a fost depistat numai în frunze [39].

O dilemă îndelungată pentru cercetători a fost motivul plantelor gazde de a-și „dezvălui” locația prin exsudarea stimulatorilor de germinare. Însă, studiile au demonstrat că metaboliții în cauză reprezintă indicatori chimici ce facilitează colonizarea fungilor de micoriză [22, 53] și aceste semnale sunt asemănătoare clasei de fitohormoni. Recent a fost raportat că speciile reactive de oxigen (SRO) și mitocondriile reprezintă mediatorii ai sintezei strigolactonelor la infecția plantelor cu fungii patogeni [38].

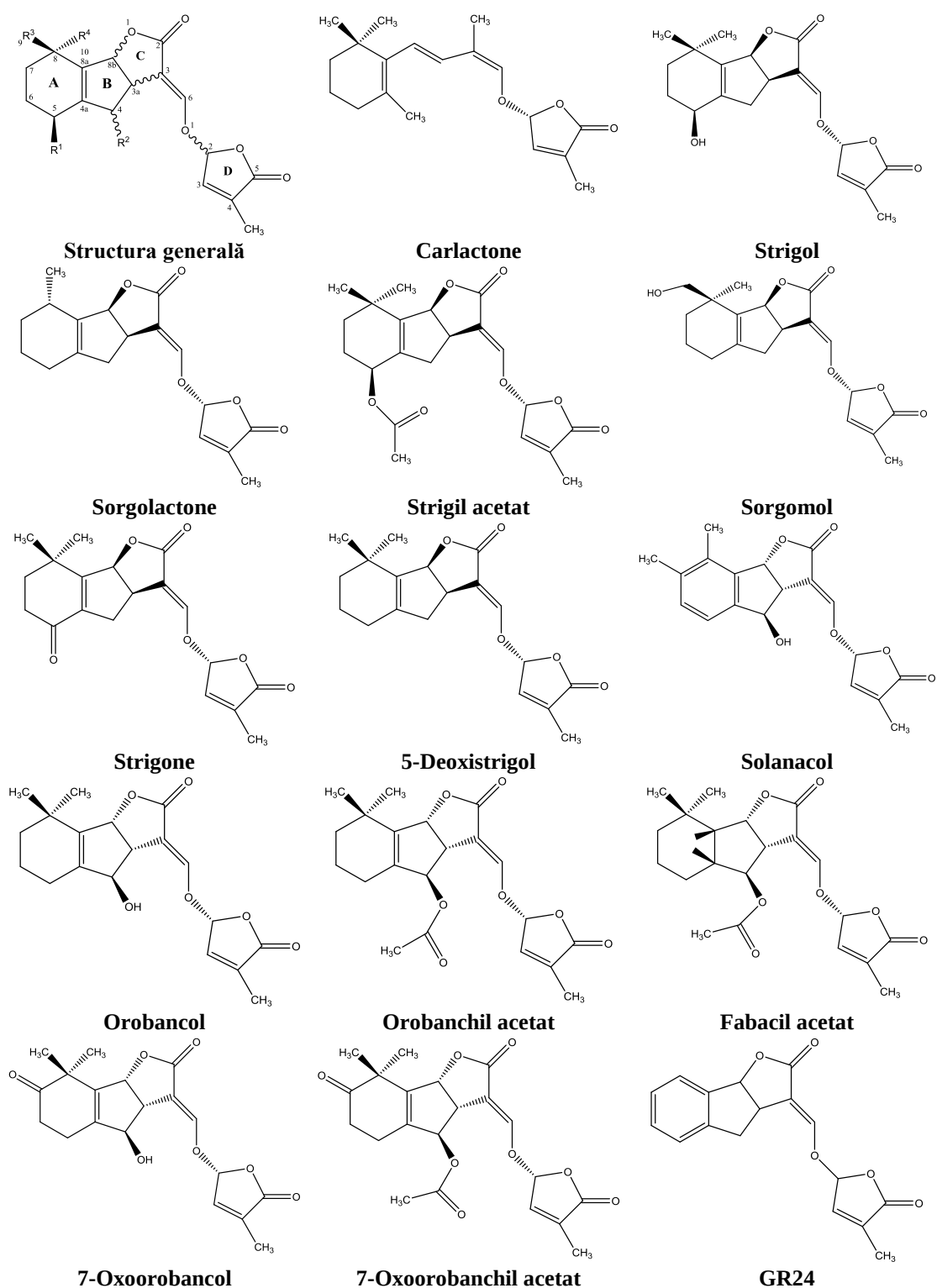


Fig. 1.1. Structura unor strigolactone naturale și GR24 (sintetic) [152]

Grupul de plante parazite – *Orobanchaceae* și-au adaptat această cale de depistare a gazdelor prin detecția metaboliților exsudați în rizosferă, reprezentând etapa crucială de germinare a semințelor și ulterior de infestare și dezvoltare a plantei parazite [91]. Deoarece

reglarea ramificării radiculare mediată de strigolactone reprezintă un mecanism ancestral la angiosperme și în urma circumstanțelor evolutive la care au fost supuse plantele parazite l-au determinat să stopeze biosinteza propriilor strigolactone, fie permanent – prin pierderea funcției pe parcursul evoluției, fie temporar – prin oprirea semnalizării acestora doar în timpul etapelor de germinare. În astfel de condiții, semințele plantelor parazite trebuie să detecteze exsudatele cu strigolactone din rădăcinile gazdelor pentru a declanșa procesul de germinare și mai târziu în dezvoltare, paraziții pot să obțină strigolactone de la gazdă direct prin conexiunea cu xilemul sau să activeze propriile căi de biosinteza a acestora [299]. Este remarcabil faptul că, plantele produc un spectru variat de astfel de compuși și în același timp speciile parazite prezintă un nivel înalt de specificitate doar la unele forme [100]. Astfel, este posibil ca patogenul să deosebească strigolactonele endogene de cele exogene și să răspundă corespunzător. Mecanismul prin care perceperea stimulatoarelor este transmisă spre declanșarea germinării nu este cunoscut, dar receptori pentru acești stimuli o reprezintă proteina F-box [120, 260] și o proteină membră a super-familiei α/β – hidrolazelor [200, 308], ambele fiind înrudite și asemănătoare proteinelor implicate în semnalizarea hormonilor la plante.

1.1.2. Caracteristica strigolactonelor ca substanțe fiziologic active

Strigolactonele sunt produse de plante prin calea carotenoidică [259] și reprezintă metaboliți instabili ce degradează rapid în sol, care în concentrații suficiente induc germinarea numai a semințelor ce sunt localizate la câțiva milimetri de rădăcinile gazdei [143, 311]. Gradientele de concentrație a strigolactonelor pot, de asemenea, să faciliteze creșterea direcționată a apăsorului parazitului spre rădăcina gazdei [157]. Astfel, tratamentul cu un analog al strigolului la concentrații scăzute asupra semințelor de *P. ramosa* a avut efect stimulator, pe când la concentrații mai mari – a manifestat efect inhibitor [145].

Sensibilitatea semințelor plantei parazit la aceste substanțe depinde de perioada de precondiționare, în special de condițiile climaterice, conținutul apei în sol și de sinteza concomitentă a giberelinelor în țesuturile semințelor [182].

Strigolactonele reglează ramificarea radiculară la plante [276, 277] și reprezintă mediatori importanți ai răspunsului plantelor la condițiile mediului, nivelul acestora crescând esențial la carențele de fosfați și în rezultat are loc stimularea procesului de colonizare a fungilor [310]. De asemenea, în condiții de insuficiență cu fosfați a solului are loc reglarea arhitecturii vârfului apical al rădăcinii prin limitarea ramificării [167]. Utilizarea sistemului strigolactonelor de către parazit oferă un exemplu elocvent în ceea ce privește modul în care pot fi modificate semnalele

pentru a deservi alte funcții. Mai mult ca atât, strigolactonele limitează, de asemenea, alungirea hipocotilă, creșterea rădăcinilor, dezvoltarea frunzei și senescenta [169, 274].

Există cercetări, care arată că strigolactonele pot opri hibernarea semințelor la plante neparazitate precum *Lactuca sativa* și *Avena fatua* [50]. Butenolida - un compus cu structură similară cu a strigolactonelor, induce germinarea semințelor la o varietate largă de specii de plante [170] inclusiv, *Orobanch*e și *Striga* [71]. Cu toate că, reglarea germinării mediată de strigolactone la plantele parazite derivă de la un mecanism comun de control a dezvoltării plantelor există o mulțime de aspecte necunoscute. Rezultate recente demonstrează de asemenea, că strigolactonele participă la reglarea diferitor răspunsuri la stresul plantelor, incluzând toleranța la secetă și rezistența la boli [72, 123].

Deși semințele de *O. cumana* sunt receptivă la compușii eliminați, dehidrocostus lactona este cel mai activ stimulator de germinare exsudat de rădăcinile de floarea-soarelui [144, 224], urmat de heliolactona, care determină germinarea a unui spectru mai larg de patogeni [275]. În mod similar, pentru semințele de *P. ramosa*, principalele stimulente de germinare din exsudatele rădăcinii de rapiță sunt izotiocianatii, care sunt produse de degradare a glucosinolaților [30]. De asemenea, specificitatea semințelor de *O. foetida*, se manifestă pentru compuși non-strigolactonici, cum ar fi peagol și polifenol [97].

1.1.3. Inhibiția și reducerea producției de stimulatori de germinare

Sensibilitatea semințelor de *Orobanch*e spp. față de stimulentele de germinare este corelată pozitiv cu producția de gibereline, în timpul condiționării acestora, prin urmare, germinarea poate fi redusă de inhibitorii biosintezei giberelinei [142]. Aplicarea inhibitorului de gibereline-uniconazol pe solurile unde s-a cultivat floarea-soarelui, a redus semnificativ numărul de atașamente și a sporit productivitatea culturii [142]. Varietățile de floarea-soarelui rezistente la *O. cernua* au exsudat cumarinele care inhibă germinarea și sunt toxice pentru semințele germinate [251]. De asemenea, metaboliți alochimici neidentificați din ovăz au determinat inhibiția germinării semințelor de *O. crenata* și reducerea parazitismului atunci când sunt incorporate cu leguminoasele [104]. Germinarea semințelor poate fi, de asemenea, influențată de anumiți aminoacizi, care s-au dovedit a avea efecte profunde asupra dezvoltării *O. ramosa*. Astfel, aplicarea exogenă a metioninei aproape a inhibat germinarea semințelor și a redus numărul tuberculilor de *Orobanch*e spp. de pe rădăcinile de roșii, eventual indicând asupra faptului că aplicarea în sol a aminoacizilor sau a bacteriilor producătoare de aminoacizi ar putea fi folosite pentru a gestiona angiospermele parazitare [294]. Rezultate similare ce au confirmat efectul inhibitor al aminoacizilor relevante la infestarea trifoiului roșu cu *O. minor*, au demonstrat

că metionina este mai eficientă decât lizina și triptofanul și aplicația succesivă a două tratamente cu metionină au inhibat apariția patogenului cu până la 67% [98].

Reducerea producerii de stimuli de germinare este cel mai bine caracterizat mecanism de rezistență față de plantele parazite [103, 236]. Această strategie a fost cu succes exploatată în ameliorarea sorgului pentru a oferi rezistență la *Striga* [127]. Sursele de rezistență naturală bazate pe exsudarea scăzută a factorilor care provoacă germinarea au fost propuse pentru leguminoase și floarea-soarelui și sunt foarte eficiente în reducerea numărului de semințe germinate de *Orobanche* ssp. [99, 158, 160, 222, 240, 241].

Exsudatul obținut de la genotipuri rezistente de *Solanum lycopersicum*, a inhibat germinarea semințelor *P. aegyptiaca* prin utilizarea lui ca lichid de irigare asupra genotipurilor susceptibile de *S. lycopersicum* și a fost relativ eficient pentru scăderea numărului de tuberculi și lăstari fixați de rădăcinile gazdei [80].

1.1.4. Evidența plantelor parazite prin testul de germinare suicidală

Inducerea germinării semințelor de *Striga* spp. și *Orobanche* spp. în absența unei plante gazdă adecvate conduce la „germinarea suicidală” și la reducerea ulterioară a numărului de semințe de plante parazite în sol. Atât compușii artificiali cât și cei naturali au fost investigați pentru capacitatea lor de a induce germinarea. S-au sintetizat analogi de strigol (de exemplu, GR 24 și Nijmegen 1) care sunt potențiali elicitori ai germinării atât pentru specii de *Striga*, cât și pentru *Orobanche* [302]; cu toate acestea, instabilitatea lor în sol și costul ridicat de producere a unor cantități mari de astfel de compuși nu au permis până acum utilizarea lor în agricultură [132]. Instabilitatea inerentă a strigolactonelor se datorează în principal scindării ușoare a dublei legături de carbon dintre enol și eter cu agenți nucleofili, inclusiv și apa [21]. Totuși, etilena a constituit o soluție valoroasă a programului de eradicare, care vizează *Striga asiatica* în Statele Unite, unde fiind aplicată în sol a provocat germinarea a aproximativ 90% de semințe [136]. Cu toate acestea, solul prelucrat cu etilenă influențează în mod negativ dezvoltarea micorizelor și a altor microorganisme non-țintă din rizosferă [134]. Ulterior, a apărut ideea de utilizare a bacteriilor nepatogene producătoare de etilenă, ce ar putea fi utilizate pentru a induce germinarea suicidală la *Striga* [19], dar este necesară o mai bună înțelegere a interacțiunilor dintre bacterii, etilenă și culturi înainte ca această metodă să poată fi utilizată în agricultură. Alți compuși naturali, inclusiv unele toxine fungice [65] și metil jasmonatul [198] au demonstrat că induc germinarea semințelor de *Striga* și *Orobanche*, însă utilizarea lor în agricultură rămâne la moment neexplorată.

Plantarea culturilor non-gazdă reprezintă capcane care provoacă germinarea suicidală și este probabil cea mai eficientă strategie disponibilă în prezent pentru controlul patogenilor [104, 173]. Studiile recente din acest domeniu s-au axat pe identificarea și evaluarea eficacității [101, 151] și posibilitatea reducerii producției de stimulatori de germinare.

O strategie mai nouă de combatere a plantelor parazite o reprezintă sinteza compușilor simpli ce imită strigolactonele, eficienți ca semnale exogene pentru semințele din rizosferă. Au fost obținuți și caracterizați noi compuși care înlocuiesc strigolactonele, derivați din materii prime simple și disponibile în cantități semnificative [209].

1.1.5. Inhibitori de germinare și antagoniștii strigolactonelor

Reducerea procentului de germinare observată la genotipurile sau formele rezistente ale gazdelor poate fi determinată mai degrabă de producerea inhibitorilor de germinare, dar nu de scăderea conținutului de stimulenți sau de activarea concomitentă a acestor procese metabolice [251, 301]. Majoritatea rapoartelor disponibile pe această temă sugerează că activitatea stimulatorie a exsudatelor de rădăcină depinde de concentrațiile respective de stimulenți de germinare și de inhibitorii de germinare [204].

Studiile recente demonstrează că unele strigolactone pot servi în calitate de inductori de germinare pentru *S. gesnerioides*, prezentând o activitate limitată în inducerea germinației pentru semințele de *S. hermonthica*. Dimpotrivă, un alt grup de compuși au fost incapabili de a induce germinarea semințelor de *S. gesnerioides* manifestând un efect de inhibare puternică, aplicați pe semințele de *S. hermonthica* au determinat o germinare înaltă [206].

Antagoniști de germinare reprezintă un alt grup de substanțe chimice care se pot lega de receptori strigolactonelor astfel, blocând interacțiunile dintre receptori și moleculele semnal ale compușilor stimulatori. Aceștia pot bloca răspunsurile biologice care ar putea fi evocate de către moleculele semnal prin inhibiția funcției față de receptor. Prin urmare, antagoniștii receptorilor strigolactonelor reduc rata infestării, neafectându-se randamentul plantelor de cultură. În plus, compușii menționați pot fi utilizați de asemenea, pentru protecția culturilor prin inhibarea germinării semințelor parazite.

Un studiu recent a identificat antagoniști ai receptorilor strigolactonelor prin inducerea unor modificări covalente ireversibile la nivelul unor resturi proteice. Derivați de β -propiolactonă, modifică covalent restul serinei din receptor și inelul D din structura strigolactonelor nu poate fi recunoscut [265]. În plus, fluorofosfații, carbamații și ureele heterociclice similar, modifică covalent restul serinei al receptorului [256]. Prin urmare, acestea sunt ținte potențiale pentru obținerea unui antagonist sintetic al strigolactonelor.

O altă direcție de reducere a procentului de germinare o prezintă blocarea căii de sinteză a strigolactonelor. În această privință, s-a raportat că moleculele mici care conțin triazol inhibă biosinteza strigolactonelor [135]. Recent, McCourt și colegii [129] au identificat antagoniști necovalenți ai receptorilor strigolactonelor printr-un *screening* de capacitate exactă cu ajutorul nanoparticulelor IC₅₀.

Inhibitorii de germinare ar putea reprezenta un mecanism aparte de rezistență. Astfel, fitoalexinele – scopoletina și aiapina produse de floarea-soarelui (cumarine 7-hidroxilate) au demonstrat efect inhibitor asupra germinării semințelor de *O. cumana* atunci când aceasta a fost indusă cu ajutorul stimulantului sintetic GR24 [217].

1.2. Rezistența *post-atașament* a plantelor de floarea-soarelui infestate cu lupoaie

Mecanismele de rezistență *post-atașament* se activează în cortex [90, 221, 223] și endoderm [218, 219, 221] prin *impregnarea pereților* celulari cu fenilpropanoide, proteine *cross-linking*, glicoproteine bogate în hidroxiprolină, suberine etc. [175]. De asemenea, sunt descrise mecanisme de inhibare a formării haustorului *prin fortificarea pereților celulari ai rădăcinilor gazdei*, *dezorganizarea celulară a apresorului* [90, 160]. Aceste mecanisme constituie pe de o parte o barieră fizică pentru prevenirea invaziei patogenului, iar pe de altă parte un răspuns chimic prin producerea și secreția unor compuși de natură fenolică, care ulterior va contribui la intoxicarea parazitului.

Lupoaia pătrunde în țesuturile gazdei prin acțiune mecanică și digestie enzimatică și/sau prin modificarea pereților celulari ai plantei-gazdă cu ajutorul enzimelor, inclusiv celulaza, hemicelulaza, enzime pectolitice (pectin metilesteraza, poligalacturonaza), peroxidaza și proteaze [28, 57]. Aceste enzime pot fragiliza pereții celulelor gazdei, în special lamela de mijloc, facilitând progresia invazivă a parazitului în țesuturile radiculare ale plantei atacate. În urma acestui proces complex are loc transmiterea semnalelor de la receptorii trans-membranari în celulă, care ulterior produce o explozie a SRO, iar acestea din urmă realizează rolul important de mesageri în semnalizarea celulară pentru răspunsul defensiv la infestarea cu patogen.

În general, răspunsurile sunt foarte rapide, deoarece patogenul determină acțiune fizică iar stresul mecanic induce producerea tranzitorie a ionilor de Ca²⁺, modificarea *pH*-ului și creșterea conținutului de SRO [193, 228]. Orice semnal mecanic ar trebui să modifice de regulă și tensiunea plasmatică a membranei care la rândul ei sporește stresul osmotic [228]. Toți acești factori precum și modificările hormonale activează căile de transducție a semnalelor pentru răspuns la invazia patogenului. Cascadele de semnalizare sunt rețele complexe de entități ce au o natură generală pentru combaterea stresului biotic și abiotic [303] și reprezintă căi ce se

intersectează și se suprapun, determinând diversitatea și natura generală a mecanismelor defensive [195].

1.2.1. Aspecte biochimice a interacțiunii gazdă-parazit

Plantele posedă enzime antioxidante care reduc efectul negativ al radicalilor liberi. Acumularea SRO poate determina procese oxidative ca: oxidarea lipidelor membranare, a proteinelor, a glucidelor, inhibarea enzimelor, alterarea ADN-ului și ARN-ului. Toate aceste modificări contribuie la reducerea fotosintezei, creșterea scurgerii de electroliți, accelerarea senescentei și moartea celulelor [189]. Producerea varietăților de SRO, inclusiv radicalului superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxidului de hidrogen (H_2O_2), radicalului hidroxil ($OH^{\cdot}$) și oxidului nitric (NO) este asociată cu procesele metabolice normale ale celulelor plantelor. În condiții de stres, celulele plantelor sunt capabile să inducă o „explozie” de SRO, care este în primul rând constituită din H_2O_2 [128, 272, 284].

Generarea SRO reprezintă unul dintre primele procese care apar la plante în timpul recunoașterii patogenului. SRO sunt molecule reactive din punct de vedere chimic datorită oxigenului din componența sa.

Flexibilitatea sistemului antioxidant este determinată de prezența antioxidantilor enzimatici și non-enzimatici, care au diferită localizare subcelulară, de proprietățile biochimice ale acestora și de activitatea genelor antioxidantilor care sunt capabile să controleze nivelurile optime ale SRO [59]. Nivelurile crescute de SRO induc biosinteza moleculelor antioxidante, inclusiv ascorbați, poliamine și glutatation [110]. Stresul oxidativ determină creșterea activității enzimelor antioxidante, cum ar fi superoxid dismutaza (SOD), catalaza, peroxidaza, ascorbat peroxidaza (APX), glutatation-S-transferaza etc. [114, 191]. Grație funcționării sistemelor de protecție antioxidative, în celule plantelor cultivate în condiții normale se păstrează un echilibru dinamic al proceselor de formare și de reducere a SRO. Nivelul intracelular al enzimelor antioxidative este determinat genetic și, de regulă, se activează în complex. Astfel, sistemele enzimatică sunt specifice și reducere a oxigenului este realizată la diferite etape.

Formele tolerante ale plantelor se deosebesc prin conținut mai înalt de ascorbat, α -tocoferol, carotenoizi, activitate mai înaltă a superoxid dismutazei, catalazei, peroxidazei, glutatation reductazei etc. În marea majoritate cazurilor, statutul antioxidant înalt este în corelație cu rezistența sporită față de factorul nefavorabil [11, 75].

Reglarea activității enzimelor antioxidante, în mare parte este mediată de acidul salicilic (AS), acesta poate contribui la creșterea producerii SRO și activarea apărării împotriva infestării.

Cea mai importantă enzimă ce participă la neutralizarea efectelor stresului oxidativ este SOD (CE 1.15.1.1). Aceasta constituie prima linie de apărare față de superoxid, asigurând neutralizarea acestuia în compuși mai puțin toxici – oxigen și peroxid de hidrogen. SOD reprezintă reglatorul principal al proceselor de oxidare în celulă [278].

În baza cofactorului prezent în enzimă, SOD se clasifică în trei grupe, acestea fiind localizate în diferite compartimente celulare [24]. Fe-SOD sunt localizate numai în cloroplaste, Mn-SOD – de obicei în mitocondrii dar, poate fi întâlnită în cloroplaste și peroxizomi, Cu/Zn-SOD – în citosol, în cloroplaste și mai rar în mitocondrii și peroxizomi. Secvența aminoacidică a acestor trei tipuri de SOD sugerează că Mn-SOD și Fe-SOD sunt mai vechi din punct de vedere evolutiv și, probabil, enzimele respective au apărut de la o enzimă ancestrală comună [55]. Evoluția Cu/Zn-SOD a decurs separat în eucariote, deoarece acestea nu manifestă similaritate la nivel de secvență cu Mn-SOD și Fe-SOD [245]. Expresia diferențială și localizarea membrilor familiei SOD au fost studiate la diferite specii de orez și sorg [106, 202] și în special la planta model – *Arabidopsis* [153].

Există puține date referitoare la mecanismul de activare a genelor SOD la plantele cultivate. Fernández-Ocaña și coautori (2011), pentru prima dată au demonstrat ca floarea-soarelui are două gene mitocondriale *Mn-SOD* cu expresia de 1000 de ori mai mică decât cele citosolice și cloroplastice *Cu/Zn-SOD*, estimate în diferite părți ale plantulei de floarea-soarelui la vârsta de 9 zile. Studiul dat a demonstrat reglarea diferențiată a acestor gene *SOD* și formarea modelului complex de expresie, ca răspuns la infecția cu *Plasmopara halstedii* și stimulii abiotici (temperatură înaltă și joasă, rănire mecanică) [105].

Ascorbat peroxidaza este o enzimă importantă a ciclului ascorbat-glutationului și joacă un rol esențial în menținerea nivelului intracelular a SRO [257]. APX folosește două molecule de acid ascorbic pentru a transforma H_2O_2 în apă, generând în același timp monodehidroascorbat. La plantele superioare au fost identificate cinci izoforme de APX în diferite localizări subcelulare: în citosol, stromă, tilacoizi, mitocondrii și peroxizomi. APX localizat în organitele celulare reduce H_2O_2 produs de acestea, în timp ce APX din citosol elimină H_2O_2 din citosol, apoplast și cel care difuzează din organite [40]. Mai multe rapoarte au evidențiat faptul că printre izoformele APX, peroxidaza din citosol (APX1) joacă un rol-cheie în reglarea nivelurilor de H_2O_2 în timpul stresului [155].

Enzima APX (CE 1.11.1.11) face parte din clasa I hem-peroxidazelor și a fost studiată la diferite specii de plante, cum ar fi *Arabidopsis thaliana* [64], *Oryza sativa* [235], *Solanum lycopersicum* [199], *Vigna unguiculata* [70] etc.

Nouă tipuri de APX au fost identificate la *Arabidopsis* în funcție de localizarea lor subcelulară [59]. Expresia genelor APX depinde de țesut și stadiul de dezvoltare și este reglată de diverși stimuli abiotici și biotici: secetă, salinitate, lumină excesivă, temperaturi ridicate și scăzute, atacuri patogene, H₂O₂ și acid abscizic [46, 112, 186, 237].

1.2.2. Fortificarea pereților celulari prin acumularea de lignină

În ultimul timp, se acordă o deosebită atenție studierii aspectelor citologice ale rezistenței plantelor la antofite [160, 218, 220, 221]. Au fost studiate procesele mecanice de fortificare a pereților celulari și de formare a barierelor fizice cu ajutorul fenilpropanoizilor și derivații acestuia. Astfel, aceste procese precum lignificarea, suberificarea, cutinizarea, depunerea de caloză, acumularea proteinelor *cross-linking*, cumarinelor și taninelor împiedică penetrarea rădăcinilor de năut, bob, mazăre, mazărice, rapița, morcov, floarea-soarelui de către speciile *Orobanchae* – *O. crenata*, *O. aegyptiaca*, *O. cumana*, *O. ramosa* [119, 160, 220, 222, 242].

Lignina este un polimer aromatic complex, care este depus preponderent în momentul formării pereților secundari ai celulelor tuturor plantelor vasculare [156, 280]. Aceasta este strâns reticulată cu alte componente ale peretelui care conferă formă celulelor, susținere mecanică și rigiditate țesuturilor plantelor [243]. Funcția sa în plante include, de asemenea, apărarea împotriva factorilor abiotici și biotici, în special agenții patogeni și insecte [178], conferă o stabilitate mare vaselor xilemice și eficientizează transportul apei [290].

Lignificarea se întâlnește atât la interacțiunile incompatibile ale sistemelor genă-pentru-genă, dar este, de asemenea, observată și în mecanismele de rezistență nespecifică și rezistență sistemică dobândită [262]. Celule lignificate ar putea constitui, de asemenea, o barieră de prevenire liberă a circulației de nutrienți și prin urmare, conduce la deficitul de nutrienți ale agentului patogen. Precursorii ligninei pot exercita un efect toxic asupra agenților patogeni prin legarea de pereții celulelor micotice, determinând rigiditate și impermeabilitate, împiedicând astfel, creșterea în continuare și/sau absorbția apei și nutrienților [162].

Lignina este formată prin polimerizarea dehidrogenativă aleatorie a precursorilor în calea fenilpropanoidică [77]. Primul pas în această cale este dezaminarea fenilalaninei catalizată de enzima fenilalanin amonia-liaza (PAL) și obținerea acidului trans-cinamic. Activitatea enzimei PAL influențează direct cantitatea precursorilor pentru lignină și pentru mai multe produse secundare derivate, implicate în rezistența plantelor cum ar fi: fitoalexinele, furanocumarina și izoflavonoizi, precum și AS (Figura 1.2) [25, 76]. Activitatea PAL este indusă semnificativ în urma infecției cu patogeni. În acest sens, au fost realizate studii prin care după tratamentul cu diferiți elicitivi a plantelor gazdă s-a identificat declanșarea reacției de apărare prin sporirea

conținutului și activității PAL [150, 246, 288]. Reducerea activității PAL *in vivo* prin inhibitori specifici diminuează capacitatea de rezistență la diferite plante [54, 183]. Alte enzime ale căii fenilpropanoidice sunt cinamil-alcool dehidrogenaza, o enzimă care este extrem de importantă pentru lignificare, 4-coumarate-CoA ligaza și peroxidaza ce induce reacții de rezistență [126, 188, 280]. În această cale se mai includ și alte enzime cum ar fi: trans-cinamat 4-mono-oxigenaza (C4H), 4 calcon-sintetaza, *p*-coumarat 3-hidroxilaza (C3H), ferulat 5-hidroxilaza (F5H) etc. (Figura 1.2) [35, 113, 254, 304, 318].

Intensificarea biosintezei ligninei determinată de stresul biotic a fost atribuită la stimularea căii fenilpropanoidelor și inducerea polimerizării apoplastice a ligninei [41, 43]. Aceste reacții de apărare sunt mediate de cascade de semnalizare a SRO care determină stresul oxidativ [26, 208].

Acest lucru poate fi mediat prin NAD(P)H-oxidaze, adică, enzime membranare care transferă electronii de la NAD(P)H citosolic spre oxigenul extracelular pentru a produce superoxid.

Mecanismul de apărare prin lignificare sporește toleranța la stresul biotic la un spectrul larg de culturi atacate de diferiți agenți patogeni și evidențiază universalitatea acestei reacții de răspuns la invazia paraziților. Cercetările efectuate asupra acestui tip de mecanism de răspuns la acțiuni nefavorabile venite din exteriorul plantei au două aspecte. Primul se bazează pe studii de manipulare a genelor care sunt implicate în biosinteza ligninei pentru obținerea liniilor izogene de culturi cu un conținut sporit de lignină. Această abordare a fost realizată pe un șir de culturi, cum ar fi: grâu [42], orez [296], tutun [146], bumbac [258] și morcov [295]. Astfel, pentru a obține dovezi directe ale implicării ligninei în toleranța împotriva factorilor de stres au fost creați mutanți cu un număr mai mare ale alelelor genelor implicate în sinteza ligninei. Rezultatele au fost diferite, în unele cazuri s-a câștigat prin mărirea funcției genelor (pentru a mări conținutul de lignină), iar în altele s-a pierdut activitatea funcțională a genelor (s-a micșorat conținutul de lignină) la mutanți.

O altă categorie cuprinde studii care aplică pre-tratament cu elicitori ce induc rezistența sistemică dobândită la diferite culturi, ulterior se determină creșterea nivelului ligninei în celulele plantelor atacate de patogeni. În acest scop, au fost folosite pre-tratamente cu elicitori de *Pseudomonas* ssp. [286], extracte fungice [201], compuși chimici, cum ar fi acidul salicilic, acidul diclorizonicotinic [18]. Aceste tratări au determinat creșterea conținutului de lignină și, în consecință, s-a sporit rezistența plantelor tratate față de alți factori de natură biotică.

Calea metabolică generală a fenilpropanoidelor

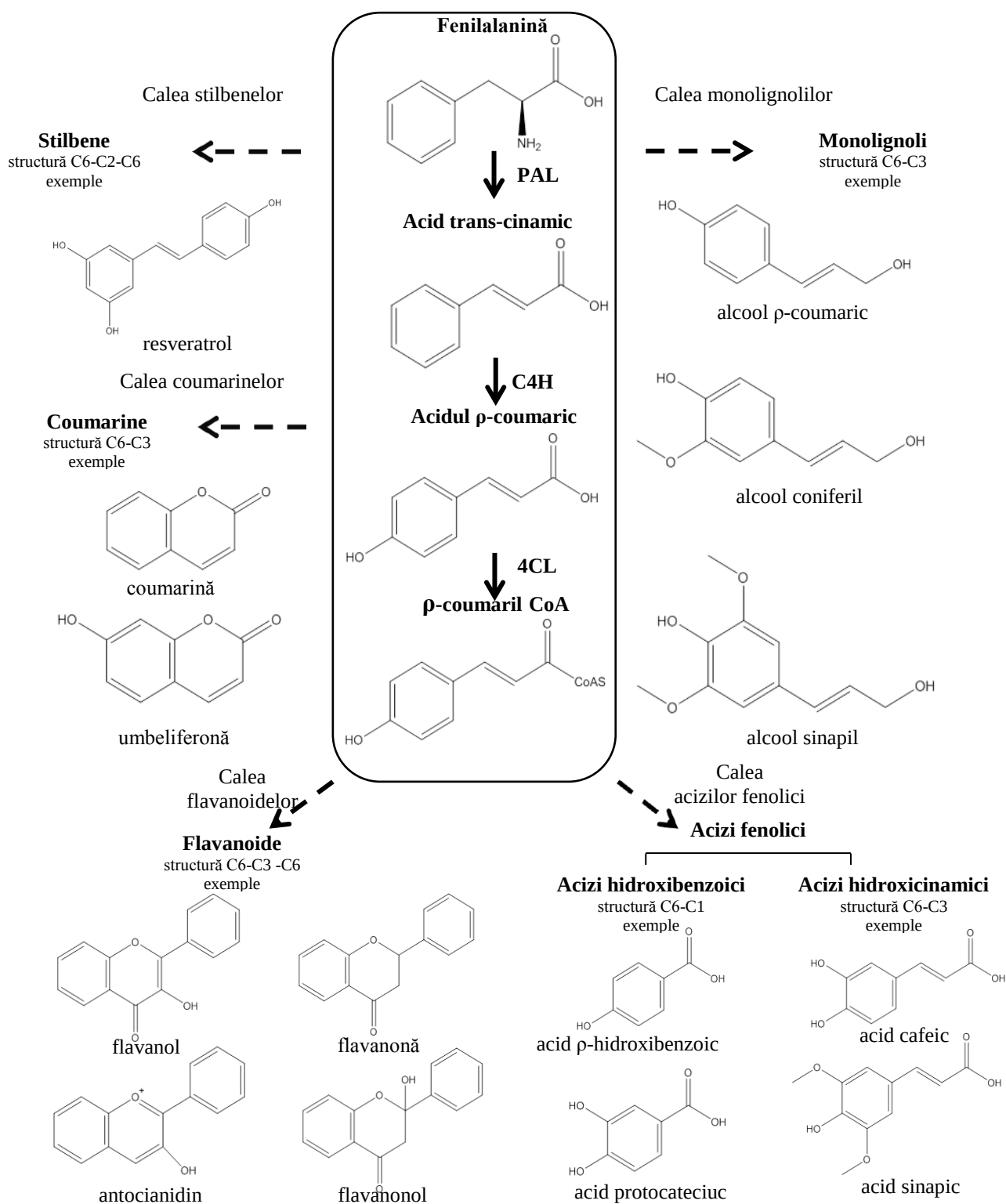


Fig. 1.2. Calea de biosinteză a fenilpropanoidelor [76].

La hibridii de floarea-soarelui investigați de către Panchenko și Antonova, răspunsul de apărare a determinat reducerea acumulării de lignină și a precursorilor ei în celulele vătămate ale

gazdei, determinând pierderea capacității haustorului de a se aproviziona cu apă și substanțe nutritive din celulele gazdă [322].

1.2.3. Biosinteza și acumularea calozei ca răspuns la infestarea cu patogeni

Un alt compus macromolecular implicat în răspunsul defensiv la acțiunea factorilor biotici este caloza. Aceasta este polimerul (1,3)- β -glucanului cu unele ramificări în pozițiile 1,6 care se acumulează în peretele celular [62, 140]. Se găsește în peretele celular al tuturor algelor verzi multiceulare, precum și la plantele superioare [247] și prezintă una dintre cele mai dinamice poliglucide ale peretelui celular. Cantitatea și distribuția de caloză este extrem de variabilă în funcție de etapele de dezvoltare și prezența factorilor biotici și abiotici. Astfel, ea realizează funcția de barieră fizică pentru diverse leziuni și este responsabilă de restaurarea integrității celulelor plantei-gazdă [93, 108]. La nivelul mecanismelor de inducere a biosintezei și transportului calozei sunt un șir de aspecte care necesită studii ulterioare.

Atunci când celulele sunt supuse la stres, caloza se acumulează rapid și blochează porii tuburilor ciuruite. Papilele de caloză reprezintă o structură complexă, care se formează între membrana plasmatică și partea interioară a peretelui celulei plantei [93, 291]. De asemenea, biosinteza și degradarea calozei în regiunea desmotubulei plasmodesmelor ajută la reglarea permeabilității în timpul stresului abiotic și biotic. Ca răspuns la atacul patogenilor, caloza este depozitată între membrana plasmatică și peretele celular pre-existent în locul de contact al patogenului [31, 205]. Depunerile dispersate de caloză sunt localizate lângă punctul de infestare cu fitopatogenul *O. cumana*, în celulele care nu sunt în contact direct cu acesta și care nu este implicată în procesul de întărire a peretelui celular [177]. Astfel, la genotipuri de floarea-soarelui rezistente la *O. cumana*, fortificarea pereților celulari a fost precedată de elevarea expresie genei *HaGSL1* care codifică enzima glucan sintetaza [166]. Acesta din urmă participă la sinteza și acumularea de caloză. Într-un alt efort de comparare a unei serii de genotipuri *Helianthus* [158] privind mecanismele de rezistență la *O. cumana* pentru genotipul LR1 a fost atestată depunerea calozei în xilem în contact imediat cu parazitul, datorită supraexpresiei genei *HaGSLI* [73]. În unele cazuri vasele conducătoare erau blocate complet astfel, că apa și nutrienții nu puteau ajunge la parazit. Stoparea penetrării țesutului foliar la *Vitis vinifera* infectată cu *Plasmopara viticola* a fost datorată acumulării de caloză, detectată doar la genotipurile rezistente [117].

Chiar dacă caloza este implicată în mai multe procese biologice importante, cunoștințe detaliate despre reglarea metabolismului acestui polimer din peretele celular precum și funcția specifică nu au fost studiate pentru toți membrii familiei enzimelor glucan-sintetazelor care participă la biosinteza acesteia. Contribuții majore pentru a elucida mecanismul de biosinteză și

reglare a depunerii calozei au fost făcute de Hong și colab. în 2001, Jacobs și colab. în 2003 și Nishimura și colab. în 2003. Aceștia au oferit pentru prima dată o imagine detaliată despre rolul biologic a membrilor de la două familii implicate în biosinteza calozei [131, 137, 205].

În general, formarea papilelor de caloză este un răspuns de apărare precoce și poate contribui la imunitatea înăscută a plantei [147, 249]. Prin încetinirea invaziei patogenilor în țesutul atacat determinat de formarea papilelor, se poate câștiga timp pentru inducerea răspunsurilor de apărare suplimentare care ar putea necesita activarea expresiei genelor [45].

1.2.4. Acumularea altor compuși în peretele celular

Identificarea proteinelor *cross-linking* a demonstrat că acestea asigură un răspuns rapid și eficient de apărare împotriva agenților patogeni cum ar fi bacterii sau ciuperci [221]. Acest proces de reticulare a proteinelor reprezintă legarea a două sau mai multe molecule de proteine împreună pentru a realiza reacția de răspuns la interacțiunea cu patogenii. Reticularea este dependentă de conținutul de SRO generat de lacaze și peroxidazele din peretele celular [164]. Acest proces consolidează rezistența și rigiditatea pereților celulelor și poate fi o componentă cheie a răspunsului plantei la factorii de mediu [124, 273]. Arhitectura peretelui celular este importantă în rezistența plantei la stresul abiotic și esențială în detectarea stresului și transducția semnalului [250]. În urma activității oxalat-oxidazei sau SOD se produce H_2O_2 sub acțiunea cărora are loc reticularea proteinelor germin-like împreună cu peretele celular [154, 267].

Cele mai abundente proteine structurale ale pereților celulari sunt glicoproteinele. Acestea sunt induse ca răspuns de apărare, în special în interacțiuni incompatibile între plante și patogeni [34, 211]. Funcțional, există dovezi că aceste proteine acționează ca o barieră impenetrabilă împotriva țesuturilor patologice și că imobilizează agenții patogeni prin legarea lor cu ajutorul resturilor negative de la suprafață [56]. Acest proces implică formarea de legături covalente în urma reticulării cu alte elemente ale peretelui celular [90].

Grupul de glicoproteine include: extensinele, proteine arabinogalactan (AGP), proteine bogate în prolină/hidroxiprolină și solano-lectine [32, 89]. Dintre acestea, P/HRG și extensinele sunt cunoscute a fi proteine insolubile, în timp ce AGP-urile sunt solubile. Majoritatea studiilor anterioare privind inducerea acumulării de proteine bogate în hidroxiprolină în urma infestării a fost efectuată la dicotiledonate.

Suberificarea constă în impregnarea peretelui celular (îndeosebi a celui secundar) cu o substanță lipidică numită suberină. Depunerea acesteia se face prin apoziție – lamele subțiri de suberină alternează cu straturile de celuloză din peretele secundar; ultimul strat depus spre interiorul celulei fiind de celuloză pură [74, 289].

Suberina este un poliestere de complexe alifactice și fenoli, depusă pe fața interioară a peretelui celular adiacent membranei plasmatică [203]. Distribuția suberinei pe pereții celulari sugerează că plantele sintetizează și depozitează acest compus atunci când au nevoie de o barieră persistentă [111]. Depozitarea constitutivă a suberinelor apare în primul rând la interfețele țesut-țesut sau ale țesut-mediului, cum ar fi pereții celulari endodermali și peridermici. Suberina, fiind impermeabilă pentru apă și gaze datorită cantității mari de acizi grași oxigenați bifuncționali (ω -hidroxilic și α , ω -dicarboxilic), izolează protoplastul de mediul înconjurător și astfel, celula moare [289]. Deși formate din celule moarte, țesuturile suberificate au un rol important în viața plantei, reducând transpirația, constituind un izolator termic și apărând țesuturile vii ale scoarței și cilindrului central de atacurile unor paraziți [248].

1.2.5. Căile de semnalizare a acidului salicilic și jasmonic

În cadrul procesului patologic, interacțiunea dintre parazit și planta gazdă induce modificări atât în expresia anumitor gene, cât și în conformația anumitor enzime (modificări epigenetice). În consecință, are loc modificarea căilor metabolice și sinteza unor compuși care aparțin aparatului defensiv al plantei. Astfel, AS și acidul jasmonic (AJ) reprezintă hormoni cu rol esențial în rezistența plantelor la diferiți factori de mediu.

AS este produs prin activarea căii fenilpropanoidice și induce activarea mecanismelor de rezistență sistemică dobândită. AS activează răspunsurile de apărare la gazdele susceptibile, care conduc la lignificarea endodermului și la o inhibare consecutivă a dezvoltării patogenului [157]. AS este un inductor chimic de apărare care promovează rezistența la boli fungice, bacteriene și virale și induce sinteza proteinelor asociate cu patogenitatea și răspunsul hipersensibil la multe specii de plante. Este cunoscut faptul că AS este implicat în reglarea mecanismelor de rezistență al plantelor [79, 102]. Deși mecanismul de mediere a AS nu este complet cunoscut la toate culturile, rolul său central în apărarea plantelor este bine stabilit [229]. Acumularea AS s-a dovedit a fi crucială pentru biosinteza proteinelor implicate în patogenitate [255]. Acestea din urmă au activitate anti-microbiană și sunt implicate în rezistența plantelor.

Tratarea semințelor de floarea-soarelui cu AS exogen, urmată de infestarea cu *O. cumana* a determinat reducerea nivelului endogen al AS și expresia unor gene ale acestei căi metabolice, incluzând *pal*, *chs* (calcon sintetaza) și *NPR1*. În contrast, infestarea cu lupoaie a sporit producția de SRO, activitatea enzimelor antioxidante, precum și conținutul de fenoli și lignină. Aplicarea unei concentrații mai mari de AS a intensificat expresia genelor asociate patogenității (*PR3* și *PR12*, care codifică chitinaza și, respectiv, defensina) [307].

În mod independent, la genotipurile de floarea-soarelui rezistente la atacul cu *O. cumana*, supraexpresia genelor *PAL* și *PR5*, sugerează implicarea acestor gene în răspunsurile defensive și activarea căilor de semnalizare a AS în timpul infestării care ulterior, limitează creșterea și dezvoltarea lupoaii [252].

Există dovezi pentru *feedback*-ul negativ și pozitiv al semnalizării AS și interrelațiilor între diferite căi de semnalizare, ce complică înțelegerea răspunsului de apărare la plante. Rolul central în răspunsul de apărare este asigurat de proteina NPR1, însă există numeroase rezultate care pun în evidență existența căii de semnalizare independentă de NPR1, ce induce expresia genelor de apărare [121].

AJ este un alt inductor de apărare care promovează rezistența împotriva agenților patogeni [268]. Biosinteza AJ se realizează din deoxigenarea stereospecifică a acidului α -linoleic în poziția C-13 cu ajutorul lipoxigenazei [51]. AJ este implicat în: modularea fluxului de ioni la nivel de plasmalemă, generarea SRO și oxidului nitric, depunerea de caloză, activarea MAP-kinazelor dependente de Ca^{2+} [172]. De asemenea, induce expresia genelor inhibitorilor pentru proteinaze, enzimelor căii sintezei flavanoidelor (calcon sintetaza, PAL, polifenoloxidaza) [281].

O metodă de studiu direcționată pentru identificarea mediatorilor răspunsurilor defensive a fost adoptată pentru compararea expresiei a 11 gene asociate cu rezistența genotipurilor rezistente și sensibile de floarea-soarelui înainte și după conectarea lupoaii la sistemul vascular al gazdei [166]. Aceste rezultate sugerează că genotipul rezistent a manifestat un răspuns mai puternic împotriva *O. cumana* decât cel susceptibil, implicând unele gene marker ale căilor AJ, AS și fenilpropanoidice.

În mod similar, expresia genei *WRKY45* la orezul rezistent cultivat cu semințe de *S. hermonthica* modulează reglarea pozitivă atât a căii AS cât și a căii AJ [198].

Vieira Dos Santos și colab. (2003) au examinat modificările în profilul de expresie a 20 de gene candidat implicate în transducția semnalelor și răspunsul defensiv în cadrul patosistemului *A. thaliana* - *O. ramosa*. Aceste investigații au identificat că majoritatea căilor de semnalizare generale reglate de AJ și etilenă au fost induse într-o manieră tranzitorie chiar înainte de atașarea parazitului la rădăcină. În contrast, nu a fost observat nici un efect asupra expresiei genelor implicate în răspunsurile defensive mediate de AS [287].

În concluzie, se poate afirma că atât în cazul patogenilor din genul *Orobancha*, cât și al speciilor înrudite ca *Striga*, calea de semnalizare a AS și într-o proporție mai mică calea de semnalizare a AJ joacă roluri importante în activarea rezistenței la plantele gazde. În diferite

interacțiuni gazdă - parazit, căile de semnalizare a AS și AJ pot interacționa antagonist sau sinergetic [196].

1.3. Rezistența *post-haustorială* a plantelor de floarea-soarelui infestate cu lupoaie

Odată ce parazitul a stabilit o conexiune vasculară cu gazda prin intermediul haustorului, ar putea părea puțin probabil ca gazda să activeze procese de rezistență deoarece, acesta a străbătut barierele gazdei și este asigurat energetic. Cu toate acestea, mecanismele defensive ale gazdei pot fi în continuare eficiente și la acest stadiu. Astfel, la unele plante se activează mecanisme de rezistență *post-haustoriale* prin inducerea incompatibilități constitutive [269]. Acestea se caracterizează prin creșterea conținutului de fitoalexine și substanțe mucilaginoase în țesutul radicular care ulterior determină ocluzia vaselor xilemului, necroza haustorului și ulterior, moartea tuberculilor de lupoaie [90, 160, 166, 176, 219].

1.3.1. Acumularea de fitoalexine

Fitoalexinele sunt metaboliți secundari cu rol defensiv, ce au masă moleculară mică și aparțin diferitor familii chimice, cum ar fi, fenoli, terpenoide, furanoacetilene, glicoalcaloizi, steroizi, compuși cu conținut de sulf și indoli [29, 138]. Aceștia sunt inhibitori cu spectru larg, care sunt sintetizați doar în urma atacului patogenului și pot cauza leziuni în peretele celular, pot frâna maturizarea sau metabolismul patogenului [317]. În cadrul unui spectru larg de sisteme gazdă-*Orobanchaceae* au fost raportate producerea acestora la diferite etape de infestare, astfel, acumularea fitoalexinelor fiind descrise ca mecanisme *pre-atașament* [217], *post-atașament* [251] și respectiv *post-haustoriale* [181]. Totuși cele mai multe rezultate au raportat activarea acestei căi metabolice după formarea haustoriului. Prima dovadă pentru aceasta este prezența unei acumulări de fitoalexine în vasele conducătoare ale parazitului din cadrul haustoriului detectate datorită culorii lor. Această acumulare corespunde, probabil, oxidării compușilor fenolici, care provoacă de obicei componente maro închise [264]. Fluorescența evaluată în vasele haustoriale ale gazdei și în tuberculi indică faptul că gazda intoxifică parazitul prin eliberarea fitoalexinelor prin conexiunile vasculare cu fluxul de nutrienți. Prezența celulelor parazite moarte în aceste zone ar putea indica faptul că acumularea de metaboliți toxici (fenoli) din planta gazdă ucide parazitul. Sinteza fitoalexinelor reprezintă reacția de răspuns la atacul unui spectru larg de patogeni [20]. Grupul respectiv de compuși sunt sintetizați foarte rapid și în concentrații locale suficiente. Aceasta a fost confirmat pe baza studiului liniilor de floarea-soarelui rezistente și susceptibile la infestarea cu *O. cumana* [166, 297]. Însă secreția de fitoalexine la floarea-soarelui precedă inducția haustorului, adică se demarează în perioada de atașare a apresorului pe

rădăcini și se finalizează după necroza tuberculilor. Conceptul despre rolul fitoalexinelor în sistemul defensiv al plantelor de floarea-soarelui ca răspuns la *Orobanche* a fost adoptat odată cu confirmarea sintezei 7-hidroxil cumarinelor (scopoletina, aiapina) metaboliți din grupul fitoalexinelor doar că în acest studiu sinteza lor a fost descrisă ca mecanism *pre-atașament* și *post-atașament* de rezistență ale plantelor de floarea-soarelui [251]. Cumarinele sunt compuși polifuncționali și pot acționa ca compuși alelochimici atunci când împiedică germinarea semințelor de lupoaie sau pot stopa pătrunderea haustorului și conectarea acestuia la sistemul vascular al plantei. Fenolii se acumulează în apoplast și creează un mediu toxic în jurul punctului de infestare cu lupoaie [90].

Sorgul produce două fitoalexine distincte apigeninidina și luteolinidina care aparțin grupului chimic 3-deoxianantocianidină. Căile lor biosintetice pornesc de la flavona – naringenina conform unei scheme puțin diferite de cea a antocianilor [231]. La porumb, fitoalexinele sunt reprezentate de membrii clasei terpenoide, incluzând zealexinele și kauralexinele a căror biosinteză se cunoaște în întregime [231]. Prezența și excreția fenolilor solubili precum medicarpina și maackiain sunt implicați în mecanismele defensive ale *Medicago truncatula* infestată cu *O. crenata* [176].

Studiul proprietăților biologice ale fitoalexinelor la unele specii de plante este limitat de conținutul scăzut al acestora în țesuturi și de imposibilitatea de a le colecta și extrage în cantități suficiente prin procedee convenționale [139].

1.3.2. Ocluzia vaselor xilemice ale gazdei

Ocluzia vaselor xilemice reprezintă un răspuns comun la diferiți agenții patogeni invadatori, cum ar fi bacteriile, ciupercile și plantele parazite, iar formarea mucilagiilor și tilozilor este asociată în mod tipic cu rezistența împotriva acestora [36, 37, 187]. Acest mecanism se pare că este activat de prezența substanțelor străine (secrețiile parazitare) și a produselor gazdei degradate de către activitatea patogenului (carbohidrații din peretele celular) [96, 220]. Mulți factori pot contribui la ocluzia xilemului, cum ar fi polizaharidele cu greutate moleculară mare și mică, secretate de agenții patogeni în timpul colonizării vaselor conducătoare [306].

Substanțele mucilaginoase sunt probabil produse de celulele parenchimatice vasculare din apropierea vaselor de xilem și se acumulează în spațiul intercelular sau în interiorul vaselor. Componentele principale ale mucilagiilor sunt carbohidrați, în special pectine ne-metil esterificate în care se găsesc și polifenoli, într-o măsură mai mică [160]. Această compoziție conferă proprietăți excelente pentru a acționa ca o barieră. Amestecul poate fi polimerizat cu ajutorul peroxidazelor pentru a forma un gel și mai stabil [68]. Rezultate similare ale nivelului

crescut de peroxidaze și producția de mucilagii au fost relevate la *Pisum sativum* rezistentă la *O. crenata* [222].

La *Vicia sativa* infestată cu *O. crenata*, mucilațiile au blocat vasele conducătoare proprii și au obstrucționat canalul de aprovizionare spre parazit, acesta fiind un răspuns defensiv cantitativ și probabil, se întâlnește și la alte leguminoase. De asemenea, prezența substanțelor străine (adică a secrețiilor parazitare) și a produselor degradate de gazdă (adică carbohidrații din pereții celulari) în interiorul vaselor gazdei pare să acționeze ca răspuns și duce la ocluzia vaselor xilemice și necroza tuberculilor de *Orobancha*. Vasele conducătoare ale rădăcinilor formelor sensibile din interacțiunile compatibile nu conțineau mucilagii, în timp ce la interacțiunea incompatibilă a existat un procent mai mare de celule umplute cu mucilagii nu exact în imediata apropiere de haustor [220].

Ocluzia vaselor xilemice a fost detectată la planta gazdă *Impatiens baslamina* rezistentă la infestarea cu *Cuscuta japonica*. Vasele xilemice ale gazdei au fost blocate prin formarea tilozelor de către celule parenchimatice care le înconjoară [165].

1.3.3. Necroza și moartea tuberculilor

Una dintre cele mai frecvente interacțiuni de incompatibilitate descrise în literatura de specialitate este necroza tuberculilor identificată prin înnegrirea țesuturilor care mor [160, 218, 222]. Studiile histologice au arătat că se stabilesc conexiunile vasculare inițiale și că tuberculii se dezvoltă, dar apoi devin întunecați și parazitul moare într-o etapă de dezvoltare timpurie [160, 218, 315]. În contrast, tuberculii din sistemele compatibile sunt de culoare gălbuie și se dezvoltă mai departe în lăstari subterani și aerieni. Aceasta reprezintă rezultatul manifestării unui sau a mai multor mecanisme descrise anterior, fie determinate de fortificarea pereților celulari, și/sau acumularea de compuși toxici, și/sau ocluzia vaselor de către mucilagii. Toate aceste mecanisme au ca efect secundar necroza și moartea tuberculilor parazitului. Astfel, în urma lignificării pereților celulari de la interfața gazdei *Plantago lanceolata* cu patogenul *Rhinanthus minor*, țesutul patogenului s-a întunecat și ulterior s-a necrotizat [52]. La patosistemul *Vigna unguiculata* - *S. gesnerioides* a fost raportat colorarea țesuturilor corticale în maro și necroza rapidă a parazitului atașat pe rădăcinile rezistente [161].

1.3.4. Formarea sistemelor de incompatibilitate și compatibilitate

Multe plante parazite din familia *Orobanchaceae*, cum ar fi *Striga* spp. și *Orobancha* spp. produc o cantitate mare de semințe mici care pot rămâne în stare de inactivitate în sol de zeci de ani. Paraziții percep semnalele chimice emise de o gazdă din apropiere, care pot întrerupe

această dormanță și stimulează germinația. Întrucât semințele plantelor parazite obligatorii au resurse limitate, percepția factorilor de germinare asigură prezența unei potențiale gazde la o distanță accesibilă. Astfel, natura strigolactonelor exsodate poate fi un criteriu pentru susceptibilitatea sau rezistența culturilor, datorită impactului lor asupra germinării paraziților [309]. Receptorii strigolactonelor sunt α/β -hidrolaze codificate de ortologii *Dwarf 14 (D14)* la diverse plante [125]. La *Arabidopsis*, există o altă secvență care codifică cu α/β -hidrolaze – gena *KARRIKIN INSENSITIVE 2 (KAI2)* (cunoscută și ca *D14-LIKE* sau *HTL (HYPOSENSITIVE TO LIGHT)*). În mod surprinzător, mai multe specii de *Orobanchaceae* codifică un singur omolog *D14*, doar unele specii produc mai mulți omologi *KAI2*, sugerând faptul că acești receptori sunt sintetizați de o familie de gene [66, 270]. În particular, site-ul de legare a strigolactonelor cu omologi *KAI2* la *Orobanchaceae* este structural diferit, ceea ce demonstrează o afinitate variabilă la diferite strigolactone testate [66]. Astfel, se presupune că extinderea omologilor *KAI2* la diferite populații de plante parazitare ar putea permite recunoașterea unui spectru larg de strigolactone și ar conduce la o creștere a spectrului de gazde.

Pentru a invada gazda, plantele parazite trebuie să dezvolte un apresor, care se atașează și pătrunde în rădăcina gazdei transformându-se în haustor [313]. Spre deosebire de oomicete, apresorul plantelor parazite este un organ multicelular. La unele *Orobanchaceae*, acesta are la vârf niște filamente receptoare pentru captarea mai eficientă a gazdei [69]. Odată ce rădăcina gazdei este pătrunsă de patogen, haustorul stabilește o conexiune cu sistemul vascular al gazdei, permițând parazitului să obțină apă cu nutrienți și să moduleze fiziologia gazdei prin secreția unor factori de virulență cum ar fi molecule mici și proteine. În timp ce formarea de haustor poate fi declanșată de stimuli fizici la unele plante parazitare, la majoritatea este nevoie de percepția metaboliților secundari cunoscuți ca factori care induc dezvoltarea haustorului (FIH). Până în prezent, aproape toți factorii FIH, atât cei naturali cât și sintetici identificați la patogenii din familia *Orobanchaceae* sunt derivați fenolici, cum ar fi flavanoide sau chinone [23]. Se știe puțin despre modul în care FIH sunt percepuți de plantele parazite și care este maniera lor de generare. Se presupune ca producția SRO de către țesutul invadator al patogenului transformă precursorii fenolici derivați ai gazdei în FIH, cum ar fi acidul siringic în 2,6- dimetoxi-p-benzochinonă, FIH activ. Unele chinone manifestă capacitate de a declanșa formarea haustorului care corelează cu potențialul redox al gazdei [3].

1.4. Concluzii la capitolul 1

Procesul infecțios al rizopatogenului lupoaia demarează cu germinarea semințelor patogenului, urmată de atașarea la rădăcinile gazdei și formarea patosistemului determinat de

dezvoltarea haustorului. La aceste etape cheie ale invaziei patogenului au fost identificate și descrise trei tipuri de procese defensive: *pre-atașament*, *post-atașament (pre-haustorial)* și *post-haustorial*. Inhibiția germinării *O. cumana* în faza de *pre-atașare* se manifestă prin lipsa sau reducerea conținutului stimulatorilor de germinare și secreția inhibitorilor de dezvoltare. Mecanismele de rezistență *post-atașament* se activează în cortex și endoderm și sunt caracterizate prin impregnarea pereților celulari cu fenilpropanoide, proteine *cross-linking*, glicoproteine bogate în hidroxiprolină. Rezistența poate apărea și după interconectarea cu succes a parazitului la sistemul vascular al gazdei și poate lua o varietate de forme. Blocarea sau sigilarea canalelor conductoare ale gazdei cu substanțe gelatinoase, lignificarea dependentă de peroxidaze, depozitarea mucilagiilor și dezorganizarea haustoriului cauzează necroza și moartea tuberculilor de *Orobancha*. Totalitatea mecanismelor menționate reprezintă reacții de răspuns ale rezistenței nespecifice ce au un caracter general pentru un spectru larg de patogeni. Astfel, studiul mecanismelor defensive la diferite nivele funcționale reprezintă o direcție prioritară în cercetările agro-biologice și permite optimizarea tehnologiei de obținere a plantelor de floarea-soarelui cu rezistență de lungă durată prin transferul de gene de la genotipurile rezistente.

Din aceste considerente, ne-am propus drept **scop al studiului** 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 ale plantelor de floarea-soarelui în Republica Moldova.

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

- Studiul histochimic privind fortificarea pereților celulari ai celulelor rădiculare de floarea-soarelui în cadrul sistemelor de compatibilitate și incompatibilitate cu *O. cumana*
- Evaluarea răspunsului defensiv prin estimarea activității unor enzime (fenilalanin amonolizazei, 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.

2. CONDIȚIILE, OBIECTUL ȘI METODELE DE CERCETARE

Cercetările efectuate în scopul elucidării particularităților histochimice, biochimice și moleculare de rezistență ale plantelor de floarea-soarelui (planta gazdă) față de lupoai (parazit) au fost realizate pe parcursul anilor 2015-2017 în laboratorul Genomică și Proteomică a Centrului de Genetică Funcțională, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”.

2.1. Obiectul de studiu și condițiile de cultivare

Material 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 genotipurilor rezistente au fost notate convențional cu R, iar cele sensibile cu S. Genotipul Favorit R și LC-1093A R conține gena *Or6* care conferă rezistența specifică față de rasa F de lupoai [213, 214], iar genotipurile LG-5542 R și PR64LE20 R sunt rezistente la rasele G și, respectiv, H de lupoai. Genotipul Performer S nu prezintă nici o genă *Or* [213, 232, 233].

Pentru crearea fondalului de infestare artificială au fost utilizate semințele de lupoai colectate din localitatea Sîngera, Republica Moldova din cadrul expedițiilor efectuate în teren pe parcursul verii din anul 2014, care conform rezultatelor obținute aparțin rasei F și manifestă o intensitate de atac înaltă asupra genotipurilor de floarea-soarelui [4, 5].

Suplimentar, pentru identificarea corectă a etapelor cheie ale ciclului vital al lupoaii a fost montată o experiență prealabilă în vederea selectării corecte a etapelor de lucru. În baza acesteia a fost elaborată schema experimentală de cultivare a genotipurilor care a permis de a evidenția reacția de răspuns a plantelor la diferite etape de dezvoltare a patogenului în funcție de mecanismele defensive (*post-atașament* și *post-haustoriale*).

Condiții de cultivare. Infestarea artificială și creșterea plantelor de floarea-soarelui s-a realizat în vase de vegetație de 5 l. Semințele de floarea-soarelui au fost semănate în amestec de sol și nisip în raport de 1/1 pentru a permite ușor curățarea sistemului radicular (a câte trei vase cu cca. 6-10 semințe de floarea-soarelui pentru fiecare variantă de experiență – trei repetiții biologice). Contaminarea uniformă a substratului cu semințe de lupoai neprecon condiționate a fost realizată în raport de 37 mg la 200 g de substrat [321]. Genotipurile cultivate în substrat neinfestat au servit în calitate de martor (Figura 2.1).



Fig. 2.1. Cultivarea plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare în vase de vegetație

Experiențele au fost montate în aer liber pe perioada lunilor mai-iulie, 2015 (temperatura medie 17,7°C – luna mai, 21,5°C – luna iunie și 24,4°C în luna iulie), cu umiditatea solului controlată timp de 67 de zile, plantele ajungând la faza de butonizare.

Prelevarea materialului. Probele de țesut radicular de floarea-soarelui au fost colectate în dinamică pe parcursul a 67 de zile, când plantele prezentau butoni floral, 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). În scopul descrierii mecanismelor de rezistență nespecifice ale plantelor de floarea-soarelui față de lupoai, au fost utilizate metode clasice și moderne de cercetare pentru descrierea răspunsului defensiv la diferite nivele: fenotipic, histo-anatomic, biochimic și molecular (Figura 2.2).

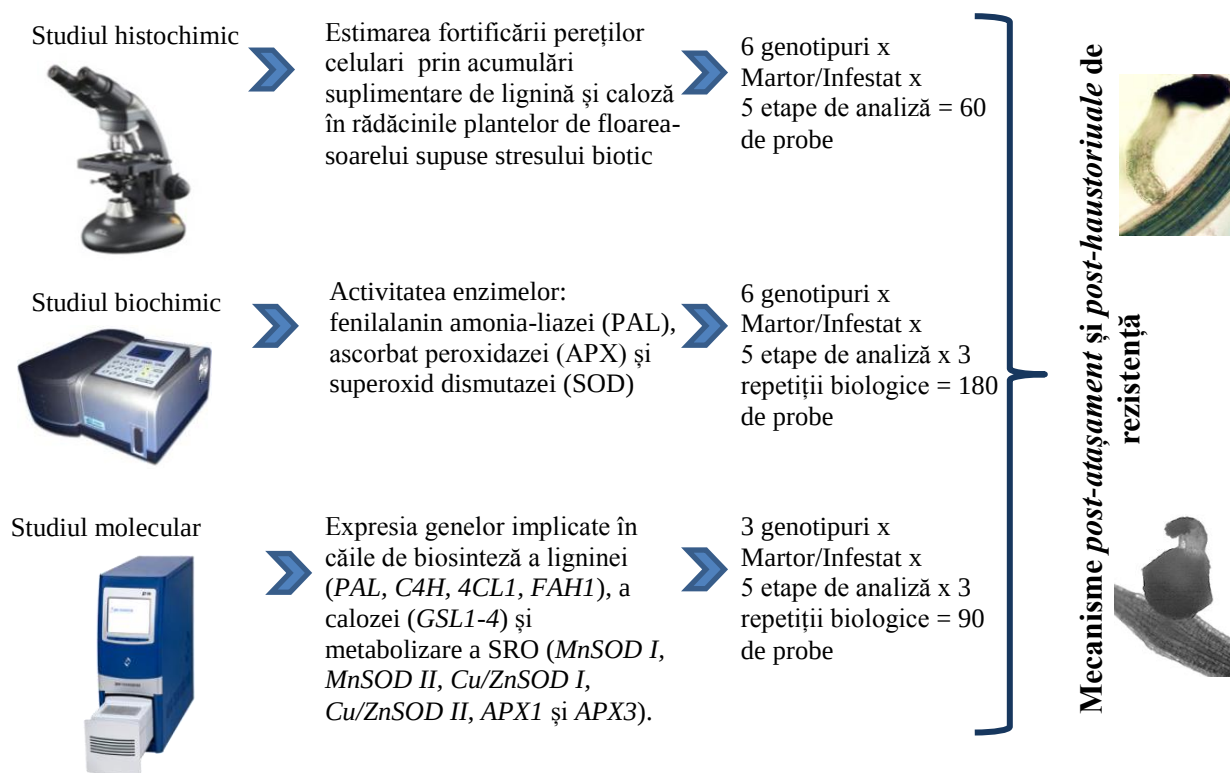


Fig. 2.2. Etapele de realizare a cercetării

Pentru analizele histochimice probele au fost fixate în alcool de 70% [271], iar probele utilizate în analiza expresiei genelor și activității enzimatice au fost congelate în azot lichid.

2.2. Metode histochimice de evidențiere a calozei și ligninei

În scopul evidențierii aspectelor histochimice de rezistență ale plantelor de floarea-soarelui la lupoaie au fost fixate 60 de probe radiculare în alcool etilic 70% (câte o plantă pentru fiecare combinație experimentală). Secțiunile transversale au fost realizate din rădăcini primare la primele 2 etape și din rădăcini laterale la etapele ulterioare. Pregătirea preparatelor microscopice s-a realizat prin secționarea cu ajutorul unei lame a materialului vegetal inclus în măduva de soc, efectuându-se secțiuni deasupra unei cutii Petrii. Secțiunile au fost transferate cu ajutorul unei pensule în vase cu colorant și lăsate pentru fixarea cu grupele funcționale ale ligninei și calozei. Identificarea histochimică a ligninei s-a realizat cu soluție de Safranină-O de 0,1% timp de 1 min [282], iar a calozei – cu soluție de Aniline Blue 0,005% timp de 1 h [47]. În continuare, secțiunile au fost transferate pe lame cu o picătură de glicerină diluată (1:3) și acoperite cu lamele. Pereții lignificați s-au colorat în roșu și cei cu caloză – în albastru. Preparatele microscopice obținute au fost supuse foto-documentării la microscopul fonic (XSZ-206T, Ningbo Wason Optical Instrument Co.,Ltd) dotat cu camera CCD (MEM1300, Future Optics Sci. & Tech. Co., Ltd) conectat la calculator. Pozele secțiunilor transversale au fost realizate la capacitatea de mărire x 160 de ori.

2.3. Metode de studiere a activității enzimatice

Analiza spectrofotometrică a fost realizată în trei repetiții tehnice a probelor radiculare colectate în dinamică pe parcursul dezvoltării patogenului. Activitatea enzimelor studiate (SOD, APX și PAL) a fost exprimată în unități de densitate optică raportată la conținutul de proteine ($\Delta E/mg$ proteină). Conținutul proteic a fost determinat prin metoda Bradford [49].

Activitatea enzimatică a fost determinată spectrofotometric pentru 180 probe de material vegetal congelat (rădăcini de floarea-soarelui) și păstrat la $-80^{\circ}C$, obținut de la trei repetiții biologice pentru fiecare enzimă în parte.

Extragerea enzimelor SOD și APX. Extractul proteic a fost obținut după metodă optimizată pentru o extragere mai eficientă a proteinelor din rădăcini cu ajutorul soluției tampon fosfat, 0,1 M, pH 7,8, 0,5 mM EDTA. Supernatantul obținut după centrifugare a fost utilizat pentru evaluarea activității enzimelor antioxidante [238].

Pentru determinarea *activității enzimatice a grupului SOD* la 50 μl extract enzimatic s-a adăugat câte 750 μl tampon fosfat 0,1 M, pH 7,5 ce conține 0,5 mM EDTA, 50 μl NBT de 2,25

mM, 100 μ l metionină de 200 mM, 50 μ l riboflavină de 60 mM. După agitarea amestecului probele s-au plasat la distanța de 20 cm de sursa de iluminare (lămpi de zi) și s-au incubat în decurs de 15 min la temperatura camerei 20°C. Principiul metodei se bazează pe capacitatea SOD de a inhiba reducerea de către radicalii superoxid a sării NBT. Reacția s-a stopat prin adăugarea a câte 1 ml soluție de acid acetic de 33,3% la fiecare probă prin agitare. În proba control nu s-a adăugat enzimă, iar proba de referință conține toți componenții și a fost plasată la întuneric [2, 207]. După incubare a fost determinată densitatea optică a probelor la lungimea de undă de 560 nm. S-au utilizat cuve cu volumul de 1,5 ml. Colorația este stabilă în timp de 60 min.

Ecuția reacției catalizată de enzimele SOD cuprinde: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Activitatea SOD s-a calculat după formulele (2.1) [300]:

$$\% \text{ inhibiție} = [(D_{\text{control}} - D_{\text{probă}}) \div D_{\text{control}}] \times 100\%; \quad (2.1)$$

Activitatea enzimatică SOD (U/mg proteină) = % inhibiție/(50×C)

unde: D – densitatea optică

C – concentrația proteinei (mg/ml)

Pentru determinarea **activității APX** a fost utilizat 100 μ l de extract proteic la care s-a adăugat 600 μ l soluție de tampon fosfat de 50 mM și pH 7, 100 μ l EDTA de 1 mM, 100 μ l ascorbat de 5 mM și câte 100 μ l peroxid de hidrogen de 3% direct înainte de măsurarea densității optice. Activitatea se măsoară la timpul 0 și peste 60 sec la lungimea de undă 290 nm. La proba de referință în loc de enzimă se adaugă soluție tampon.

Ecuția reacției catalizată de enzimele APX este: L-ascorbat + $H_2O_2 \rightarrow$ dehidroascorbat + H_2O

Activitatea a fost calculată după formula (2.2) [323]:

$$\text{Activitatea APX (U/mg proteină)} = [(\Delta D \div T) \times E] \div (L \times C) \quad (2.2)$$

unde: ΔD – densitatea optică

E – diluția finală a extractului enzimatic

T – timpul reacției (sec)

L – grosimea cuvei (cm)

C – concentrația proteinei (mg/ml)

Activitatea enzimei PAL. Extractul enzimatic pentru enzima PAL a fost obținut cu ajutorul soluției tampon borat, 0,1 M, pH 8,8. Mediul de reacție pentru estimarea activității a inclus 0,2 ml extract enzimatic și 0,8 ml substrat, care reprezintă soluție tampon borat 0,1 M cu

12 mM L-difenilamină și pH 8,8. La proba de referință în loc de substrat s-a adăugat 0,8 ml apă distilată. Ulterior, probele au fost expuse la incubare timp de 16 ore la temperatura +37° C. După incubare, a fost determinată densitatea optică a probelor la lungimea de undă de 290 nm în cuve cu volumul de 1,5 ml.

Ecuția reacției catalizată de PAL este: L-fenil-alanină → acid *trans*-cinamic + NH₃

Activitatea PAL a fost calculată după formula (2.3) [168]:

$$\text{Activitatea PAL (U/mg proteină)} = (\Delta D_{290} \times V_T) \div (C \times V_S \times 0,01 \times T) \quad (2.3)$$

unde: D – densitatea optică

C – concentrația proteinei (mg/ml)

T – timpul reacției (min)

V_T – volumul total al reacției (ml)

V_S – volumul extractului enzimatic (ml)

2.4. Analiza expresiei genelor potențial implicate în mecanismele de rezistență

Expresia unor gene implicate în răspunsul defensiv ale plantelor de floarea-soarelui la atacul lupoaiei în dinamică, a fost realizată pe eșantioane de ARN total care au servit ca matriță pentru sinteza ADNc.

La prima etapă s-a realizat extragerea ARN-ului cu TRI-reagent conform protocolului (*Ambion, Applied Biosystems*) din 90 de probe de material radicular congelat cu azot lichid și păstrat la -80°C.

Calitatea și puritatea probelor de ARN extras a fost verificată prin electroforeză în gel de agaroză de 1% și măsurare spectrofotometrică la lungimea de undă 260 și 280 nm. În probele extrase sunt evidente benzile 28s și 18s, iar raportul valorilor densității optice 260/280 nm se include în intervalul $2,0 \pm 0,2$ fapt care demonstrează calitatea înaltă a ARN-ului (Figura 2.3).

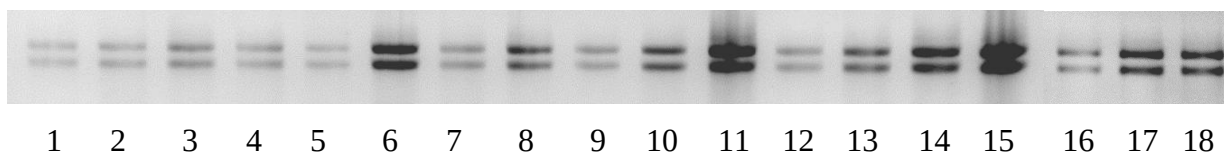


Fig. 2.3. Electroforeza ARN-ului extras din rădăcinile de floarea-soarelui la etapa de 53 de zile în gel de agaroză de 1%

1-3 *Favorit supus infestării*; 4-6 *Favorit martor*; 7-9 *PR64LE20 supus infestării*; 10-12 *PR64LE20 martor*; 13-15 *Performer infestat*; 16-18 *Performer martor*.

Următoarea etapă a inclus înlăturarea urmelor de contaminare cu ADN genomic a probelor de ARN (1μg/μl) prin tratarea cu ADN-ază (#EN0521, Thermo Scientific) timp de 30 min la 37°C. ARN-ul tratat a fost utilizat în sinteza primei catene de ADNc complementar

folosind RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher, #EP0441). Alinierea primerilor Oligo(dT)18 (Thermo Fisher, #SO132) și Random Hexamer (Fermentas, #SO142) s-a efectuat timp de 5 min la 65°C.

În continuare probele de ADNc au fost utilizate pentru expresia genelor prin PCR cantitativ în timp real la amplificatorul cu detecția automată a fluorescenței DT-96 (*DNA technology, Rusia*). Ampliconii PCR au fost sintetizați din ADNc utilizând Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher, #K0223).

Design-ul primerilor utilizați pentru cuantificarea expresiei genelor de interes (Tabelul 2.1) a fost elaborat în baza secvențelor transcripturilor cercetați sau secvențelor expresate marcate (EST-uri) similare cu genele omoloage la alte specii de plante stocate în baza de date al Centrului Național pentru Informații Biotehnologice (NCBI) [327]. Pentru elaborarea primerilor a fost utilizat programul Primer3Web v. 3.0.0. [328], iar verificarea acestora privind prezența structurilor secundare s-a efectuat prin OligoAnalyzer 3.1 [326].

Tabelul 2.1. Caracteristica primerilor utilizați în studiu

Număr de acces (NCBI)	Simbolul genei	Primer F	Primer R	Lung. ampl., pb
Y12461.1	<i>PAL</i>	ggcggattcttcgagttaca	aaaatcgcggaacaacttc	125
DY924688.1	<i>4CL1</i>	cgcaatcggttcattgtgca	ctcatcgccggaagtaact	122
DY919063.1	<i>C4H</i>	cggagggtgtggtgattagg	gccattcaacgccttcaact	128
DY919458.1	<i>FAH1</i>	accctctatccccggttacc	tggcgaacacgttgaccata	102
DQ837211.1	<i>GSL1</i>	acagggaaaaagaccaggaagt	ggactgcttctccacgagta	116
DQ837212.1	<i>GSL2</i>	cgtggtctcatgccaacagt	cctcaacctcgtaatgaagc	122
DQ837213.1	<i>GSL3</i>	gtgaccatagagaccaaagttgt	cccacccttgaccagaacag	149
DQ837214.1	<i>GSL4</i>	tgagggtgaggagcctagca	cccgtctcagaagcattgga	105
DQ812552.2	<i>Mn-SOD I</i>	ataaggaaagcccgaatttg	ttgcgattacaacggtgaa	107
DQ812551.2	<i>Mn-SOD II</i>	tgtgggtctgcaataagtcaa	acaagcaaaagcaacaacca	134
AJ786258.1	<i>CuZn-SOD I</i>	cctaattgctgtggttggaagag	agtggagaggctaagttcgtga	87
AJ786257.1	<i>CuZn-SOD II</i>	cactaattggagggtcaatccatc	caatgataccacatgaactcttc	135
BU032190.1	<i>APX3</i>	cccaaagtctaccaaaggtg	atgtgctcttccaagggtgt	112
CD849992.1	<i>APX1</i>	ccttatgcctcagcaaattcc	ctgacgaggatgctttcttt	79

Amplificarea s-a realizat în volum de 15 µl, prin programul automat de amplificare cu următorul regim: 95°C – 10 min; 5 cicluri la 95°C – 15 s, 64°C – 20 s; 40 cicluri 95°C – 15 s, 60°C – 40 s. Detectarea fluorescenței s-a realizat în decursul elongării. Lipsa amplificării produselor nespecifice și formării primerilor dimerizați a fost confirmată prin electroforeză în gel de 1,4% agaroză (Figura 2.4) și analiza curbelor de topire. Pentru fiecare probă de ARN reacția a fost montată în două repetări analitice.

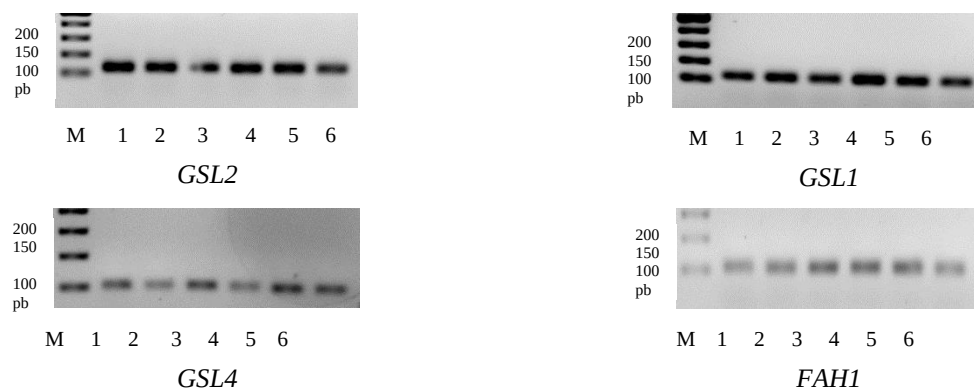


Fig. 2.4. Electroforeza în gel de agaroză 1,4% a produșilor de amplificare RT-PCR la floarea-soarelui la 18 zile

1 – Favorit R cultivat pe fondal de infestare; 2 – Favorit R martor 3 – PR64LE20 R cultivat pe fondal de infestare; 4 – PR64LE20 R martor; 5 – Performer S infestat; 6 – Performer S martor; M – Marker molecular

Obținerea ampliconului specific validează eficiența primerilor elaborați și confirmă expresia genei respective în probele analizate (Figura 2.4) prin mărimea ampliconului specific.

În calitate de genă de referință s-a utilizat *actina* (numărul de acces în baza de date NCBI: AF282624.1). Expresia relativă a genelor față de actină a fost calculată prin metoda ΔCT și $\Delta\Delta CT$ (2.4) [171]:

$$2^{-\Delta Ct}, \text{ unde } \Delta Ct = Ct_{\text{gena}} - Ct_{\text{actina}}. \quad (2.4)$$

Rezultatele au fost exprimate în unități convenționale (un. c.) - valorile probelor martor și *fold change* – raport de modificare a expresiei experienței la martor (Exp./martor) [210]. Pentru clasificarea și caracteristica modificării expresiei genelor în condiții de stres biotic față de martor (Tabelul 2.2), s-a utilizat modelul propus de Xu și colab. [305]. Acest model este aplicat pentru a defini nivelul general de supraexpresie, subexpresie sau lipsa unor schimbări privind activitatea transcripțională a genelor de interes [60].

Tabelul 2.2. Clasificarea genelor în funcție de activitatea transcripțională [94]

Supraexpresie ($I > M$)		Subexpresie ($I < M$)		Fără schimbări ($I = M$)
+1 (1,5-5,0 ori)	Slabă	-1 (1,5-5,0 ori)	Slabă	<1,5 ori
+2 (5,1-10,0 ori)	Moderată	-2 (5,1-10,0 ori)	Moderată	
+3 (10,1-20,0 ori)	Puternică	-3 (10,1-20,0 ori)	Puternică	
+4 (>20,1 ori)	Foarte puternică	-4 (>20,1 ori)	Foarte puternică	

I – infestat sau cultivat pe fondal de infestare; *M* – martor

2.5. Metode statistice de prelucrare a datelor

Datele obținute în cadrul cercetărilor au fost supuse prelucrării statistice [319] prin calcularea următorilor parametri: media aritmetică - $\bar{x}$, deviația standard - S , coeficientul de variație – CV . Diferențele în parametrii studiați au fost remarcate cu ajutorul testului t , iar rezultatele care au determinat valoarea $p < 0,05$ au fost considerate semnificative.

2.6. Concluzii la capitolul 2

În calitate de obiect de cercetare au servit șase genotipuri de floarea-soarelui cu potențialul fenotipic diferit de rezistență față de lupoaie caracterizat anterior. Analiza mecanismelor *post-atașament* și *post-haustoriale* a fost asigurată prin montarea unui model experimental de cultivare și colectare a materialului biologic în dinamică. Pentru descrierea mecanismelor de rezistență nespecifice ale plantelor de floarea-soarelui la lupoaie, au fost utilizate metode clasice și moderne de cercetare: spectrofotometria, electroforeza în gel de agaroză, PCR-ul și metode de colorare histochimică (Figura 2.2). Potențialul de rezistență la lupoaie a genotipurilor investigate a fost estimat prin corelarea rezultatelor la diferite nivele: fenotipic, histochimic, biochimic și molecular.

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

Protecția naturală a plantelor împotriva agenților infecțioși este bazată pe o varietate de mecanisme și interacțiuni. 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 ajutorul diferitor mecanisme: genetice, biochimice, fiziologice, morfo-anatomice ce sporesc capacitatea gazdei de a supraviețui, a se autoreproduce și dezvoltă în condiții variabile de mediu.

Studiile genetice sugerează că rezistența la lupoaie a plantelor de floarea-soarelui este determinată de mecanisme poligenice cantitative și calitative [158, 226]. În primul rând au fost descrise mecanisme specifice (rezistență verticală de natură calitativă) de rezistență ale plantelor de floarea-soarelui la lupoaie, determinate de genele specifice *Or*, identificate pentru prima dată de Vrânceanu (1980) [293]. Însă acestea nu sunt absolut eficiente datorită faptului că patogenul *O. cumana* evoluează și apar rase noi tot mai agresive. În cadrul acestui patosistem a fost descrisă de asemenea rezistența de natură cantitativă (orizontală) care reprezintă activarea mecanismelor defensive nespecifice ce au caracter general pentru un grup larg de factori stresogeni [175].

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

Rezistența plantelor de floarea-soarelui față de holoparazitul angiosperm lupoaia implică mecanisme de apărare complexe și multifactoriale. Reacția de răspuns a plantelor este determinată de stadiul ontogenetic, modul de acțiune „ales de agresor”, intensitatea și durata atacului și nu în ultimul rând de condițiile mediului înconjurător [190]. Aspectul morfo-fenotipic al genotipurilor de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare cu *O. cumana* reprezintă ultima configurație a reacției de răspuns complex, capacitatea de adaptare și menținerea echilibrului intern.

În funcție de dezvoltarea patogenului au fost puse în evidență trei tipuri de procese defensive: *pre-atașament*, *post-atașament* (sau *pre-haustoriale*) și *post-haustorial* [175]. Astfel, în baza scopului propus de a estima modificările fiziologice și moleculare ale plantelor de floarea-soarelui în urma infestării artificiale cu lupoaie a fost montată experiența care permite de a evidenția reacția de răspuns a plantelor la diferite etape de dezvoltare a patogenului.

Mecanismele defensive de *pre-atașament* se activează în endodermul sau în cortexul potențialei plante gazdă pentru a evita sau a preveni atașarea parazitului prin absența sau sinteza redusă a stimulatoarelor de germinare și/sau sinteza inhibitorilor de germinație [99]. În baza unor studii anterioare s-a demonstrat un nivel destul de înalt de afinitate a populației de lupoaii colectate din regiunea centrală a Republicii Moldova cu grad sporit de stimulate a germinației cu exsudatele obținute din genotipurile sensibile de floarea-soarelui [82], care a fost folosită în investigațiile din lucrarea dată pentru infestarea artificială a culturii de floarea-soarelui.

3.1.1. Dinamica formării patosistemului floarea-soarelui – lupoaii

Ciclul vital al *Orobanche cumana* cuprinde o serie de etape ontogenetice bine definite spațial și temporar și 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 [95].

La prima etapă de cercetare s-a montat o experiență prealabilă pentru a monitoriza aspectele fenotipice ale creșterii plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare și evoluția dezvoltării lupoaii în scopul determinării etapelor cheie de interacțiune gazdă-patogen la care se pot activa mecanismele defensive.

Rezultatele cercetărilor experimentale efectuate, demonstrează un nivel înalt de *afinitate* a lupoaii colectată din localitatea Sîngera, față de genotipul Performer S. Astfel, analiza dezvoltării ontogenetice gazdă – parazit, realizată în decursul a 67 de zile, cu evaluarea periodică a permis evidențierea mai multor stadii de dezvoltare a *O. cumana*. Astfel, ciclul vital al parazitul cuprinde cinci etape dependente în totalitate de gazdă: [86, 175].

Pentru germinarea semințelor de lupoaii diseminate în sol a fost nevoie de o perioadă de condiționare de 1-2 săptămâni la temperatura 15-20°C pentru a deveni îmbibate. Pe parcursul acestei faze ontogenetice, în semințe se activează căile metabolice și procese importante cum ar fi respirația și sinteza ADN-ului, proteinelor și hormonilor [141]. După procesul de condiționare a germinației, semințele patogenului recunosc stimulii chimici din rizosferă, exsudați de rădăcinile gazdei [99]. Cercetările realizate pe embrionii speciilor din genul *Orobanche* au evidențiat că numai semințele care sunt aproape de rădăcinile plantei gazdă (aproximativ 5 mm) vor germina [320]. Germinarea s-a inițiat cu lărgirea zonei micropile a seminței, care a fost urmată de emergența unui filament subțire, incolor, apexul căruia este format din celule meristematice active (Figura 3.1 A, B). Odată ce trece de tegumentul seminței, acest filament s-a elongat prin dividere și extindere celulară. Tubul germinal a atins lungimea de 1-5 mm și diametrul de 0,15 mm. Din acest motiv, doar semințele de *O. cumana* aflate în imediata

vecinătatea de rădăcinile plantei-gazdă s-au atașat și pot induce dezvoltarea parazitului [230]. Ca rezultat al acestui proces se formează primordiul haustorului care aderă la rădăcina plantei de floarea-soarelui cu ajutorul unei substanțe organice lipicioase, secretată de celulele zonei apicale ale tubului germinativ. Penetrarea țesuturilor este realizată prin mecanisme enzimatice care determină separarea celulelor-gazdă (Figura 3.1 C, D) [90]. Dezvoltarea ulterioară a plantulei a depins de contactul înființat cu rădăcina plantei gazdă.

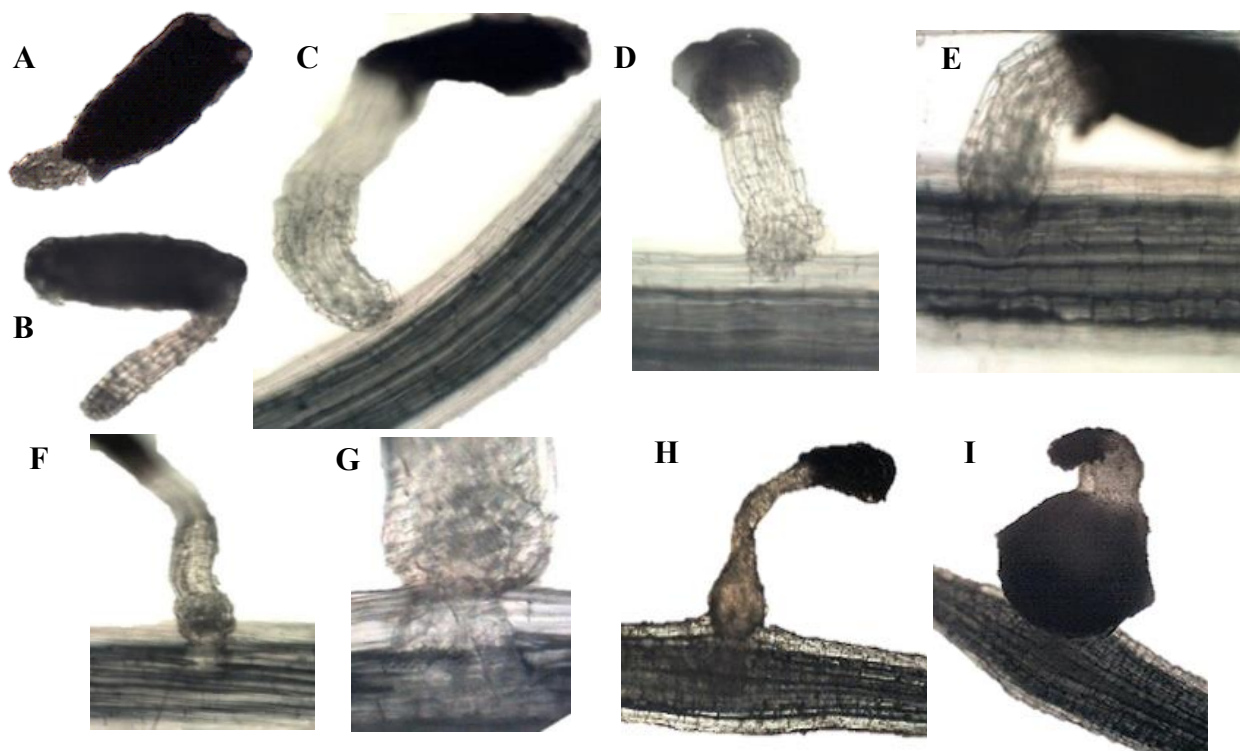


Fig. 3.1. Dezvoltarea *O. cumana* pe rădăcinile genotipului Performer S (× 100 ori)

A – germinarea seminței de lupoaie ; B – formarea filamentului germinal (apresor); C, D – penetrarea cortexului rădăcinii gazdei; E, F, G – penetrarea cilindrului central al rădăcinilor de floarea-soarelui de către parazit; H, I – dezvoltarea tuberculului de lupoaie.

Apresorii atașați au înaintat în scoarța rădăcinilor realizând contactul cu sistemul fasciculelor conducătoare ale gazdei printr-o structură specializată, cunoscută drept haustor, care reprezintă joncțiunea între gazdă și parazit (Figura 3.1 E, F, G) [261]. Activitatea pectolitică a celulelor intruzive ale parazitului este realizată de pectin-metil esteraze și eventual poligalacturonaze, care determină degradarea completă a pectinelor peretelui celular, permițând separarea celulelor și penetrarea netedă a celulelor intruzive [174]. La exterior atașamentele s-au dezvoltat și s-au îngroșat luând forma unui bulb de culoare galbenă – tuberculi, inițial formați din celule parenchimatice (Figura 3.1 H, I). Vasele conducătoare ale parazitului se ramifică foarte repede în cadrul întregului țesut al tuberculului. Odată ce această structură a stabilit

conexiuni vasculare cu planta gazdă [197], are loc realizarea unui contact intim între gazdă și parazit, ce continuă ulterior cu schimbul de apă și substanțe nutritive, hormoni, toxine.

Atunci când tuberculii au atins o anumită dimensiune (0,7 mm în diametru), se inițiază formarea zonei meristematice inițiale ale apexului și rădăcinilor adventive. Mugurii s-au alungit (lăstari subterani) și străbat solul ieșind la suprafață, formând tulpina floriferă a parazitului – lăstari aeriени de culoarea violet-albăstrui, determinată în principal de acumularea antocianilor, care sunt mult mai vizibili, din cauza lipsei pigmentilor clorofilieni [143].

Fazele subterane de dezvoltare a parazitului durează de la 30 până la 100 de zile, în funcție de condițiile climaterice. În acest răstimp gazda este epuizată, fără ca planta parazită să poată fi văzută. Ciclul de viață al rizoparazitului *O. cumana* din momentul atașării filamentului germinal la scoarța rădăcinii plantei-gazdă, până la maturizarea semințelor cuprinde un interval de 3-5 luni [143]. Ulterior, s-a constatat că formarea primelor atașamente s-a realizat după 18 și 21 de zile; dezvoltarea tuberculilor la 35 de zile; formarea lăstarilor subterani și a celor aeriени peste 53 și respectiv 67 de zile. În acest context colectarea probelor a fost realizată în dinamică în funcție de ciclul vital al patogenului în decursul a 67 de zile, când floarea-soarelui prezintă butoni florali. Numărul de zile la care au fost observate aceste faze, era diferit de cele stabilite în studiile anterioare privind ontogeneza parazitului [9], fiind influențată de condițiile climaterice, genotipurile cultivate și populația de lupoaie.

3.1.2. Modificările fenotipice ale dezvoltării plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare

Genotipurile de floarea-soarelui au fost cultivate în vase de vegetație pe sol infestat cu semințe de lupoaie. Colectarea probelor s-a realizat în funcție de etapele de dezvoltare a patogenului care determină diferite reacții de apărare a plantei gazdă.

Plantele martor (atât genotipurile rezistente cât și cele sensibile) cultivate în sol neinfestat au prezentat dezvoltare normală începând cu prima etapă de colectare (18 zile) și finalizând cu ultima etapă (67 de zile).

Cultivarea hibrizilor de floarea-soarelui pe substrat infestat artificial cu semințe de *O. cumana* a prezentat un tablou fenotipic așteptat la formele rezistente și cele sensibile.

Hibrizii rezistenți nu au prezentat semne fenotipice de infestare prin absența tuberculilor și lăstarilor fixați pe rădăcinile de floarea-soarelui cultivată pe sol cu semințe de lupoaie și devieri majore ale dimensiunilor liniare (Tabelul 3.1, Anexa 1). Astfel, se poate presupune că aceste genotipuri au format sisteme incompatibile cu lupoaia și își pot activa doar două tipuri de

mecanisme: *pre-ataşament* şi cele *post-ataşament* cu o posibilitate redusă. Cele *post-haustoriale* nu pot fi atribuite, deoarece nu s-au dezvoltat patogeni pe rădăcinile plantelor.

Totuşi cultivarea acestora pe fondal de infestare a determinat devieri ale dimensiunilor liniare, ceea ce denotă o influenţă negativă a cultivării plantelor de floarea-soarelui în sol contaminat cu seminţe de lupoaie, chiar şi a hibrizilor rezistenţi (Tabelul 3.1).

Astfel, diminuarea masei vegetale ale plantelor atacate determină reducerea productivităţii culturii. Unele plante pot fi afectate de patogen, ceea ce induce una sau mai multe disfuncţii metabolice. Dacă factorul stresogen este pe termen scurt şi moderat, prejudiciul poate fi temporar şi planta se poate recupera când patogenul este eliminat. În cazul în care parazitul are o acţiune suficient de severă, acesta poate afecta înflorirea, formarea seminţelor, induce senescenţa, care ulterior conduce la moartea plantei gazdă. Astfel de plante sunt considerate a fi sensibile.

Tabel 3.1. Înălţimea plantelor la faza de butonizare după 67 de zile de cultivare

Genotipul	Înălţimea plantelor, $\bar{x}(cm) \pm S$		Diferenţa procentuală
	cultivate pe substrat neinfestat	cultivate pe substrat infestat	
Favorit R	50,788±3,645	41,900±3,575	17,5
LC-1093A R	38,513±3,984	31,473±3,487	18,3
PR64LE20 R	44,364±3,861	40,179±4,388	9,4
LG-5542 R	44,885±7,042	38,100±3,526	15,1
Performer S	56,292±5,891	32,593±3,941	42,1
LG-5525 S	40,364±7,325	23,682±4,802	41,3

Genotipurile Performer S şi LG-5525 S, cultivate pe fondal de infestare au manifestat un atac intens de către parazit, la toate etapele de dezvoltare ale acestuia, prin formarea tuberculilor şi lăstarilor de lupoaie pe rădăcinile plantelor gazdă (Anexa 2).

Patogenul se hrăneşte pe contul gazdei în urma formării patosistemului *lupoaie* – genotip sensibil (sistem de compatibilitate gazdă – patogen), care ulterior, se răsfrânge asupra parametrilor cantitativi, determinând reducerea cu aproximativ 40% a dimensiunilor liniare ale plantei (Tabelul 3.1, Anexa 2).

Diferenţe similare au fost relevate în studii anterioare, astfel stagnarea maximă în creşterea tulpinii sub influenţa infestării cu lupoaie a cuprins valoarea de 36% [9].

3.2. Fortificarea pereţilor celulari la floarea-soarelui

Un rol semnificativ în mecanismele de apărare la nivel *post-ataşament* şi *post-haustoriale* revine barierelor fizice determinate de acumularea compuţilor fenilpropanoidici, ligninele având o pondere esenţială. În lipsa unor conexiuni viabile, fără acces la apă şi nutrienţi, supravieţuirea

rizoparazitului este periclitată, survenind necroza tuberculilor prin lignificarea pereților celulari dependentă de peroxidaze, încapsularea pe suprafața parenchimului cortical, depozitarea carbohidraților, dezorganizarea haustorului etc. [160, 220, 221].

Lignina este un polimer aromatic complex din pereții secundari ai celulelor vegetale, care conferă rigiditate țesuturilor realizând astfel, funcția de apărare împotriva agenților patogeni [175]. Lignificarea pereților celulari s-a evidențiat la plantele de năut, bob, mazăre, mazărice, rapița, morcov, floarea-soarelui ale căror rădăcini nu au fost penetrate de către speciile *Orobanch* (*O. crenata*, *O. aegyptiaca*, *O. cumana*, *O. ramosa*) [119, 160, 220, 222]. Gayoso și colab., (2010) au stabilit acumularea și polimerizarea apoplastică a ligninelor în rezultatul intensificării metabolismului fenilpropanoidelor sub acțiunea stresului biotic [116].

Totodată, un 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. cernua* și *O. cumana* [90, 251].

Caloza este polimerul (1,3) - β -glucanului cu unele ramificări în pozițiile β -1,6 [62]. Prezentă în toate algele verzi multicelulare și în plantele superioare este una dintre cele mai dinamice poliglucide ale peretelui celular. Conținutul și distribuția calozei variază temporal și spațial în funcție de etapele ontogenezei și acțiunea factorilor biotici și abiotici, îndeplinind funcția de barieră fizică pentru diverse leziuni și restaurarea integrității celulelor plantei-gazdă [93, 108].

3.2.1. Determinarea acumulării ligninei în țesutul radicular de floarea-soarelui

Cu toate că fortificarea pereților celulari reprezintă un mecanism de rezistență *post-atașament*, nivelul de acumulare a ligninei a subliniat caracteristici specifice și comune în funcție de natura genetică a genotipurilor în momentul co-cultivării plantelor de floarea-soarelui cu lupoaie și activării mecanismelor histologice de rezistență.

Examenul histochimic și analiza comparativă ale secțiunilor transversale la șase genotipuri cultivate în condiții lipsite de infestare nu au indicat diferențe în nivelul de acumulare a ligninei și nici ale aspectelor morfo-anatomice atât la genotipurile rezistente cât și la cele sensibile pe toată perioada de studiu (Figura 3.2). Conținutul de lignină și grosimea pereților celulari evaluată în dinamică la șase genotipuri de floarea-soarelui a prezentat reducerea nesemnificativă ale acestora la etapele de 53 și 67 de zile, ce ar corespunde cu solicitarea compusului dat în formarea masei vegetative.

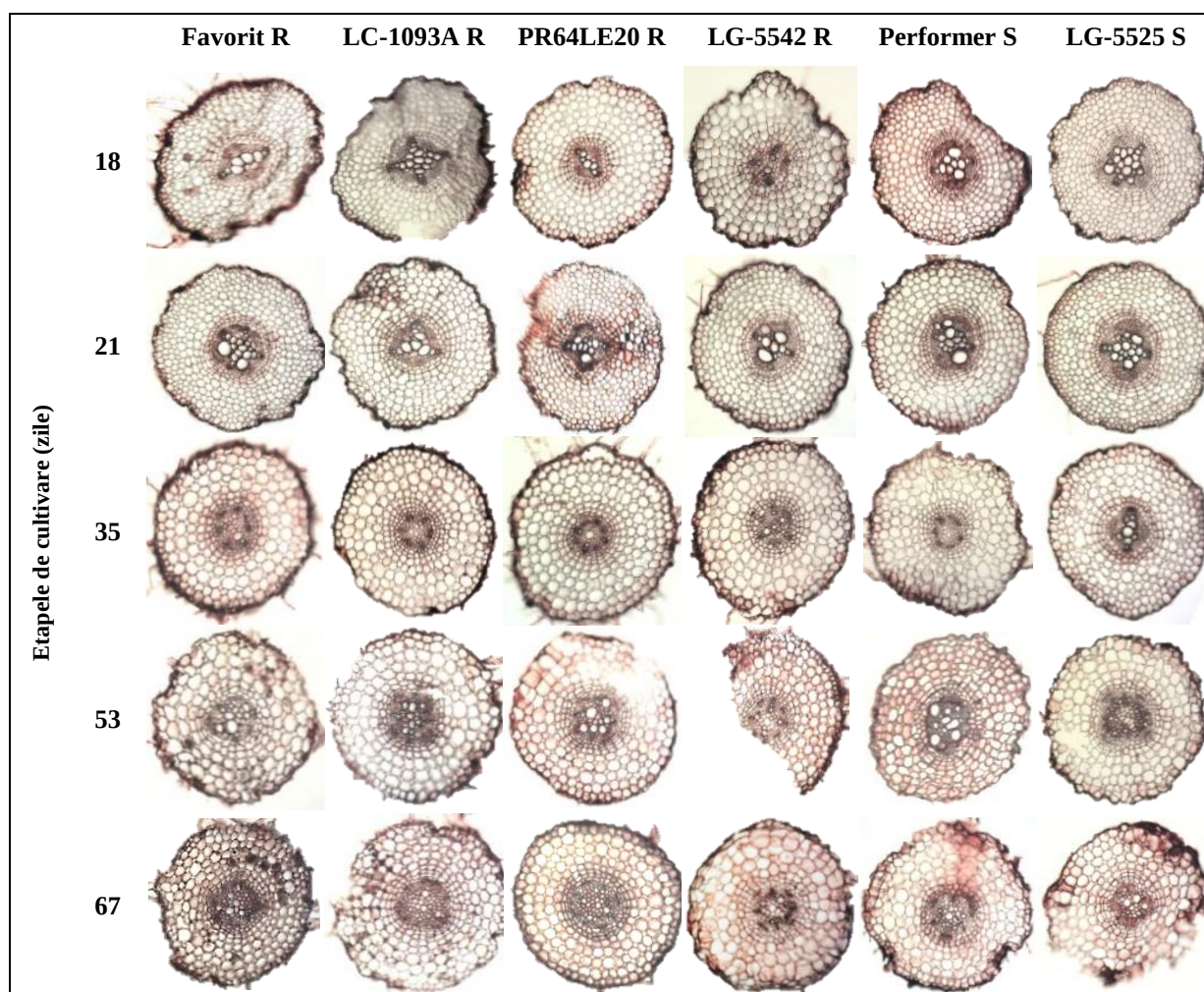


Fig. 3.2. Identificarea histochimică a ligninei ($\times 160$ de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în sol neinfestat

Analiza histochimică a secțiunilor transversale din rădăcinile de floarea-soarelui supuse infestării artificiale indică anumite particularități specifice în corelație cu rezistența plantei-gazdă la rizopatogen. Examenul histochimic și anatomic al secțiunilor transversale la combinația incompatibilă a hibridului Favorit R – *O. cumana* a permis identificarea a trei diferențe dintre plantele cultivate pe fondal de infestare și martor, începând cu etapa de 35 de zile. Astfel, s-a atestat acumularea suplimentară a ligninei în pereții vaselor conducătoare (Figura 3.3). O altă modificare a fost observată la nivel morfo-anatomic spre fazele de cultivare mai târzii (53 și 67 de zile) ce s-a caracterizat prin îngustarea vaselor conducătoare în opoziție cu dilatarea cilindrului central la formele supuse stresului biotic (Figura 3.3).

Studiul histochimic al țesutului radicular la genotipul LC-1093A R a permis identificarea unor diferențe ale conținutului de lignină dintre forma cultivată pe fondal de infestare și martor. Astfel, la etapa de 53-67 de zile de la co-cultivare cu semințe de lupoaie, în pereții celulari ai

cilindrului central și al epidermei a fost detectată acumularea suplimentară a acestui polimer (Figura 3.3).

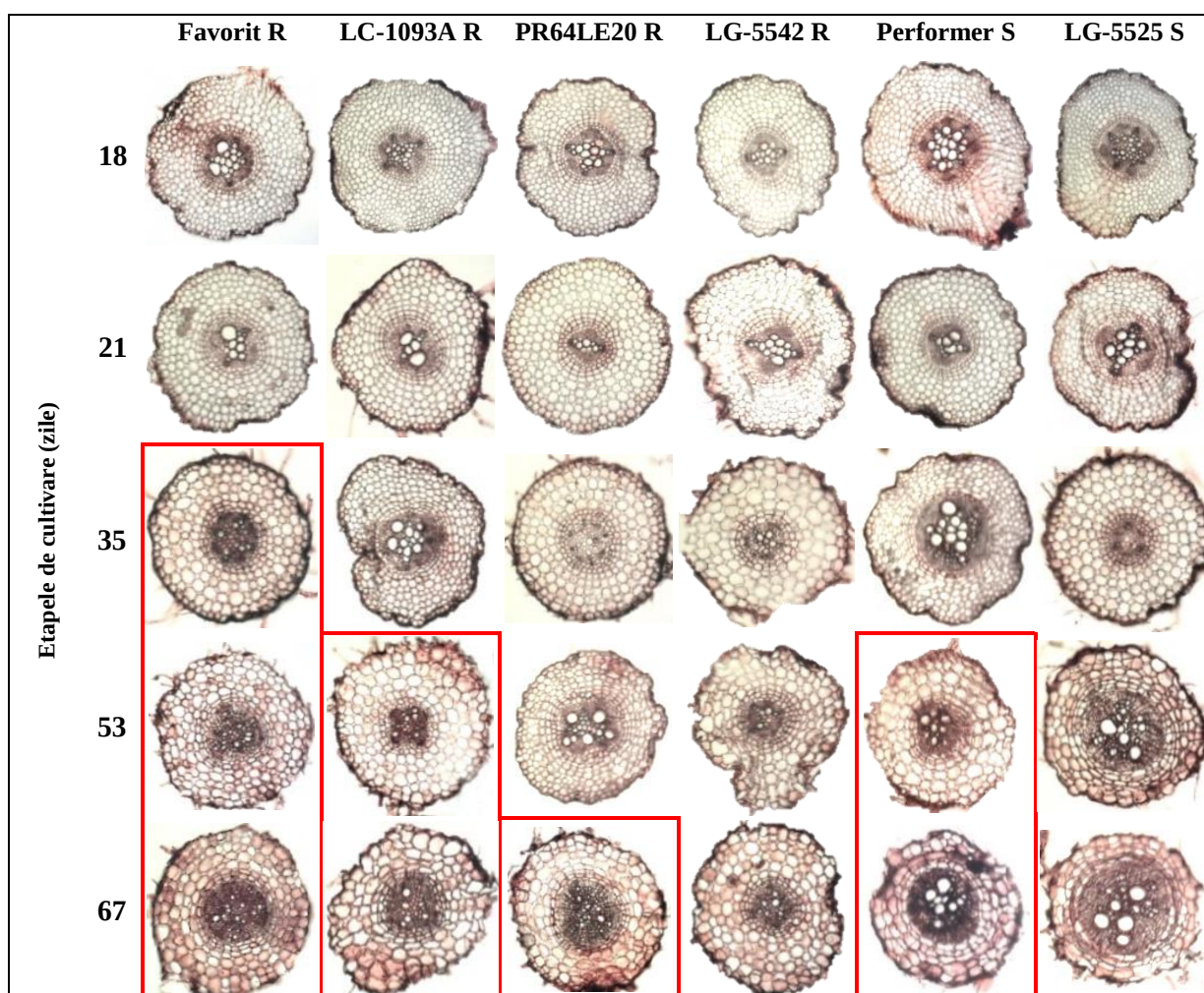


Fig. 3.3. Identificarea histochimică a ligninei (×160 de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare artificială cu lupoaie
În chenar roșu sunt marcate secțiunile cu acumulări suplimentare

Evaluarea conținutului de lignină în cazul genotipului PR64LE20 R a indicat aspecte diferite față de primul genotip Favorit R și față de cel de-al doilea LC-1093A R. Deci, analiza histochimică a secțiunilor radiculare transversale nu a manifestat modificări esențiale la primele patru etape de cultivare. Identificarea depunerilor de lignină a evidențiat acumularea compusului doar la etapa de 67 de zile la formele cultivate pe fondal de infestare în comparație cu forma martor (Figura 3.3).

Analiza secțiunilor transversale ale genotipului LG-5542 R a prezentat un tablou deosebit față de celelalte genotipuri rezistente, adică nu s-a atestat acumularea suplimentară a ligninei în pereții celulari ai stelului în raport cu martorul (Figura 3.3).

În aspect comparativ, analiza histochimică al acumulării suplimentare a ligninei la genotipurile rezistente de floarea-soarelui infestate artificial cu lupoaie a scos în evidență activarea mecanismelor defensive care depind de stadiul de dezvoltare, de genotip și de natura genetică a acestuia. Astfel, reacția de apărare împotriva invaziei patogenului, determinată de fortificarea pereților celulari prin acumulării suplimentare de lignină se activează 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 [87].

După formarea lăstarilor subterani și aereni 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 3.3). Cu toate că acest genotip sensibil își activează metabolismul de acumulare a ligninei, după 50 de zile, acest proces defensiv deja nu poate să permită plantei să lupte cu patogenul, deoarece el este infestat intens și pe rădăcinile lui s-au dezvoltat peste 30 de tuberculi și lăstari per plantă. Posibil la acest genotip nu sunt prezente anumite elemente de semnalizare precoce sau nu sunt activate în cazul posibilei infestări cu lupoaie. De asemenea, pot exista factori de natură patogenă care pot bloca anumite procese metabolice. Mai mult ca atât, la acest genotip se observă lărgirea cilindrului central și dilatarea accentuată a unor vase xilemice începând cu etapa de formare a tuberculilor, rezultați în urma stabilirii contactului intim dintre gazdă și patogen prin intermediul haustorului.

Al doilea genotip LG-5525 S nu a prezentat lignificarea suplimentară a pereților celulari din țesuturile radiculare supuse analizei (Figura 3.3). Totuși de menționat, o particularitate comună și pentru cel de-al doilea genotip infestat a fost faptul că, cilindrul central s-a dilatat ca rezultat al conexiunii cu patogenul și al comunicării reciproce dintre membrii patosistemului.

În aspect comparativ, reacția genotipurilor sensibile în cadrul interacțiunii gazdă-parazit a indicat modificări morfo-anatomice cum ar fi: creșterea diametrului cilindrului central, lărgirea unor celule ale măduvei și îngustarea scoarței. Creșterea diametrului rădăcinii gazdei ar putea fi rezultatul diviziunii celulelor parenchimatice din cilindru vascular și proliferarea celulelor endofite în site-ul de penetrare [17].

Rezultate similare au fost demonstrate și în cazul patosistemului *Pisum sativum* – *Orobanche* sp. [126]. Fortificarea pereților celulelor prin lignificare și suberizare a fost considerată ca mecanism de rezistență și la alte sisteme gazdă-parazit, cum ar fi tomatele parazitare de *Cuscuta reflexa* [244], mazăricea infestată cu *Striga gesnerioides* [194].

Studiile histochimice ale prezenței și acumulării suplimentare a ligninei la genotipurile de floarea-soarelui supuse infestării artificiale cu lupoaie au permis evidențierea activării mecanismelor defensive la trei genotipuri rezistente și la unul sensibil. Cel mai înalt nivel de

acumulare a ligninei a fost atestat la genotipul Performer S și Favorit R la etapa de 67 de zile de la cultivare [87]. Aceste rezultate nu corelează în totalitate cu rezultatele obținute anterior, unde acumularea ligninei a fost evidențiată doar la genotipul rezistent în zona de interacțiune [90].

3.2.2. Evidențierea acumulării calozei în peretele celular al celulelor rădăcinilor de floarea-soarelui

Acumularea suplimentară a calozei în peretele celular reprezintă o reacție defensivă frecvent întâlnită și poate fi însoțită sau nu cu diferite procese metabolice. Astfel, Delavault și colab., (2006a) în studiul lor privind rezistența plantelor de floarea-soarelui la *O. cumana*, au atestat depunerea calozei în xilemul rădăcinilor la contactul imediat cu parazitul, blocând vasele conducătoare și reducând rata de atac al patogenului [73]. Cercetări asemănătoare au realizat și echipa lui Letousey (2007), care au identificat fortificarea pereților celulari prin depunerea calozei, urmată de sporirea expresiei genei *HaGSL1*, care codifică enzima glucan-sintetaza, enzimă ce participă la sinteza și acumularea de caloză [166].

Profilul histochimic al secțiunilor transversale ale plantelor cultivate în lipsa infestării a indicat aspecte similare în nivelul de acumulare al calozei atât printre genotipurile rezistențe, cât și la cele sensibile pe toată perioada de studiu (Figura 3.4).

Analiza histochimică a prezenței calozei la genotipul Favorit R a pus în evidență acumularea compusului la etapele târzii de cultivare pe fondal de infestare (35-67 de zile) (Figura 3.5), rezultate similare relevate și în cazul acumulării ligninei.

Nivelul de depozitare suplimentară a calozei în secțiunile transversale la genotipul LC-1093A R cultivat pe fondal de infestare cu parazit a manifestat un grad mai scăzut față de Favorit R, începând cu etapa de 53 de zile (Figura 3.5).

La formele cultivate pe fondal de infestare ale genotipul PR64LE20 R nu au fost evidențiate modificări majore. Totuși, la etapa de 67 de zile formarea papilelor de caloză a arătat un nivel puțin ridicat față de cele ale martorilor (Figura 3.4, 3.5).

În cazul genotipului LG-5542 R nu au fost semnalate modificări esențiale ale acumulării calozei pe parcursul cultivării pe fondal de infestare în raport cu martorul (Figura 3.5). Astfel, putem conchide că acest genotip nu-și activează această cale metabolică ca reacție de răspuns la co-cultivarea cu semințe de lupoai.

Totuși, au fost relevate unele aspecte comune, la genotipurile rezistente supuse stresului, și anume, s-a observat depozitarea suplimentară de caloză la etapa de 18 zile în pereții celulari ai epidermei (Figura 3.5) [87].

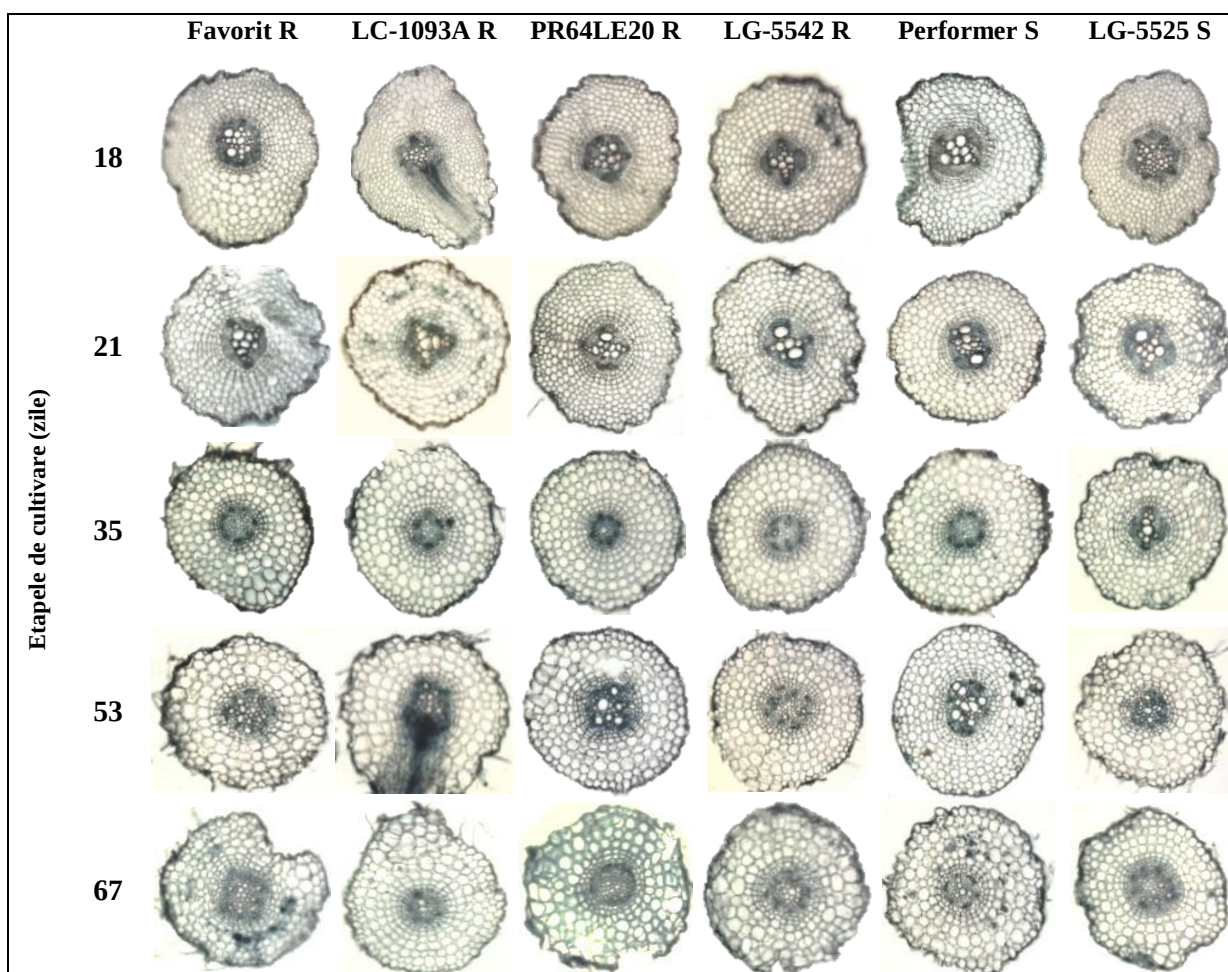


Fig. 3.4. Identificarea histochimică a calozei ($\times 160$ de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în sol neinfestat

Identificarea mecanismelor *post-atașament* și *post-haustoriale* în sistemul gazdă-parazit dintre Performer S și lupoaie, prin reacții histochimice de colorare a calozei a permis detectarea acumulării compusului în pereții celulari ai cilindrului central în cantități ridicate la etapele de formare a lăstarilor subterani și aerieni (Figura 3.5). Astfel, acest genotip la nivel histochimic își activează mecanismele doar după formarea conexiunii cu patogenul, adică cele *post-haustoriale*.

La genotipul LG-5525 S a fost identificată lipsa acumulării suplimentare a calozei în raport cu martorul a secțiunilor radiculare prin colorarea histochimică (Figura 3.5).

Analiza profilului histochimic de acumulare a calozei ca mecanism de răspuns al plantelor de floarea-soarelui la atacul parazitului *O. cumana* a demonstrat că la unele sisteme incompatibile dintre gazdă și patogen se activează calea de biosinteză a calozei și are loc depozitarea acesteia, fenomen sesizat intens la genotipul Favorit R și LC-1093A R. Dintre genotipurile sensibile, Performer S a manifestat un grad înalt de depozitare a calozei la formele infestate artificial cu lupoaie [87].

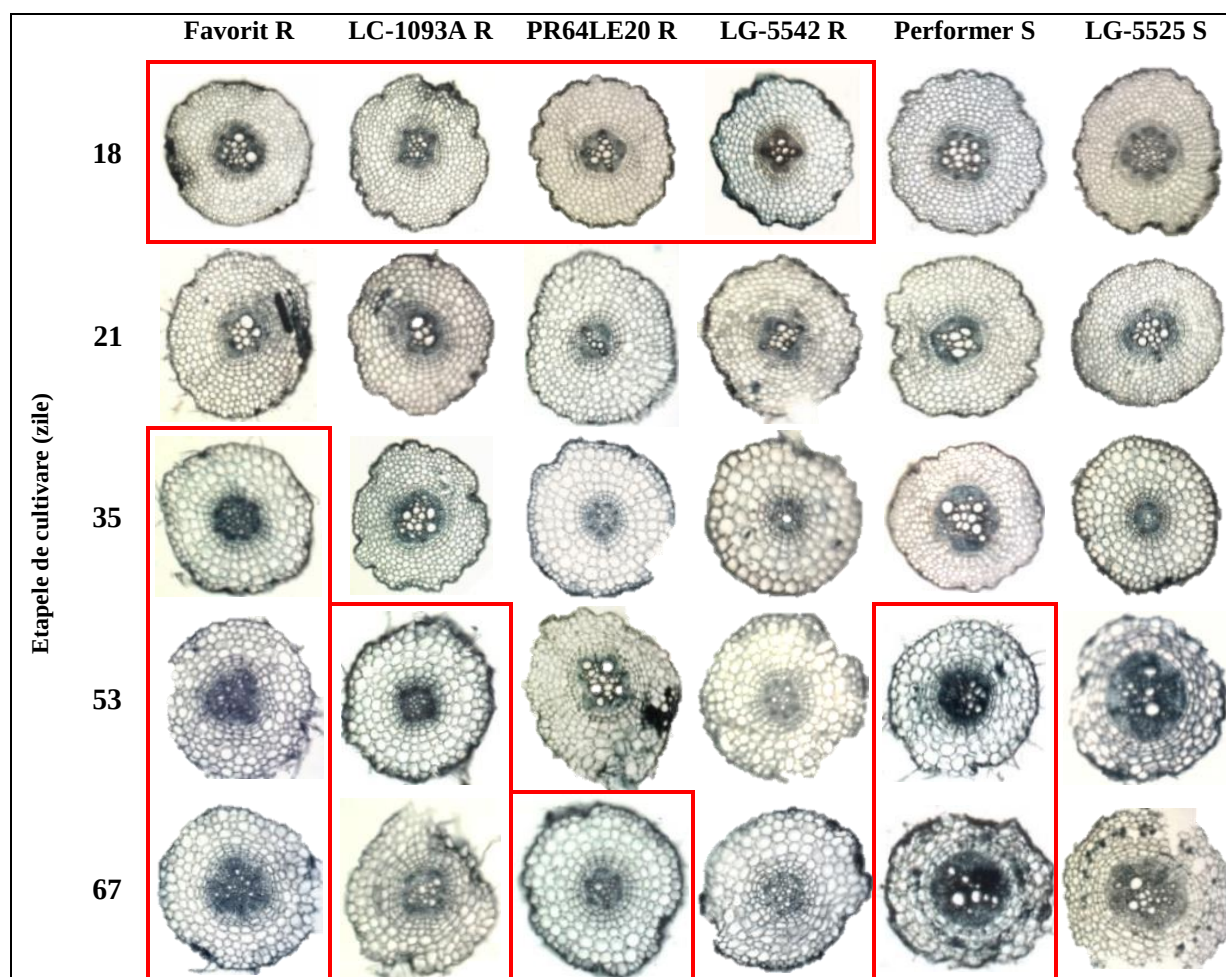


Fig. 3.5. Identificarea histochimică a calozei ($\times 160$ de ori) la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate pe fondal de infestare artificială cu lupoaie
În chenar roșu sunt marcate secțiunile cu acumulări suplimentare

Rezultatele obținute de alți cercetători pe rădăcinile rezistente de floarea-soarelui penetrate de *O. cumana* au arătat depunerea intensă de caloză deasupra punctului de atașare a apresorului la interfața dintre gazdă – parazit, iar la genotipul sensibil a fost identificată un conținut mai mic de caloză în zona imediată de interconexiune [166]. Pe când, rezultatele obținute în lucrare sunt diferite, la genotipul rezistent acumularea de caloză a fost relevată nu doar deasupra punctului de atașare, iar la cele sensibile – nu doar în zona de infecție. De asemenea, conținutul compusului a fost mult mai sporit la formele sensibile față de cele rezistente, ceea ce a fost diferit de alte cercetări.

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 [272]. Nivelurile excesive de SRO sunt potențial dăunătoare structurii și funcțiilor celulare dacă nu sunt detoxificate prin sistemele antioxidante [59].

3.3.1. Activitatea fenilalanin amonia-liazei

Acumularea compușilor fenilpropanoidici și fortificarea pereților celulari reprezintă mecanisme esențiale de apărare a 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 sub acțiunea căreia se realizează dezaminarea non-oxidativă a L-fenilalaninei, obținându-se acidul *trans*-cinamic, care ulterior după mai multe transformări generează trei tipuri de monomeri ai ligninei. Hyun M.W (2011) a stabilit existența unei corelații între conținutul fenilpropanoidelor și activitatea PAL, fapt care a permis autorilor să considere interrelația ”activitatea PAL – conținutul fenilpropanoidelor” marker funcțional și test-criteriu de rezistență a plantelor la patogenii fungici [133].

Activitatea enzimei PAL la genotipurile de floarea-soarelui cultivate în sol neinfestat a prezentat un profil variat care alternează nesemnificativ pe toată perioada experimentală.

În ansamblu, activitatea enzimei PAL, în dinamică, la genotipurile rezistente cultivate în lipsa infestării a prezentat profiluri diferite. Astfel, cel mai mare interval al valorilor activității fenilalanin amonia-liazei la formele martor a înregistrat genotipul PR64LE20 R cu valori cuprinse între 1,670-15,873 U/mg proteină (Tabelul 3.2). Dinamica activității PAL a determinat 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 9,59 U/mg proteină și, respectiv, 9,14 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 (valoarea maximă de 15,87 U/mg proteină și respectiv 11,07 U/mg proteină) după care descrește (Figura 3.6 A-D, Tabelul 3.2). 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 (de la 11,39 U/mg proteină la 6,16 U/mg proteină) (Figura 3.6 A, Tabelul 3.2). La LG-5525 S activitatea enzimei a sporit de la 18 zile, menținându-se aproximativ la un nivel constant la trei etape de vegetație, urmat puțin de sporirea până la 10,52 U/mg proteină (Figura 3.6 B, Tabelul 3.2) [9].

În aspect comparativ al dinamicii activității enzimei PAL, genotipul Favorit R a manifestat un profil diferit dintre formele martor și cele cultivate pe fondal de infestare (Tabelul 3.2, Figura 3.6 A). Activitatea enzimei PAL la formele martor a prezentat valori oscilatorii care cresc, apoi descresc la diferite etape de cultivare.

Tabelul 3.2. Activitatea enzimei PAL (U/mg proteină) la floarea-soarelui

Geno- tip	Etape de cultivare (zile)	Martor			Cultivat pe fondal de infestare			t test	p
		$\bar{x}$	S	CV	$\bar{x}$	S	CV		
Favorit R	18	2,99	0,16	5,29	2,07	0,29	14,00	4,837	0,0084*
	21	6,36	0,22	3,52	4,59	0,04	0,90	13,450	0,0002*
	35	5,67	0,34	5,94	7,82	0,26	3,26	8,849	0,0009*
	53	9,59	0,27	2,78	8,44	0,05	0,61	7,305	0,0019*
	67	6,95	0,04	0,62	7,16	0,08	1,17	3,884	0,0178*
LC-1093A R	18	1,64	0,01	0,57	2,70	0,08	2,83	23,937	0,0001*
	21	6,39	0,01	0,20	2,82	0,02	0,56	310,80	0,0001*
	35	6,46	0,28	4,27	6,35	0,07	1,15	0,715	0,5136''
	53	9,14	0,10	1,04	5,30	0,09	1,60	52,265	0,0001*
	67	6,90	0,05	0,74	5,61	0,10	1,78	19,992	0,0001*
PR64LE20 R	18	5,83	0,18	3,09	1,71	0,09	5,02	35,718	0,0001*
	21	15,87	0,12	0,78	13,42	0,20	1,49	17,981	0,0001*
	35	7,03	0,05	0,78	4,87	0,03	0,55	61,643	0,0001*
	53	6,46	0,12	1,80	4,82	0,14	2,88	15,621	0,0001*
	67	1,67	0,05	2,73	5,52	0,07	1,18	83,712	0,0001*
LG-5542 R	18	7,30	0,10	1,30	4,91	0,09	1,83	31,686	0,0001*
	21	11,07	0,12	1,05	8,44	0,15	1,73	24,414	0,0001*
	35	5,33	0,18	3,34	7,56	0,28	3,70	11,643	0,0003*
	53	5,20	0,11	2,13	5,81	0,11	1,88	6,803	0,0024*
	67	8,30	0,15	1,86	6,57	0,12	1,86	15,184	0,0001*
Performer S	18	2,76	0,12	4,32	2,74	0,03	1,19	0,164	0,8780'''
	21	11,39	0,15	1,29	7,19	0,08	1,11	43,463	0,0001*
	35	11,16	0,24	2,12	7,21	0,09	1,28	26,904	0,0001*
	53	6,17	0,04	0,68	6,92	0,09	1,25	13,491	0,0002*
	67	6,55	0,08	1,24	9,44	0,12	1,28	34,412	0,0001*
LG-5525 S	18	2,18	0,14	6,28	5,30	0,13	2,45	28,777	0,0001*
	21	8,66	0,22	2,57	13,04	0,19	1,42	26,102	0,0001*
	35	8,88	0,01	0,15	4,96	0,10	1,93	70,010	0,0001*
	53	7,92	0,58	7,31	9,96	0,16	1,61	5,894	0,0041*
	67	10,52	0,14	1,37	5,22	0,06	1,17	58,670	0,0001*

Notă: $\bar{x}$ - media a trei repetiții biologice; S - deviația standard a grupului; CV – coeficientul de variație; diferențele în activitatea enzimelor sunt remarcate cu ajutorul *t test*, unde ''' $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$.

Cu toate că genotipul Favorit R supus stresului a relevat valori mai diminuate ale activității enzimei față de probele martor la etapele de 18 și 21 de zile cu 31% ($p=84 \cdot 10^{-4}$) și, respectiv, 28% ($p=2 \cdot 10^{-4}$), după 35 de zile, activitatea enzimatică sporește semnificativ cu 38% (7,82 U/mg proteină, $p=9 \cdot 10^{-4}$) față de martor, ceea ce corespunde cu acumularea intensă a ligninei în secțiuni (Figura 3.3 și 3.6 A, Tabelul 3.2) [8].

Genotipul LC-1093A R s-a conturat prin profil biochimic opus dintre forma martor și cea expusă stresului (Figura 3.6 B, Tabelul 3.2), iar genotipurile PR64LE20 R și LG-5542 R au manifestat profiluri biochimice asemănătoare între formele martor și cele cultivate în sol infestat,

cu unele mici deviații (Tabelul 3.2, Figura 3.6 C, D). Astfel, la genotipul LC-1093A R activitatea enzimei PAL a atins valori mai mari la formele cultivate pe fondal de infestare doar la etapa de 18 zile cu 65% ($p=1*10^{-4}$) (Figura 3.6 B), în celelalte cazuri valorile au fost mai diminuate față de martor pe toată perioada experimentală. Se remarcă activitatea enzimei la etapa de 35 de zile cu valori aproximativ egale dintre martor/cultivat pe fondal de infestare (6,46 / 6,35 U/mg proteină, $p=0,514$, valori nesemnificative statistic).

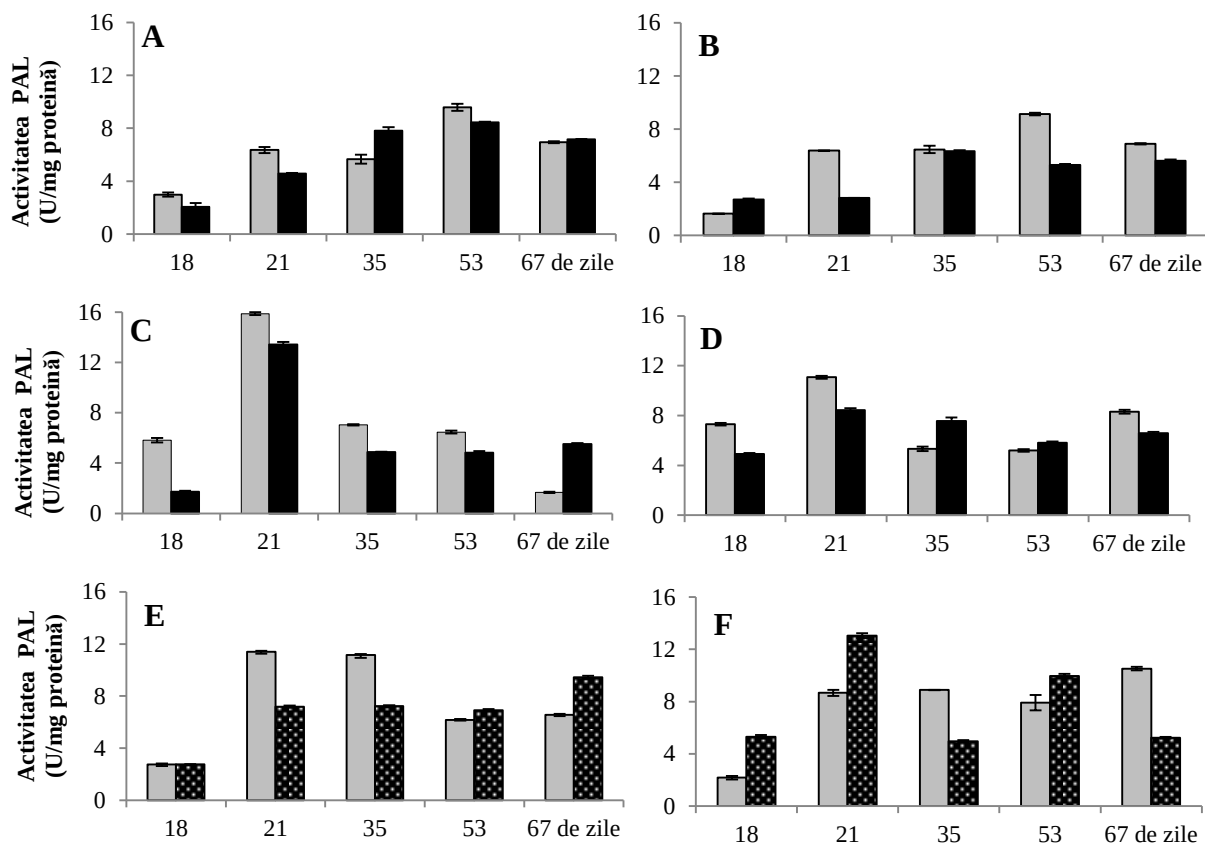


Fig. 3.6. Activitatea fenilalanin amonia-liazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui
A – Favorit R, B – LC-1093A R, C – PR64LE20 R, D – LG-5542 R, E – Performer S, F – LG-5525 S.
□ Martor ■ Cultivat pe fondal de infestare ▨ Infestat

Activitatea enzimei PAL investigată la genotipul PR64LE20 R se modifică repetând tendința martorului doar cu valori mai mici la forma cultivată pe fondal de infestare la primele patru faze de cultivare (Figura 3.6 C). Diferența maximă dintre martor/experiment a fost înregistrată la 18 zile de cultivare cu 71% ($p=1*10^{-4}$), care se stabilizează în jur de 32% pentru celelalte trei etape, iar la ultima etapă de 67 de zile, activitatea enzimei sporește de 3,3 ori ($p=1*10^{-4}$) față de martor, ceea ce corelează cu conținutul de lignină din secțiuni [8].

Profilul biochimic al genotipului LG-5542 R s-a caracterizat, de asemenea, prin valori mai sporite la formele martor cu excepția a două etape la care activitatea enzimei sporește cu 42% la etapa de 35 de zile ($p=3*10^{-4}$) și cu 12% la etapa de 53 de zile ($p=24*10^{-4}$) (Figura 3.6 D).

Penetrarea țesuturilor radiculare de către patogen a rădăcinilor genotipurilor sensibile a condiționat declanșarea unei reacții de răspuns, exprimată prin modificarea diferită a activității enzimei PAL. Astfel, la genotipul Performer S activitatea PAL a sporit doar la ultimele etape de dezvoltare a membrilor pato-sistemului ce coincide cu dezvoltarea lăstarilor subterani și aerieni. Valorile funcționalității enzimei au crescut cu 12% ($p=2*10^{-4}$) și 44% ($p=1*10^{-4}$) la ultimele două etape (Figura 3.6 E, Tabelul 3.2). Aceste rezultate corelează perfect cu nivelul de acumulare suplimentară a ligninei în secțiunile radiculare (Figura 3.3) și confirmă activarea acțiunilor defensive în urma invaziei patogenului fiind atribuite mecanismelor *post-haustoriale* de rezistență [8].

Infestarea celui de-al doilea genotip LG-5525 S a determinat majorarea activității enzimei PAL la etapa de formare a primelor atașamente și de dezvoltare a lăstarilor subterani de 2,4 ori ($p=1*10^{-4}$), 1,5 ori ($p=1*10^{-4}$) și, respectiv, 1,3 ori ($p=41*10^{-4}$) (Figura 3.6 F, Tabelul 3.2). Totuși aceste rezultate nu corelează cu rezultatele histochemice, acest genotip nu a prezentat acumularea suplimentară a ligninei, chiar dacă enzima a fost activă pe jumătate din perioada de co-dezvoltare a ambilor membri ai patosistemului și poate fi explicat prin faptul că, enzima cheie este implicată în activitatea mai multor căi metabolice cum ar fi biosinteza antocianilor, flavanoidelor, fitoalexinelor etc.

Generalizând rezultatele privind activitatea enzimei fenilalanin amonia-liazei la genotipurile rezistente și sensibile la infestarea 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 a gazdei [8].

3.3.2. Activitatea enzimatică a superoxid dismutazei

Celulele vii supuse stresului în momentul interacțiunii cu parazitul, produc și acumulează SRO printre care superoxidul (O_2^-), care reprezintă cel mai agresiv radical. O_2^- este dismutat de către enzimele grupului 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 [109, 191]. Astfel de răspunsuri defensive, au fost identificate la infecția cu virusuri, ciuperci, plante parazite, nematode etc.

În ansamblu, activitatea enzimelor SOD, în majoritatea cazurilor, atât la plantele cultivate în lipsa infestării, cât și la cele supuse stresului a prezentat o tendință de diminuare până la etapele de 21-35 de zile, urmată de creșterea acesteia până la fazele finale ale cultivării (Figura 3.7; Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Activitatea enzimei SOD (U/mg proteină) la floarea-soarelui

Geno- tip	Etape de cultivare (zile)	Martor			Cultivat pe fondal de infestare			t test	p
		$\bar{x}$	S	CV	$\bar{x}$	S	CV		
Favorit R	18	10,74	0,67	6,22	6,25	0,93	14,81	6,814	0,0024*
	21	16,65	0,67	4,00	2,49	0,72	29,04	24,925	0,0001*
	35	12,27	0,07	0,53	9,05	0,25	2,80	21,281	0,0001*
	53	24,75	0,36	1,44	24,54	0,48	1,96	0,5976	0,5823'''
	67	44,93	0,82	1,82	69,97	0,53	0,75	44,564	0,0001*
LC-1093A R	18	8,74	0,41	4,69	31,10	1,60	5,15	23,424	0,0001*
	21	16,82	0,89	5,26	17,87	1,30	7,26	1,157	0,3116'''
	35	3,00	0,08	2,62	8,50	0,23	2,68	39,529	0,0001*
	53	56,89	0,62	1,09	78,17	0,86	1,10	34,754	0,0001*
	67	18,06	0,17	0,97	11,42	0,13	1,15	52,540	0,0001*
PR64LE20 R	18	12,92	1,48	11,49	10,62	0,75	7,06	2,399	0,0744'''
	21	28,84	1,70	5,88	8,46	0,79	9,32	18,875	0,0001*
	35	5,67	0,23	3,97	17,42	0,36	2,07	47,855	0,0001*
	53	25,90	0,70	2,70	26,09	0,27	1,02	0,445	0,6796'''
	67	28,15	0,27	0,96	34,23	0,31	0,89	25,873	0,0001*
LG-5542 R	18	9,19	0,89	9,69	5,69	1,05	18,52	4,393	0,0118*
	21	3,95	0,45	11,46	4,81	0,36	7,51	2,563	0,0624'''
	35	7,29	0,10	1,31	2,40	0,09	3,67	65,335	0,0001*
	53	19,39	0,35	1,82	43,68	0,57	1,31	62,463	0,0001*
	67	34,2	0,28	0,83	19,67	1,21	6,15	20,261	0,0001*
Performer S	18	15,28	0,78	5,13	26,58	1,63	6,12	10,836	0,0004*
	21	7,22	0,40	5,59	9,61	0,87	9,09	4,308	0,0126*
	35	3,65	0,17	4,55	4,59	0,14	3,03	7,531	0,0017*
	53	15,27	0,37	2,44	17,79	0,14	0,81	10,936	0,0004*
	67	22,14	0,22	1,00	33,28	0,35	1,06	46,525	0,0001*
LG-5525 S	18	8,97	0,83	9,25	22,81	0,62	2,70	23,209	0,0001*
	21	3,08	0,88	28,64	3,12	0,39	12,39	0,076	0,9434'''
	35	5,07	0,14	2,76	9,30	0,19	2,03	31,213	0,0001*
	53	33,01	0,50	1,51	47,56	0,40	0,84	39,410	0,0001*
	67	26,20	0,21	0,80	40,01	0,82	2,05	28,193	0,0001*

Notă: $\bar{x}$ - media a trei repetiții biologice; S - deviația standard a grupului; CV – coeficientul de variație; diferențele în activitatea enzimelor sunt remarcate cu ajutorul t test, unde ''' $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$.

Activitatea enzimelor SOD estimată în dinamică, la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în substrat neinfestat cu lupoai a demonstrat valori cuprinse în limitele 3,00 – 56,89 U/mg proteină, iar la cele supuse infestării artificiale cu *O. cumana* de la 2,40 până la 78,17 U/mg proteină (Tabelul 3.3).

Analiza activității SOD la formele cultivate în lipsa infestării a pus în evidență profile biochimice diferite, caracterizate prin alternarea unor diminuări și sporiri a activității enzimice pentru toate genotipurile luate în studiu (Figura 3.7). Astfel, dinamica activității SOD la Favorit R, LG-5542 R și Performer S au manifestat valori cuprinse între 9,19-15,28 U/mg proteină la prima etapă de analiză care până la finele etapei descresc și apoi cresc cuprinzând valori de 22,14-44,93 U/mg proteină (Figura 3.7 A, D, E). Celelalte genotipuri LC-1093A R, PR64LE20 R și LG-5525 S s-au caracterizat prin alternarea valorilor parametrului analizat prin diminuări și sporiri de activitate enzimatică (Figura 3.7 B, C, F)

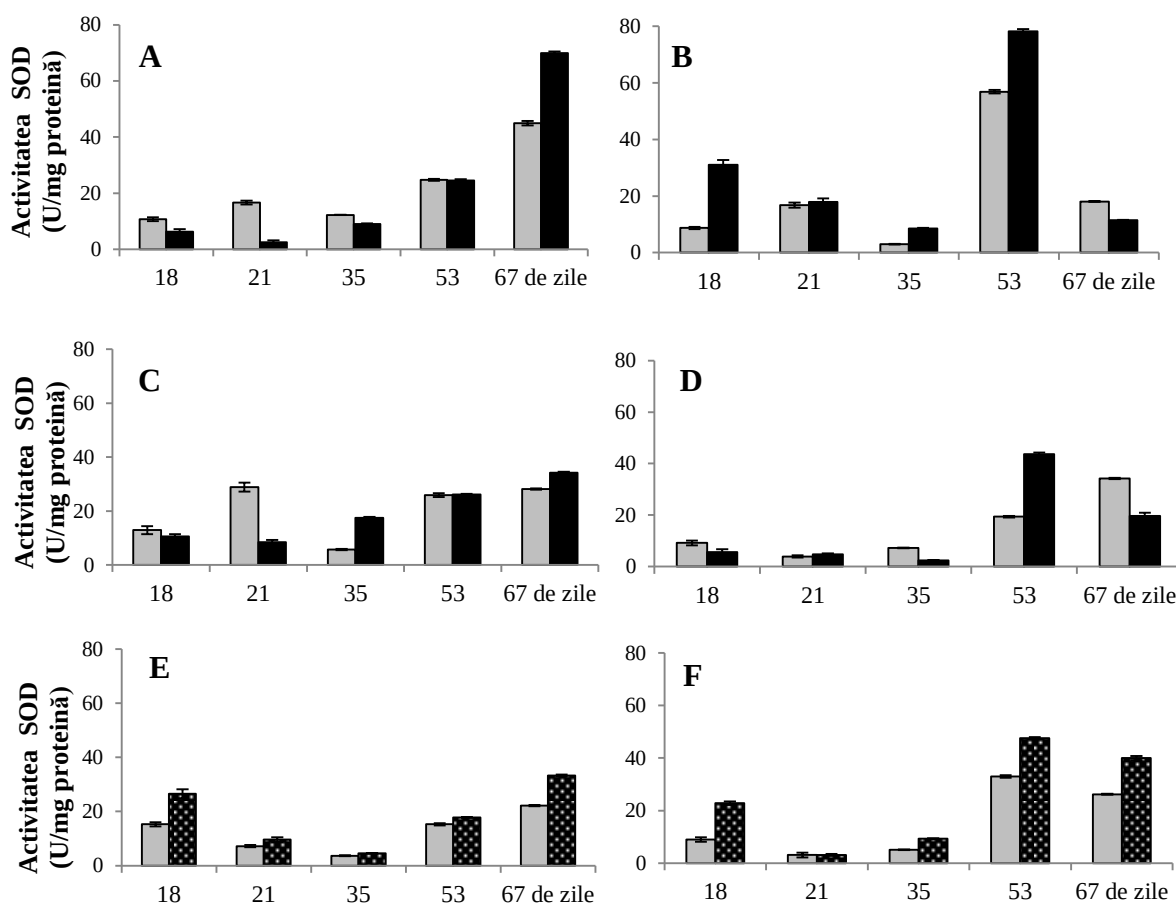


Fig. 3.7. Activitatea superoxid dismutazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui
A – Favorit R, B – LC-1093A R, C – PR64LE20 R, D – LG-5542 R, E – Performer S, F – LG-5525 S.
□ Martor ■ Cultivat pe fondal de infestare ▨ Infestat

În caz particular, activitatea enzimatică estimată în dinamică la genotipul Favorit R cultivat pe fondal de infestare a evidențiat valori crescute față de martor cu 55,7% ($p=1*10^{-4}$) doar la ultima etapă de analiză (67 de zile) (Figura 3.7 A).

Cultivarea genotipului LC-1093A R în sol infestat cu semințe de lupoai a determinat sporirea activității SOD de la prima etapă până la etapa de 53 de zile, cu valori crescute

semnificativ de 3,6 ori (18 zile, $p=1*10^{-4}$) și de 2,8 ori (35 de zile, $p=1*10^{-4}$) față de martor (Figura 3.7 B).

Reacția de apărare determinată de modificarea activității SOD a fost identificată și la genotipul PR64LE20 R începând cu etapa de 35 de zile de la cultivare. Astfel, activitatea enzimelor a crescut semnificativ de 3,1 ori ($p=1*10^{-4}$) față de martor (Figura 3.7 C).

Reacția de apărare determinată de modificarea activității SOD a fost identificată și la genotipul PR64LE20 R începând cu etapa de 35 de zile de la cultivare. Astfel, activitatea enzimelor a crescut semnificativ de 3,1 ori ($p=1*10^{-4}$) față de martor (Figura 3.7 C).

Genotipul LG-5542 R cultivat pe fondal de infestare a prezentat un tablou diferit față de genotipurile rezistente descrise anterior, prin alternarea valorilor activității SOD spre diminuare și apoi sporire pe parcursul perioadei de cultivare. Totuși, la etapa de 53 de zile s-au înregistrat valori sporite ale activității enzimelor de 2,3 ori ($p=1*10^{-4}$) comparativ cu martorul (Figura 3.7 D).

Comparând rezultatele obținute pentru cele patru genotipuri rezistente, profilul activității enzimelor SOD a fost similar la două genotipuri – Favorit R și PR64LE20 R atât la formele martor cât și la cele cultivate în sol infestat, doar că au existat diferențe cantitative (Figura 3.7 A, C). Celelalte două genotipuri rezistente – LC-1093A R și LG-5542 R, au prezentat și ele aspecte comune ale influenței cultivării în substrat contaminat cu semințe de lupoaie la nivel de activitate enzimatică. Astfel, specific pentru aceste două genotipuri, valoarea maximă a parametrului studiat s-a înregistrat la etapa de 53 de zile de la cultivare (Figura 3.7 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, activitatea SOD raportată în rădăcinile de floarea-soarelui a înregistrat valori continue mai mari comparativ cu martorul pe toată perioada de cultivare, fiind cea mai înaltă de 1,7 ori ($p=4*10^{-4}$) și de 2,5 ori ($p=1*10^{-4}$) la etapa de formare a primelor atașamente (18 zile) (Figura 3.7 E, F). În acest moment, are loc formarea legăturii fizice dintre gazdă și patogen și comunicarea chimică directă a ambilor membri ai patosistemului. Această fază, corespunde cu formarea primelor atașamente, unde are loc manifestarea mecanismelor defensive *post-atașament*. În decursul perioadei de 21 și 35 de zile se dezvoltă haustoriu ce implică activarea mecanismelor defensive *post-haustoriale* care nu s-au caracterizat prin valori sporite ale activității SOD. Însă, cea mai mare activitate a enzimelor a fost stabilită la etapa de formare a lăstarilor, atunci când plantele se epuizează pe contul substanțelor nutritive pierdute. Astfel, genotipul Performer S infestat a cuprins valoarea activității SOD de 1,5 ori ($p=1*10^{-4}$) mai mare față de martor în momentul dezvoltării lăstarilor

aerieni, iar genotipul LG-5525 S cu valori de 1,4 ori și 1,5 ori ($p=1*10^{-4}$) mai crescute față de martor la etapa de dezvoltare a lăstarilor subterani și respectiv cei aerieni (Figura 3.7 E, F) [14]

În aspect comparativ, dintre genotipurile rezistente și cele sensibile al dinamicii activității enzimatică a grupului SOD, se remarcă faptul că, genotipul Performer S infestat prezintă cea mai mare activitate enzimatică la etapa de formare a lăstarilor aerieni (67 de zile) similar genotipurilor rezistente Favorit R și PR64LE20 R (Figura 3.7 A, C, E), însă genotipul sensibil LG-5525 S infestat a manifestat valoarea maximă la etapa de dezvoltare a lăstarilor subterani (53 de zile) și se grupează cu genotipurile rezistente LC-1093A R și LG5542 R cultivate pe fondal de infestare (Figura 3.7 B, D, F). [14]

Studiul de față a demonstrat că activitatea SOD a fost stimulată în mod semnificativ la unele etape de co-cultivare cu patogenul a plantelor rezistente de floarea-soarelui. Eventual, în alte studii activitatea SOD a fost la un nivel superior față de martor la hibridul rezistent Pioneer 4223 – cultivat în decursul a nouă zile după inoculare cu semințe germinate de lupoaie [75].

Pe de altă parte în cadrul celor două patosisteme din studiul nostru, activitatea enzimelor a manifestat tendință similară cu unele mici devieri și valori mult mai sporite față de martori. Iar în cercetări anterioare, la două patosisteme rezultatele au fost contradictorii, prin sporirea activității la hibridul Isera și reducerea la Sanay. Aceste rezultate se datorează gradului diferit de sensibilitate a genotipurilor față de lupoaie [75].

3.3.3. 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 peroxidazei (APX – EC, 1.11.1.11), care catalizează conversia H_2O_2 în H_2O și O_2 , folosind ascorbatul ca un donator de electroni [59].

Activitatea APX la genotipurile de floarea-soarelui cultivate în lipsa infestării a înregistrat valori cuprinse între 0,62-65,67 U/mg proteină, iar la cele expuse la stresul biotic, rezultate de la 0,49 până la 50,37 U/mg proteină (Tabelul 3.4). Se remarcă genotipul LG-5542 R care cultivat în substrat neinfestat a manifestat o activitate APX mai mare față de cele expuse la stres, înregistrând cea mai mare valoare la etapa de 35 de zile - 18,59 U/mg proteină (Tabelul 3.4, Figura 3.8 D.).

În aspect al dinamicii funcționalității enzimelor ascorbat peroxidazei, trei genotipuri (Favorit R, LC-1093A R și Performer S) au fost asemănătoare după profilul biochimic, caracterizat prin valori sporite esențial doar la etapa de 53 de zile în raport cu celelalte etape de analiză. Genotipurile PR64LE20 R, LG-5542 R și LG5525 S s-au evidențiat printr-o dinamică

alternantă a activității enzimei APX atât la formele martor, cât și la cele supuse stresului biotic (Figura 3.8).

Tabelul 3.4. Activitatea enzimei APX (U/mg proteină) la floarea-soarelui

Geno- tip	Etape de cultivare (zile)	Martor			Cultivat pe fondal de infestare			<i>t</i> test	<i>p</i>
		$\bar{x}$	<i>S</i>	<i>CV</i>	$\bar{x}$	<i>S</i>	<i>CV</i>		
Favorit R	18	1,34	0,20	14,87	3,06	0,62	20,21	4,588	0,0101*
	21	0,67	0,12	18,07	5,05	0,29	5,80	23,998	0,0001*
	35	5,06	0,80	15,84	8,79	1,07	12,28	4,756	0,0089*
	53	8,75	1,94	22,19	37,34	4,69	12,56	9,753	0,0006*
	67	7,94	0,99	12,50	19,11	0,49	2,56	17,482	0,0001*
LC-1093A R	18	0,62	0,11	17,80	4,19	0,22	5,26	25,049	0,0001*
	21	12,05	0,54	4,45	10,40	0,37	3,52	4,405	0,0116*
	35	4,53	1,03	22,78	0,49	0,11	23,27	6,750	0,0025*
	53	17,07	1,96	11,46	50,37	8,91	17,70	6,320	0,0032*
	67	0	0	0	0	0	0	0	0
PR64LE20 R	18	2,60	0,30	11,63	6,05	1,58	26,16	3,714	0,0206*
	21	5,95	0,66	11,11	15,49	2,58	16,67	6,198	0,0035*
	35	1,50	0,20	13,07	3,58	0,36	10,00	8,823	0,0009*
	53	13,87	0,89	6,43	1,65	0,27	16,37	22,725	0,0001*
	67	6,90	1,15	16,67	17,28	0,71	4,13	13,270	0,0002*
LG-5542 R	18	3,62	0,71	19,52	2,49	0,34	13,48	2,490	0,0675 ^{'''}
	21	16,05	0,40	2,52	6,78	0,33	4,88	30,727	0,0001*
	35	18,59	1,18	6,36	1,19	0,18	15,06	25,235	0,0001*
	53	15,26	0,87	5,71	2,59	0,86	33,33	17,889	0,0001*
	67	14,46	2,39	16,50	2,11	0,42	20,00	8,830	0,0009*
Performer S	18	8,11	1,28	15,79	13,23	1,96	14,78	3,795	0,0192*
	21	5,66	0,60	10,59	7,44	0,41	5,56	4,251	0,0132*
	35	3,69	0,93	25,32	3,78	0,90	23,90	0,132	0,9017 ^{'''}
	53	28,43	0,79	2,77	45,29	1,52	3,35	17,108	0,0001*
	67	6,26	0,82	13,10	8,71	0,48	5,52	4,481	0,0110*
LG-5525 S	18	1,87	0,29	15,39	8,20	0,47	5,73	19,910	0,0001*
	21	17,40	1,03	5,93	33,80	2,93	8,66	9,159	0,0008*
	35	4,47	0,66	14,79	2,93	0,65	22,22	2,876	0,0457*
	53	65,67	6,32	9,62	8,10	0,55	6,74	15,727	0,0001*
	67	9,50	1,28	13,48	4,57	0,72	15,80	5,809	0,0044*

Notă: $\bar{x}$ - media a trei repetiții biologice; *S* - deviația standard a grupului; *CV* – coeficientul de variație; diferențele în activitatea enzimelor sunt remarcate cu ajutorul *t* test, unde ^{'''}*p* > 0,05, **p* ≤ 0,05.

Activitatea ascorbat peroxidazelor la toate genotipurile cultivate pe sol neinfestat s-a caracterizat prin valori ce alternează pe toată perioada experimentală. Astfel, la toate genotipurile analizate cu excepția LG-5545 R, activitatea APX s-a modificat pe parcursul perioadei ontogenetice prin sporirea sau diminuarea valorilor parametrului analizat. De menționat faptul, că cele cinci genotipuri au prezentat cele mai mari valori ale activității APX la etapa de 53 de zile de la cultivare cu valori de 8,75 U/mg proteină la Favorit R, 17,07 U/mg proteină la LC-

1093A R, 13,87 U/mg proteină la PR64LE20 R, 28,43 U/mg proteină la Performer S și 65,67 U/mg proteină la LG-5525 S. Se remarcă genotipurile sensibile cu activitate mai mare față de cele rezistente (Figura 3.8 A, B, C, E, F). Genotipul LG-5545 R cultivat în sol neinfestat a relevat sporirea activității de la 3,62 U/mg proteină la prima etapă de analiză până la 16,05 U/mg proteină la etapa următoare, care ulterior, s-a menținut cu mici devieri în limitele valorilor de la 14,46-18,59 U/mg proteină pe toată perioada de cultivare (Figura 3.8 D).

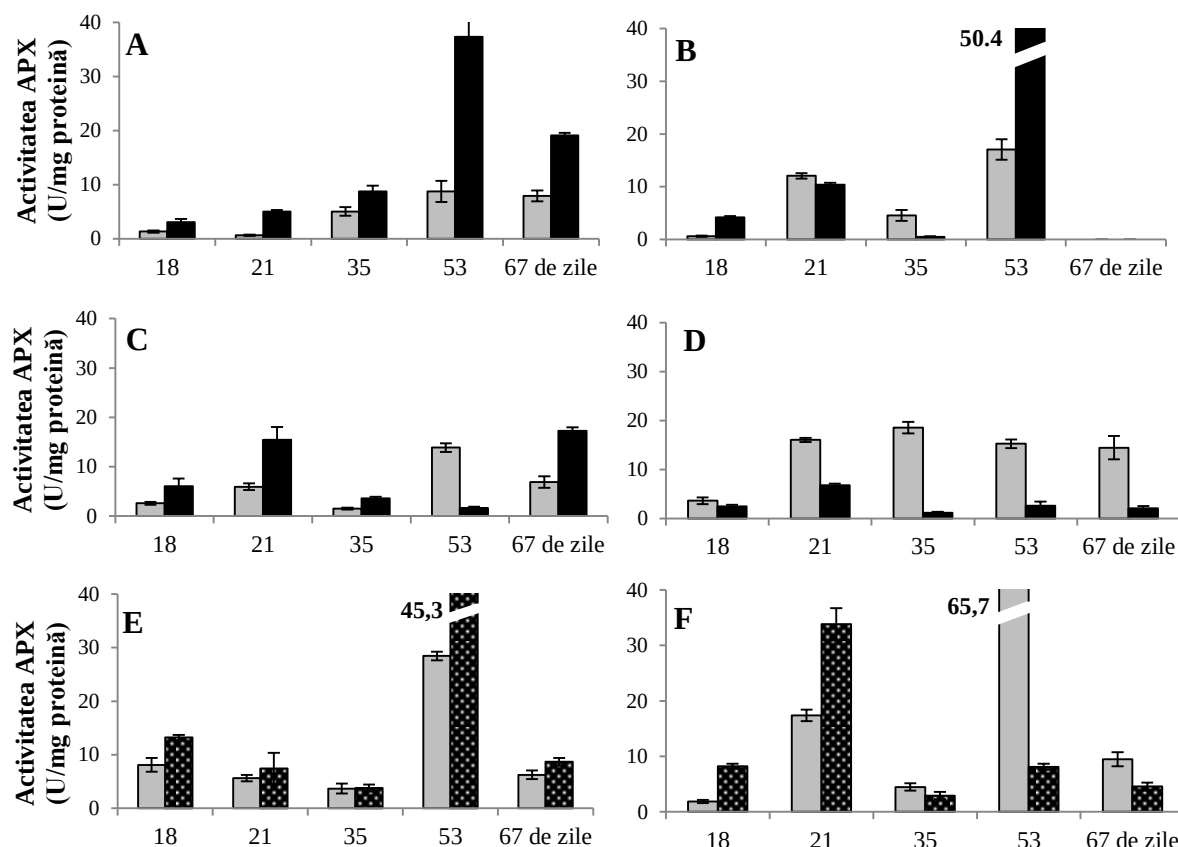


Fig. 3.8. Activitatea ascorbat peroxidazei la diferite genotipuri de floarea-soarelui
A – Favorit R, B – LC-1093A R, C – PR64LE20 R, D – LG-5542 R, E – Performer S, F – LG-5525 S.
□ Martor ■ Cultivat pe fondal de infestare ▨ Infestat

Însă, cultivarea acestora pe substrat cu semințe de lupoaie a determinat sporirea activității enzimelor APX la trei genotipuri rezistente din patru – Favorit R, LC-1093A R și PR64LE20 R (Figura 3.8 A-C). La primele două genotipuri, activitatea APX a atins un maxim de funcționalitate la 53 de zile de 4,3 ori ($p=6*10^{-4}$) mai sporit față de martor la Favorit R și, respectiv, de 3,0 ori ($p=32*10^{-4}$) la LC-1093A R (Figura 3.8 A, B).

La genotipul PR64LE20 R cultivat pe fondal cu semințe de lupoaie, activitatea APX a înregistrat o diferență semnificativă în raport cu martorul la etapa finală de 67 de zile (17,28 / 6,90 U/mg proteină, $p=2*10^{-4}$) (Figura 3.8 C).

O particularitate relevantă a fost pusă în evidență la genotipul rezistent LG-5542 R, care s-a caracterizat prin inhibiția activității APX la formele cultivate în sol cu semințe de lupoaie în raport cu martorul pe parcursul întregii perioade experimentale (Figura 3.8 D).

Formarea patosistemelor dintre genotipurile sensibile și lupoaie a determinat în ambele cazuri intensificarea activității ascorbat peroxidazei la majoritatea etapelor de dezvoltare. Infestarea genotipului Performer S a determinat reducerea activității enzimelor APX începând cu formarea primelor atașamente până la dezvoltarea tuberculilor, urmată ulterior de sporirea bruscă a funcționalității acestor proteine la etapa de dezvoltare a lăstarilor subterani (Figura 3.8 E). Cea mai mare valoare a activității APX la formele infestate față de cele neinfestate a fost evidențiată la etapa de formare a primelor atașamente și a înregistrat o valoare de 1,6 ori mai mare ($p=0,0192$).

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 ($p=8*10^{-4}$) doar la primele etape de atașare a apresorilor la rădăcinile gazdei – 18-21 de zile. Ulterior, mai târziu la 35 și 53 de zile activitatea enzimatică a fost mai diminuată față de martor cu 87,7% ($p=1*10^{-4}$) (Figura 3.8 F).

Generalizând datele privind activitatea ascorbat peroxidazei putem conchide că dinamica parametrului dat per genotip depinde de particularitățile specifice și se manifestă alternativ prin deviații crescânde sporadic.

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 la acțiunea patogenului reacția defensivă se manifestă în mod diferit, în cazul celor două genotipuri sensibile aceasta fiind insuficientă pentru a reduce invazia și dezvoltarea patogenului.

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Genotipurile Performer S și LG-5525 S, cultivate pe fondal de infestare au manifestat un atac intens de către parazit, la toate etapele de dezvoltare ale acestuia, prin formarea tuberculilor și lăstarilor de lupoaie pe rădăcinile plantelor gazdă. Genotipurile rezistente nu au prezentat semne fenotipice de infestare prin absența tuberculilor și lăstarilor fixați pe rădăcinile de floarea-soarelui cultivată pe fondal de infestare.

2. S-a stabilit fortificarea pereților celulari prin depuneri adiționale de lignină și caloză la trei genotipuri rezistente și unul sensibil. Este de remarcă, că cel mai înalt nivel de acumulare a compusului printre genotipurile rezistente a fost atestată la genotipul Favorit R la etapa de 67 de

zile de la cultivare., iar printre genotipurile sensibile s-a remarcat Performer S cu un nivel foarte înalt de depozitare a ligninei.

3. La unele sisteme incompatibile (Favorit R – *O. cumana*, LC-1093A R – *O. cumana*) se activează semnificativ calea de biosinteză și de acumulare a calozei. La plantele din sistemul compatibil Performer S – *O. cumana*, gs-a înregistrat un grad înalt de acumulare a calozei în momentul dezvoltării lăstarilor, însă planta atacată nu mai reușește să opună rezistență față de invazia patogenului.

4. Profilul biochimic privind activitatea enzimei fenilalanin amonia-liazei la genotipurile rezistente și sensibile cultivate în sol cu *O. cumana* a demonstrat sporirea activității PAL la toate genotipurile luate în studiu, doar că la diferite etape ontogenetice. Totuși, este de remarcat că activitatea PAL la anumite etape a corelat cu acumulare suplimentară de lignină numai la trei genotipuri, două rezistente - Favorit R și PR64LE20 R și unul sensibil - Performer S.

5. Activitatea enzimelor SOD atât la plantele martor, cât și la cele supuse stresului au prezentat o tendință de diminuare a activității până la etapele de 21-35 de zile, ulterior urmată de creșterea acesteia până la fazele finale ale cultivării. Genotipurile rezistente cultivate pe fondal de infestare s-au caracterizat prin sporirea activității enzimelor SOD la ultimele etape de dezvoltare, iar la genotipurile sensibile, starea de alarmă prin activitatea crescută a enzimei față de martor s-a menținut pe toată perioada de dezvoltare a patosistemului.

6. Evaluarea răspunsului defensiv prin estimarea dinamicii temporale al activității enzimei ascorbat peroxidazei în cazul sistemelor de compatibilitate și incompatibilitate a permis evidențierea unei tendințe de activitate variată, care s-a manifestat prin deviații alternative în funcție de genotip. Astfel, s-a remarcat genotipurile Favorit R, PR64LE20 R și Performer S la care activitatea enzimei APX a fost mai mare față de martor pe toată perioada de co-cultivare cu patogen. De asemenea, s-a evidențiat genotipul LG-5542 R, care a manifestat activitate a enzimei mai mică în raport cu martorul pe toată perioada de analiză.

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

Rezistența plantelor împotriva patogenilor reprezintă un complex de mecanisme și interacțiuni cum ar fi: sistemul genă-pentru-genă, răspunsul hipersensibil, rezistența sistemică dobândită etc. Mai mult decât atât, studiile genetice sugerează că rezistența la lupoaiă a culturii de floarea-soarelui este determinată de mecanisme poligenice cantitative și calitative [158, 226]. În acest sens un progres în cunoașterea modificărilor expresiei genelor la infestarea cu plantele parazitare a fost inițiată de Westwood și colab. (1998), care a demonstrat activarea specifică a promotorului genei *HMGR* de tomate în răspunsul de apărare a tutunului la atacul *O. aegyptiaca* [298]. Mai recent, Vieira Dos Santos și colab. (2003a) au studiat expresia genelor posibil implicate în răspunsul defensiv la *Arabidopsis thaliana* infestat cu *O. ramosa* [287]. Ulterior, Letousey și colab. (2007), au estimat *pattern*-ele de transcripție a 15 gene implicate în mecanismele de rezistență ale plantelor de floarea-soarelui la infestarea cu lupoaiă. Toate genele identificate în aceste studii au reliefat expresia tranzitorie care a avut loc, în mod surprinzător, în cele mai multe cazuri încă din primele ore de interacțiune, atingând cota maximă peste 2-3 ore, până la penetrarea rădăcinii gazdei de către apresorul agresorului [166]. Aceste gene fac parte din diferite căi metabolice cum ar fi: transducerea semnalelor, sinteza proteinelor asociate patogenizei, 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, iar în urma analizelor histochemice și biochimice a patru genotipuri rezistente și a două sensibile, au fost selectate doar trei genotipuri pentru analizele moleculare ulterioare. Astfel, s-a remarcat genotipul rezistent Favorit care a manifestat mecanisme de rezistență de la etapa de 35 de zile (acumulare de lignină și caloză, activitate sporită a enzimei PAL). De asemenea, genotipul rezistent PR64LE20 s-a caracterizat prin același răspuns doar că la ultima etapă de 67 de zile. Dintre genotipurile sensibile a fost selectat Performer, care a înregistrat 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 și activitatea enzimatică a proteinei PAL a condus la studiul expresiei genelor implicate în calea de biosinteză a acestui compus. Astfel, în baza informațiilor din portalul NCBI și instrumentelor bioinformatic

disponibile au fost selectate 14 gene și EST-uri ale diferitor căi metabolice cu grad înalt de omologie cu genele care participă în răspunsul la stresul biotic al diferitor specii de plante.

Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul fenilalaninei a fost studiată la plantele de *Arabidopsis* infestate cu *O. ramosa*, prezentând în cele mai multe cazuri o expresie tranzitorie în primele ore de interacțiune [287], precum și la plantele de tutun parazitate de *O. aegyptiaca* [298]. La *Arabidopsis*, au fost identificate patru gene care codifică biosinteza enzimei PAL, două (*AtPAL1* și *AtPAL2*) dintre care au manifestat activitate indusă de acțiunea nefavorabilă a factorilor de mediu [234], în timp ce la cartof și tomate s-a constatat o familie multigenică cu expresie spațial și temporal diferențiată, care determină sinteza unei familii de proteine [61]. Reglarea diferențiată a expresiei genelor *PAL* este descrisă și la *Populus* spp., fiind demonstrat că *PtPAL1* este activă în celulele tulpinilor, frunzelor și rădăcinilor nelignificate, acumulându-se tanine, în timp ce transcrierea *PtPAL2* este indusă în țesuturile lignificate și cele cu conținut scăzut de compuși fenolici [149].

La floarea-soarelui până în prezent a fost descrisă o singură genă *PAL*, care analizată concomitent cu gena cinamat 4-hidroxilaza (*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 [166]. De asemenea, pentru studiul de față au mai fost selectate două gene din această cale: 4-coumarate-CoA ligaza (*4CL1*) și acidul ferulic 5-hidroxilaza 1 (*FAH1*).

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 în momentul co-cultivării plantelor de floarea-soarelui cu lupoaie. Astfel, studiul histochimic al țesutului radicular, activitatea enzimei PAL și a genelor *PAL*, *C4H*, *4CL1*, *FAH1*, conturează nivelul de fortificare a pereților celulari prin depunerile de lignină sub acțiunea stresului biotic.

În studiul de față, activitatea transcripțională a genelor implicate în calea de biosinteză a ligninei a prezentat valori ale expresiei relative cuprinse între 0,001-3,117 un. c. pentru gena *PAL*, 0,003-1,267 un. c. pentru gena *C4H* și 0,003-0,444 un. c. pentru gena *FAH1*. Pentru gena *4CL1* valorile au fost cuprinse într-un diapazon foarte vast de la 0,04 până la 330,4 un. c. (Tabelul 4.1).

Analiza nivelului de expresie a genelor studiate exprimată în raport exp./martor la genotipul Favorit R supus cultivării în substrat infestat a prezentat un tablou variat al activității transcripționale. Astfel, se remarcă două gene *4CL1* și *FAH1* care pe parcursul perioadei de cultivare și-au modificat esențial expresia (Figura 4.1).

Tabelul 4.1. Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul ligninei

Genotip		Etape de cultivare (zile)	Expresia relativă a genelor (un. c.)			
			<i>PAL</i>	<i>C4H</i>	<i>4CL1</i>	<i>FAH1</i>
Favorit R	Martor	18	2,100±0,087	0,473±0,090	0,140±0,010	0,184±0,041
		21	0,971±0,133	0,469±0,055	0,048±0,016	0,087±0,006
		35	1,057±0,121	0,658±0,114	0,040±0,003	0,220±0,038
		53	2,883±0,176	1,049±0,182	0,083±0,004	0,169±0,022
		67	0,074±0,006	0,251±0,045	1,362±0,105	0,071±0,013
	Cultivat pe fondal de infestare	18	2,733±0,321	0,362±0,113	0,043±0,011	0,163±0,011
		21	1,633±0,076	0,450±0,132	0,042±0,005	0,444±0,051
		35	0,875±0,097	0,630±0,027	0,073±0,008	0,073±0,023
		53	3,117±0,104	0,612±0,085	0,227±0,041	0,112±0,037
		67	0,135±0,042	0,169±0,040	0,595±0,013	0,094±0,013
PR64LE20 R	Martor	18	1,917±0,126	1,267±0,161	1,103±0,046	0,179±0,012
		21	0,003±0,001	0,064±0,007	0,358±0,025	0,005±0,001
		35	0,367±0,048	0,488±0,047	0,485±0,012	0,198±0,018
		53	0,701±0,092	1,213±0,081	0,656±0,035	0,187±0,030
		67	0,014±0,004	0,145±0,004	13,087±0,422	0,122±0,017
	Cultivat pe fondal de infestare	18	1,800±0,100	0,467±0,133	0,516±0,007	0,217±0,018
		21	0,001±0,000	0,003±0,001	0,379±0,026	0,003±0,002
		35	0,245±0,068	0,647±0,085	0,283±0,025	0,105±0,013
		53	1,117±0,126	0,463±0,056	0,599±0,122	0,177±0,018
		67	0,051±0,011	0,190±0,018	2,458±0,237	0,062±0,008
Performer S	Martor	18	2,483±0,076	0,508±0,180	0,361±0,024	0,276±0,053
		21	0,558±0,064	0,539±0,113	0,285±0,027	0,141±0,017
		35	0,626±0,115	1,038±0,074	0,411±0,014	0,142±0,008
		53	0,615±0,073	0,438±0,016	0,271±0,043	0,068±0,002
		67	0,006±0,001	0,185±0,047	330,400±19,650	0,062±0,007
	Infestat	18	1,680±0,147	0,497±0,088	0,381±0,009	0,361±0,049
		21	0,871±0,100	0,365±0,009	0,400±0,023	0,256±0,041
		35	0,928±0,053	1,183±0,076	0,774±0,102	0,310±0,012
		53	1,533±0,225	0,911±0,069	0,722±0,036	0,327±0,026
		67	0,543±0,045	0,366±0,011	4,250±0,477	0,079±0,008

Valorile prezentate $\bar{x} \pm S$ (media±deviația standard a eșantionului); valoarea expresiei relative calculată după formula ΔCt .

Transcriptul *4CL1* inițial a fost subexpresat de 3,3 ori față de martor, ulterior și-a sporit activitatea prin supraexpresie de 1,8 ori și, respectiv, 2,7 ori față de martor, după 35 și 53 de zile de cultivare, iar la 67 de zile să scadă brusc în subexpresie de 2,3 ori (Figura 4.1). Gena *FAH1* a manifestat și ea două extreme în activitatea sa, prin supraexpresie la 21 de zile de 5,1 ori și subexpresie la 35 zile de 3 ori față de martor. Conținutul de ARNm al genelor *PAL* și *C4H* își mențin activitate în limita martorului cu unele abateri nesemnificative (Figura 4.1) [8].

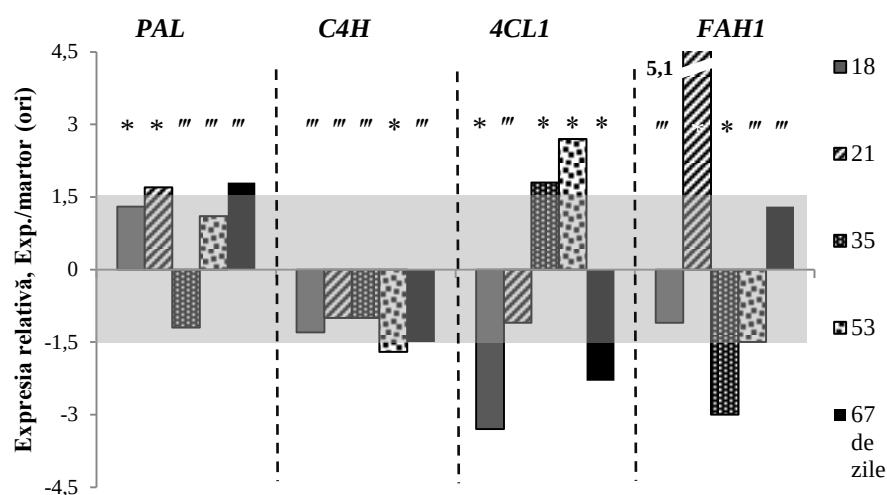


Fig. 4.1. Expresia relativă a genelor: *PAL*, *C4H*, *4CL1*, *FAH1* (fold change) la genotipul Favorit R

*Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), "p>0,05, *p<0,05.*

Activitatea transcripțională a genelor metabolismului ligninei la genotipul PR64LE20 R a fost diferită față de primul genotip. Astfel, gena *PAL* a manifestat activitate variată față de celelalte gene (subexpresie de 2,7 ori la 21 de zile și apoi supraexpresie de 3,7 ori la 67 de zile), iar genele *4CL1*, *C4H* și *FAH1* au prezentat valori cuprinse în limitele martorilor sau subexpresie (Figura 4.2). Astfel, genele *4CL1* și *FAH1* au înregistrat valori maxime de subexpresie de 5,3 ori și, respectiv, de 2 ori la etapa de 67 de zile, iar gena *C4H* de 25,7 ori la etapa 21 de zile (Figura 4.2) [8].

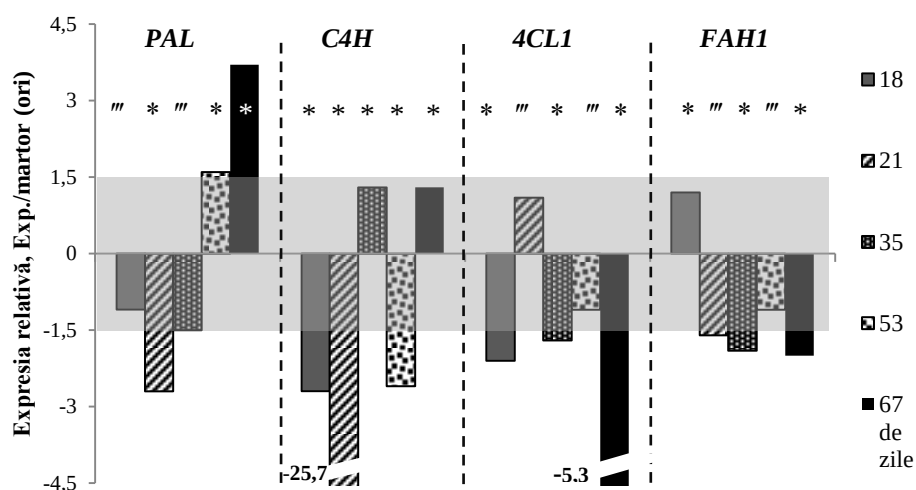


Fig. 4.2. Expresia relativă a genelor: *PAL*, *C4H*, *4CL1*, *FAH1* (fold change) la genotipul PR64LE20 R

*Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), "p>0,05, *p<0,05.*

Nivelul transcripțiilor analizați la momentul formării primelor atașamente dintre lupoaie și genotipul Performer S a manifestat valori cuprinse în limitele normei de reacție pentru toate cele patru gene, cu unele mici excepții de supraexpresie (Figura 4.3). Totodată, s-a relevat supraexpresia transcripțională a trei (*PAL*, *C4H*, *FAH1*) din cele patru gene la etapa de formare a lăstarilor subterani și aerieni cu valori maxime de 85,7 ori pentru *PAL*. Important de menționat faptul că, gena *4CL1* prezintă o intensificare a răspunsului, însă spre deosebire de *PAL*, este determinată de un efect de subexpresie majoră de 77,7 ori (Figura 4.3) [8].

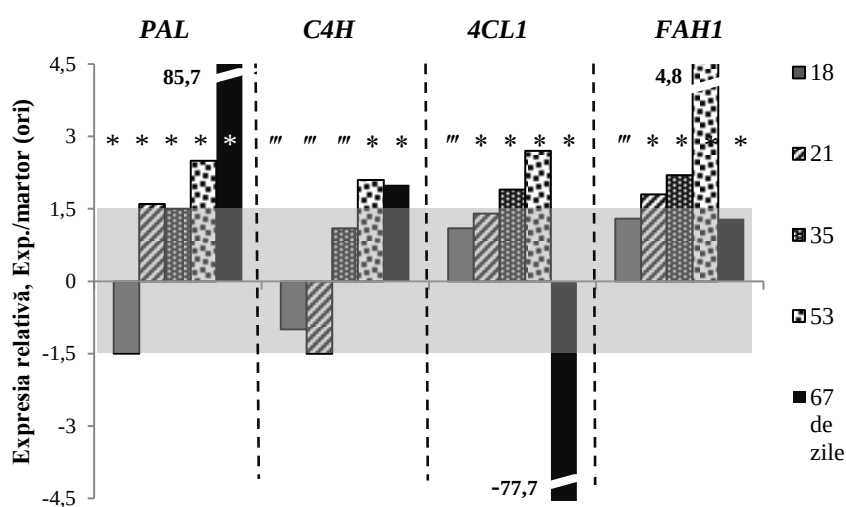


Fig. 4.3. Expresia relativă a genelor: *PAL*, *C4H*, *4CL1*, *FAH1* (fold change) la genotipul Performer S

*Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), "p>0,05, *p<0,05.*

Datele obținute indică intensificarea semnificativă a stării de stres, manifestată prin ritmul mult mai sporit în acumularea secvențelor transcrise și a conținutului de lignină comparativ cu cel al activității enzimei *PAL* în cadrul patosistemului Performer S – *O. cumana* activate după formarea conexiunilor haustoriale ce reprezintă mecanisme defensive *post-haustoriale*. Astfel, ipoteza despre fortificarea pereților celulari prin intermediul ligninei ca răspuns al atacul lupoaie a fost confirmată, atât la nivel molecular cât și biochimic și histochimic, însă la fazele finale ale dezvoltării patosistemului (Figura 3.5; 3.8 E; 4.3). Posibil genotipul Performer S nu prezintă anumite elemente de reglare ale activității metabolismului ligninei de la primele etape de infestare sau acestea pot fi inhibitate de factori exogeni de natură patogenă. Totuși, sunt necesare investigații suplimentare pentru un studiu deplin al activității transcripționale și biochimice ale enzimelor respective la floarea-soarelui supusă stresului biotic.

Co-expresia genelor *C4H*, *4CL1*, *FAH1* și *PAL*, exprimă tendințe similare în funcție de particularitățile genetice ale hibrizilor analizați, puse în evidență la grupul de analiză *PAL*

transcript – proteină. Astfel, dinamica modificării conținutului de transcripti care formează profilul sumar de expresie al genotipului Favorit R ca răspuns la stresul biotic prezintă fluctuații de o intensitate aproximativ egală și care tind să se stabilizeze în limitele normei fiziologice (Figura 4.4).

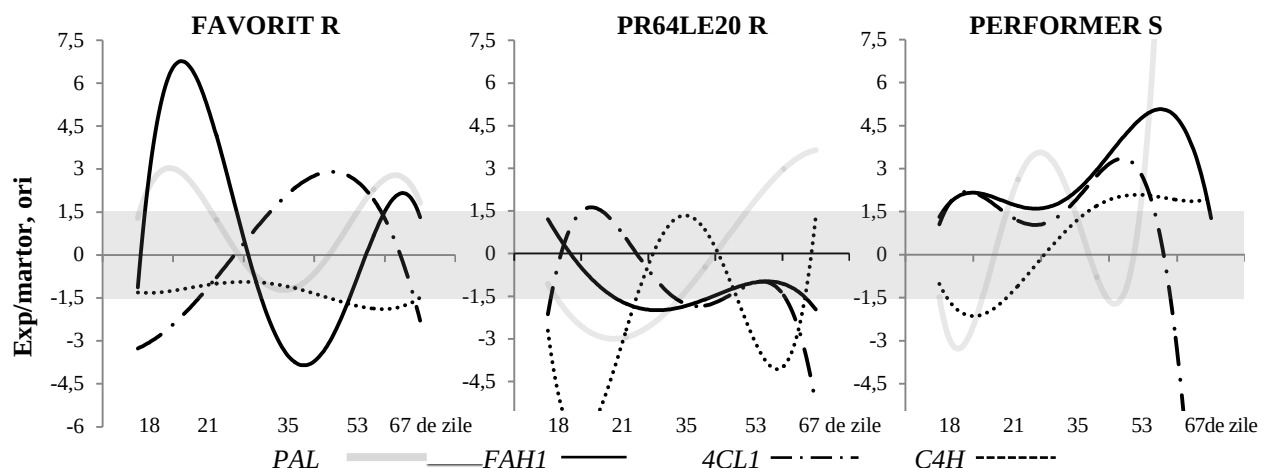


Fig. 4.4. Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor din calea de biosinteză a ligninei ($R^2=1$)

Efectele alternante de inducere/represie atât în cadrul manifestării temporale a unei gene, cât și al întregului grup demonstrează modul coordonat de reglare a activității acestora ca răspuns la stresul celular. *Pattern*-ele de expresie genică similare după intensitate dar opuse după efectul (stimulare/inhibare) indus de factorul stresogen au fost asociate în mai multe investigații cu un răspuns celular general în cazul rezistenței nespecifice [58].

O particularitate relevantă caracteristică genotipurilor studiate atât la plantele neinfestate, cât și la cele infestate este profilul expresiei modificate al genei *PAL* și *4CL1* asemănător după intensitate, însă cu răspunsuri diferite. Inducerea sporită a transcripției *PAL* concomitent cu represiia genei *4CL1* indică o acțiune de reglare biochimică de *retro*-inhibiție. Co-supresie în raport cu *PAL* se observă și la gena *C4H* cu un efect mai accentuat la PR64LE20 R (Figura 4.4). Faptul că produsele de expresie a genelor *C4H* și *4CL1* se află în aval de *PAL* în calea metabolică a fenilpropanoizilor (Figura 1.2) sugerează că reglarea negativă este declanșată nu numai de produsul direct al reacției catalizate de această enzimă dar și de alte entități intermediare rezultate din metabolismul fenilalaninei. Constatările emise sunt confirmate și de datele altor cercetători, care au determinat prin studii metabolomice că conținutul transcriptilor și cel al enzimei *PAL* este reglat prin inhibiție *feedback* alosterică de acidul trans-cinamic – produsul reacției enzimatice și substratul enzimei *C4H* [44].

Conform tendinței conturate în activitatea de expresie a genei *PAL*, se poate constata capacitatea înaltă a genotipului Favorit R de a menține un echilibru homeostatic al parametrilor interni (fluctuații de intensitate mică comparativ egale) pe întreaga perioadă de acțiune a factorului stresogen (Figura 4.5). Modificările tranzitorii în acumularea transcripților corelată indirect cu cea a produșilor de expresie, demonstrează reglarea nivelului cantitativ al proteinei funcționale PAL (Figura 3.8 A), astfel încât, să corespundă stării fiziologice noi, adaptive, condiționată de semințele de *O. cumana* din rizosferă. Menținerea fluctuațiilor din contul rezervei funcționale și mecanismelor de homeostatare, pe întreaga perioadă de studiu, relevă semnalizarea celulară continuă, deși cu o intensitate mai mică a factorului de stres [12]. În favoarea acestei concluzii sunt acumulările de lignină în endoderm (Figura 3.5) care indică asupra unor procese defensive *post-atașament*.

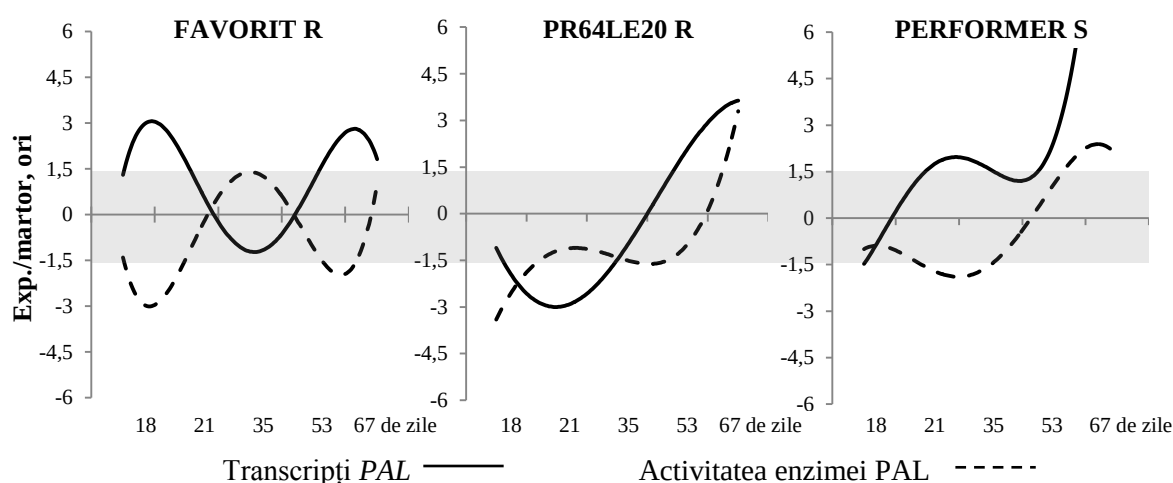


Fig. 4.5. Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genei *PAL* și activității enzimei fenilalanin amonia-liazei ($R^2=1$)

Capacitatea de reglare a celui de-al doilea genotip rezistent – PR64LE20 R în formarea răspunsului defensiv indus de semințele de lupoai nu s-a caracterizat prin periodicitate și ritm similar genotipului Favorit R. Tendința de minimalizare a devierilor de la normă este de o durată mai lungă și tinde spre o contrabalansare a efectului de diminuare a nivelului expresiei genice și translării doar peste 53-67 de zile de analiză (Figura 4.5). Reacțiile de apărare manifestate prin impregnarea pereților celulari cu fenilpropanoide se constată cu cca 30-40 de zile mai târziu comparativ fenomenului observat la Favorit R (Figura 3.5). Fenotipul neafectat de *O. cumana* al acestor plante asociat cu profilul temporal al perturbațiilor la nivel de transcripție, sinteza enzimei PAL și ulterior a metabolitului studiat 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 Favorit R și PR64LE20 R la care s-au constatat reacții compensatorii, coordonate în acumularea transcripturilor, proteinei și ligninei fără a perturba creșterea și dezvoltarea plantelor de floarea-soarelui pe fondal de infestare, în cazul genotipului Performer S se observă o intensificare semnificativă a stării de stres, manifestată prin ritmul mult mai sporit în acumularea secvențelor transcrise (Exp./martor – de 85,7 ori) comparativ cu cel al activității enzimei PAL (Exp./martor – 1,4 ori) (Figura 4.5). Această destabilizare a stării fiziologice poate fi relaționată unor deficiențe în procesarea post-transcripțională a produșilor de expresie. Datele obținute sunt în concordanță cu constatările altor autori care au demonstrat pe diferite modele experimentale că amplitudinea abaterii nivelului de expresie a genelor este direct proporțională cu gradul de severitate a factorului de stres [115]. Mai mult ca atât, s-a observat că moartea celulară survine deseori atunci, când starea de stres cauzează devieri în activitatea de transcripție, care depășesc nivelul în normă mai mult de 100 de ori [115].

În pofida faptului că depunerile de lignină în celulele țesutului radicular sunt mai mari comparativ cu cele evidente la genotipul Favorit R (Figura 3.5), integritatea peretelui celular este perturbată de haustoriul plantelor parazite. Apariția lăstarilor aeriени de *O. cumana* pe plantele genotipului Performer S (Figura 3.3) cauzează o stare de epuizare a acestora, devenind susceptibile la diverse infecții și leziuni incompatibile cu ritmul normal de creștere și dezvoltare caracteristic speciei. Plantele afectate de lupoaie au avut înălțimea cu 40% mai mică decât plantele martor, neajungând la faza de butonizare (Tabelul 3.1).

În baza datelor obținute se remarcă corespunderea profilului morfologic cu cel molecular al genotipului Favorit R în manifestarea rezistenței la *O. cumana*. Genotipul PR64LE20 R, spre deosebire de Favorit R, care s-a caracterizat printr-o bună capacitate de reglare în stabilizarea stoichiometrică a parametrilor studiați, a manifestat o stare de alarmă, aproape pe întreaga perioadă, exprimată preponderent prin represia sintezei ARNm a celor patru gene și a enzimei PAL. Neafectarea creșterii și dezvoltării plantelor în contrast cu fluctuații mari în activitatea de expresie a genelor, enzimei și conținutului de lignină sugerează asupra unei strategii a organismului de a direcționa energia metabolică spre obținerea unei stări fiziologice optime pentru adaptare și dezvoltare a rezistenței la stres, determinată de prezența genelor specifice de rezistență la *O. cumana* (*Or1-7*).

Genotipului Performer S se caracterizează prin corelația aspectului morfologic întârziat în dezvoltare cu profilul molecular, indicând asupra unei incapacități a organismului de minimalizare a fluctuațiilor parametrilor analizați, cauzând pierderi de energie și substanță, importante în procesele de apărare, afirmații susținute de constatările expuse în literatura de specialitate care afirmă că formarea complexului enzimatic de transcripție, translare și procesare

a produselor de expresie genică necesită rezerve substanțiale de energie metabolică [58]. De aceea nu este surprinzător faptul că procesele menționate sunt rapid supresate în funcție de intensitatea factorului de stres biotic sau abiotic.

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

Investigațiile efectuate de două grupe de cercetători Jacobs și colab. (2003) și Nishimura și colab. (2003) prezintă contribuții majore în elucidarea diferitor aspecte ale metabolismului calozei. Autorii au oferit pentru prima dată informații despre rolul biologic al proteinelor funcționale implicate în biosinteza calozei [137, 205]. Diverse studii realizate la *Arabidopsis* indică acumularea calozei sub acțiunea secetei și al patogenilor în rezultatul activării unei și aceleiași gene cu diferite adnotări, descrisă inițial ca *PMR4* (*Powdery Mildew Resistant4*), apoi *GSL5* (*Glucan-Synthase Like 5*) sau *CalS12* (*Callose Synthase genes*) [62, 93].

Se consideră că formarea papilelor de caloză este un răspuns de apărare precoce [249]. 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. Cu toate că polimerul glucanic este implicat în diverse procese biologice, informațiile despre valențele funcționale ale acestuia și reglarea metabolismului sunt fragmentare.

Actualmente, la floarea-soarelui este identificată o familie de 4 gene care codifică glucan sintaze (*GSL1-4*). Conform literaturii de specialitate, dintre acestea, doar *GSL1* a prezentat activitate de transcripție în țesut calusal inoculat cu lupoai de plantulelor crescute *in vitro*, începând cu prima zi de infestare și până la ziua a 8-a [166]. Până în prezent, publicațiile din domeniu conțin doar aceste rezultate. Însă, nu se cunoaște care este activitatea *GSL1-4* în funcție de condițiile schimbătoare de mediu, interacțiunea dintre ele și activitatea altor gene asociate metabolismului calozei la plantele gazdă cultivate *in vivo* la diferite etape de invazie a patogenului. În bazele de date genomice au fost identificate aceste gene ale căror secvență a servit ca matriță în elaborarea *primeri*-lor pentru cuantificarea transcripților în condiții de stres biotic [166, 327].

Nivelul de expresie a genelor glucan sintazelor în studiul de față a indicat valori cuprinse între 0,005-0,256 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* a fost caracteristic valori ale expresiei relative cuprinse între 0,010-0,093 un. c. și, respectiv, 0,002-0,051 un. c. (Tabelul 4.2).

În cadrul sistemului de incompatibilitate gazdă – parazit (Favorit R - lupoai), 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, la 53 de zile fiind inhibată. În 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 4.6).

Tabelul 4.2. Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul calozei

Genotip		Etapă de cultivare (zile)	Expresia relativă a genelor (un. c.)			
			<i>GSL1</i>	<i>GSL2</i>	<i>GSL3</i>	<i>GSL4</i>
Favorit R	Martor	18	0,015±0,004	0,022±0,006	0,008±0,003	0,015±0,002
		21	0,124±0,037	0,047±0,013	0,009±0,001	0,101±0,005
		35	0,011±0,002	0,039±0,004	0,005±0,001	0,032±0,004
		53	0,033±0,008	0,032±0,004	0,013±0,000	0,020±0,004
		67	0,016±0,003	0,018±0,002	0,003±0,000	0,002±0,001
	Cultivat pe fondal de infestare	18	0,047±0,014	0,032±0,004	0,019±0,003	0,020±0,004
		21	0,196±0,075	0,032±0,006	0,006±0,001	0,955±0,320
		35	0,020±0,003	0,065±0,004	0,012±0,001	0,043±0,005
		53	0,033±0,007	0,016±0,002	0,006±0,001	0,027±0,003
		67	0,005±0,001	0,019±0,003	0,004±0,001	0,020±0,006
PR64LE20 R	Martor	18	0,016±0,003	0,019±0,003	0,013±0,002	0,018±0,004
		21	0,256±0,031	0,038±0,017	0,008±0,000	1,800±0,265
		35	0,009±0,002	0,043±0,001	0,006±0,001	0,094±0,026
		53	0,019±0,005	0,021±0,001	0,005±0,001	0,015±0,001
		67	0,025±0,012	0,012±0,000	0,000±0,000	0,003±0,001
	Cultivat pe fondal de infestare	18	0,021±0,005	0,016±0,003	0,011±0,002	0,014±0,002
		21	0,101±0,018	0,023±0,008	0,009±0,003	0,273±0,020
		35	0,008±0,002	0,021±0,003	0,004±0,001	0,017±0,003
		53	0,015±0,006	0,010±0,002	0,003±0,001	0,008±0,002
		67	0,023±0,004	0,020±0,004	0,003±0,002	0,033±0,012
Performer S	Martor	18	0,029±0,001	0,023±0,003	0,014±0,002	0,029±0,005
		21	0,043±0,009	0,019±0,002	0,007±0,001	0,183±0,045
		35	0,008±0,002	0,041±0,007	0,009±0,003	0,036±0,010
		53	0,040±0,003	0,093±0,007	0,051±0,005	0,151±0,028
		67	0,015±0,001	0,011±0,002	0,002±0,000	0,021±0,001
	Infestat	18	0,020±0,001	0,021±0,005	0,020±0,003	0,032±0,004
		21	0,039±0,004	0,052±0,004	0,011±0,001	0,095±0,014
		35	0,018±0,001	0,030±0,008	0,003±0,000	0,035±0,011
		53	0,015±0,005	0,033±0,003	0,005±0,001	0,017±0,004
		67	0,013±0,001	0,021±0,002	0,009±0,003	0,013±0,005

Valorile prezentate $\bar{x} \pm S$ (media±deviația standard a eșantionului); valoarea expresiei relative calculată după formula ΔCt .

Aceste deviații în activitatea glucan-sintazelor ar putea fi asociate cauzal cu anumite interconexiuni biochimice de semnalizare dintre rădăcinile gazdei și semințele germinate de lupoaie, în vederea unor eventuale atașări și dezvoltarea haustorului. De menționat faptul că,

acumularea papilelor de caloză la acest genotip a fost observată în celulele cilindrului central, mai târziu, peste 35 de zile, cu o dinamică pozitivă până la 67 de zile (Figura 3.7).

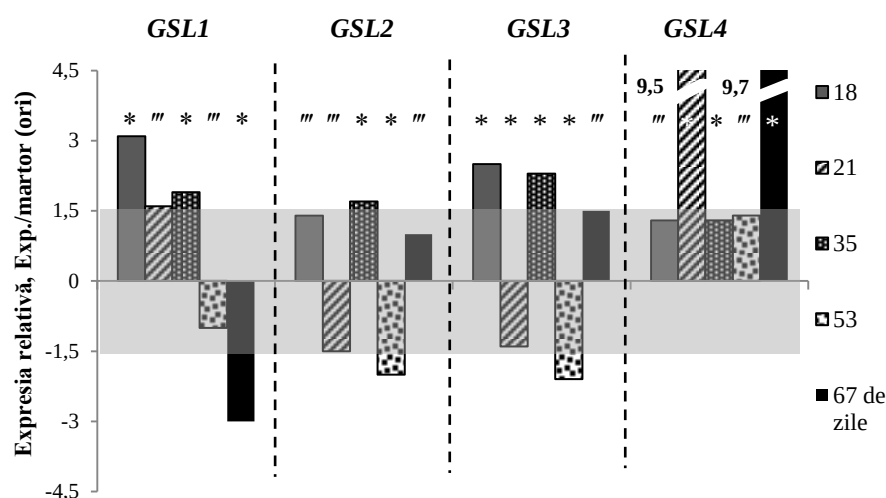


Fig. 4.6. Expresia relativă a genelor *GSL1-4* (fold change) la genotipul Favorit R
Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), ** $p > 0,05$, * $p < 0,05$.

Al doilea genotip rezistent s-a caracterizat prin aspecte diferite ale activității genelor față de primul. Astfel, PR64LE20 R a prezentat următorul profil de expresie: transcriptul *GSL4* a indicat aceeași tendință a valorilor cantitative a ARNm, similare cu gena *GSL2*, prin subexpresie la 18-53 de zile, urmată de supraexpresie la 67 de zile, doar că valorile pentru *GSL2* au fost puțin mai mici față de martor (Figura 4.7). Gena *GSL3* a cuprins valori în limitele martorului la toate etapele de analiză, iar *GSL1* a fost subexpresată doar la 21 de zile de cultivare pe fondal de infestare (Figura 4.7).

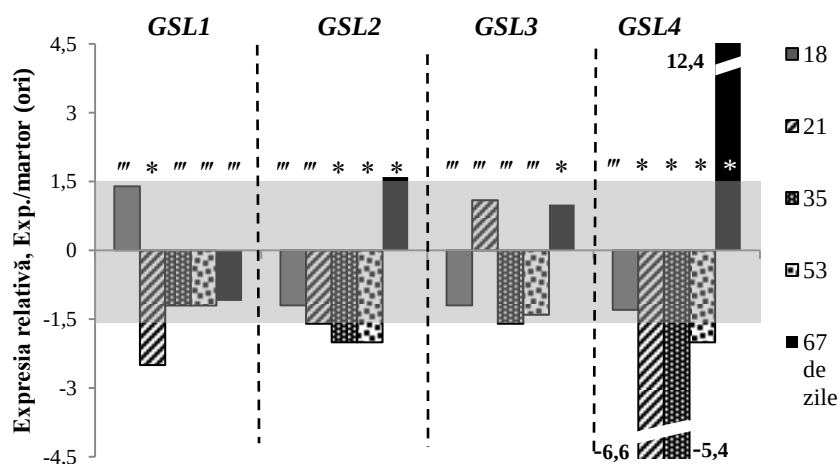


Fig. 4.7. Expresia relativă a genelor *GSL1-4* (fold change) la genotipul PR64LE20 R
Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), ** $p > 0,05$, * $p < 0,05$.

Analiza activității genelor glucan-sintazei pentru evidențierea mecanismelor *post-atașament* și *post-haustoriale* la plantele genotipului Performer S infestat a relevat valori mai mari față de martor în majoritatea cazurilor. Gena *GSL1* a indicat un nivel de expresie mai intens de 2,3 ori față de martor la etapa de formare a lăstarilor subterani (35 de zile), atunci când deja s-a produs infestarea și patogenul s-a conectat la sistemul conducător al rădăcinii gazdei, urmată de subexpresia de 2,7 ori la etapa de dezvoltare a lăstarilor subterani (Figura 4.8). Activitatea genei *GSL4* a prezentat valori în limitele martorului și de subexpresia la toate etapele de dezvoltare a patosistemului cu un maxim de 9,1 ori (Figura 4.8).

Evaluarea profilului de transcripție a genelor *GSL2* și *GSL3* a prezentat tendință similară a activității glucan-sintazei și a pus în evidență valori crescute de 2,8 ori și, respectiv, de 1,9 ori pentru gena *GSL2*, iar pentru secvența *GSL3* de 1,6 ori și, respectiv, de 3,7 ori la două etape - de formare a primelor atașamente (21 de zile) și dezvoltare a lăstarilor aerieni (67 de zile) la formele cultivate în sol infestat (Figura 4.8). Însă, activitatea genelor între 21 și 67 de zile a fost inhibată pentru ambele gene cu un maxim de 2,9 ori pentru *GSL2* și de 10,7 ori pentru *GSL3* [15].

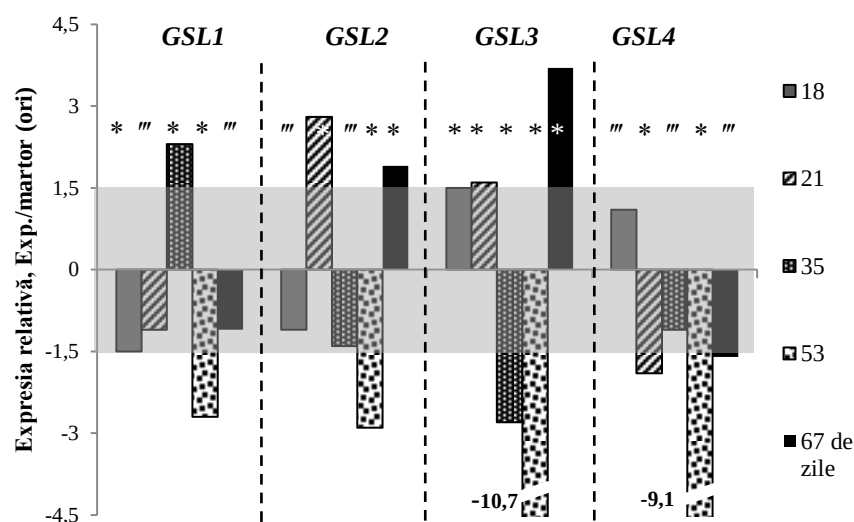


Fig. 4.8. Expresia relativă a genelor *GSL1-4* (fold change) la genotipul Performer S
Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (*t test*), $^{***}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$.

Discordanță temporală a depunerilor de caloză în raport cu activitatea de transcripție a *GSL*, observată poate fi explicată prin specificul evenimentelor de procesare post-transcripțională a produselor de expresie [15].

Studii moleculare și histologice realizate de alți cercetători pe rădăcinile rezistente de floarea-soarelui penetrate de *O. cumana* au arătat o supra-expresie a genei *HaGSL1*, începând cu prima zi până la a opta zi după inoculare, iar prin microscopie de epifluorescență a fost atestată

depunerea intensă de caloză la interfața dintre gazdă - parazit și în țesuturile rădăcinii, sub punctul de atașare a apresorului [166].

Echevarría-Zomeño și colab. (2006) au identificat depuneri disperse de caloză în apropierea zonei de infestare, în celulele care nu sunt în contact direct cu planta parazit [90], rezultate contrare celor raportate la mazărea infestată cu *O. crenata* [221] și alte patosisteme, unde caloza s-a acumulat în celulele direct învecinate cu patogenul.

Verma și Hong (2001) au demonstrat la *Arabidopsis* o specificitate funcțională a fiecărui membru din familia de 12 gene *GSL* [285]. La infecția acestei plante cu mucegaiul *Blumeria graminis*, au fost observate depuneri de caloză la punctul de penetrare, iar din membrii familiei *GSL* doar *AtGSL5* a fost implicată în formarea papilelor de caloză [137].

Transcrierea genei *VfGSL5* la *Vicia faba* infestată cu *Puccinia striiformis* a manifestat o activitate crescută de la a 12-a zi până la a 24-a zi de infecție, după care a scăzut semnificativ [63].

Astfel, generalizând rezultatele obținute la genotipurile rezistente Favorit R și PR64LE20 R, se constată legități similare în acumularea calozei sub acțiunea stresului biotic la nivelul cortexului (celulele în contact direct cu patogenul) și al cilindrului central (țesut ce nu comunică cu patogenul), observate și de alți autori la patosistemele descrise.

Rezultate deosebite celor obținute de noi, sunt cele arătate de Letousye și colab., (2007) care au constatat modificarea activității transcripționale doar a unei singure gene (*HaGSL1*) din cele 4 variante investigate în țesutul calusal de floarea-soarelui (LR1) infestat cu lupoaie (rasa E) [166]. Aceste rezultate pot fi explicate prin utilizarea materialului biologic diferit și a altor condiții experimentale (cultivarea *in vitro* a țesutului de floare-soarelui infestat cu semințe germinate de lupoaie, populații și rase diferite de lupoaie etc.).

Conform tendinței conturate în activitatea expresiei genelor *GSL1-4* se poate constata capacitatea sporită a genotipului Favorit R în menținerea echilibrului homeostatic prin activarea concomitentă a genelor *GSL2-3* (fluctuații de aceeași intensitate și periodicitate) pe toată perioada de co-cultivare cu semințe germinate de lupoaie (Figura 4.9). *Pattern*-ele de expresie genică a transcripților *GSL1* și *GSL4* opuse după efectul de stimulare/inhibare (Figura 4.9), induse de factorul stresogen au fost asociate în mai multe investigații cu un răspuns celular general în cazul rezistenței nespecifice [58]. Totuși, dinamica sumară a activității genelor glucan sintazelor prezintă fluctuații de o amplitudă aproximativ egală și care au tendința de stabilizare în limitele normei fiziologice cu excepția genei *GSL4*.

Al doilea genotip rezistent PR64LE20 R s-a caracterizat printr-o tendință de minimalizare a devierilor în limita martorului, cu excepția transcriptului *GSL4* care a prezentat inhibiția expresiei și ritm diferit în activitatea acestuia (Figura 4.9).

Genotipul sensibil Performer S s-a caracterizat printr-o alternanță diferită între activitatea transcripturilor *GSL1-4*, totuși, se manifestă tendințe similare pentru toți cei patru transcripturi (Figura 4.9). Astfel, activarea mecanismelor *post-atașament* și *post-haustoriale* prin expresia genelor glucan-sintazelor determină incapacitatea organismului de minimalizare a fluctuațiilor parametrilor analizați și corespunderea fenotipului morfologic întârziat în dezvoltare cu profilul molecular în rezultatul infestării cu patogen.

Analiza comparativă a activității de transcripție a patru gene care codifică glucan-sintazele în trei variante de studiu: normă, incompatibilitate patogen-gazdă și patosistem a demonstrat profile diferite de expresie în cazul unei și aceleași reacții fiziologice (rezistență) [15].

În combinația incompatibilă Favorit R – *O. cumana*, toate cele patru gene *GSL* s-au caracterizat prin supraexpresie cu 260%, în special în primele etape de stabilire a conexiunilor mediate chimic cu semințele germinate de lupoaie.

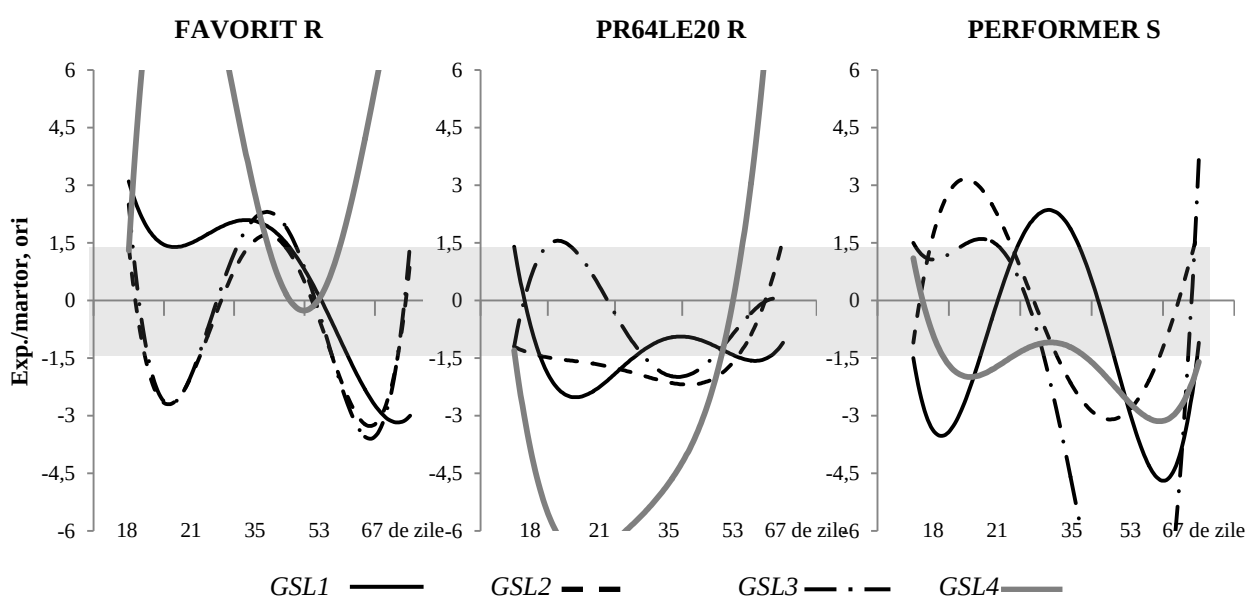


Fig. 4.9. Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor glucan-sintazelor ($R^2=1$)

În cazul patosistemului Performer R – *O. cumana* sporirea conținutului de transcripturi a trei gene coincide cu invazia patogenului: *GSL1* după formarea haustoriilor, iar *GSL2* și *GSL3* la formarea primelor atașamente și dezvoltarea lăstarilor aerieni.

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 [15].

4.3. Expresia genelor codificatoare de enzime antioxidante

Una dintre primele modificări biochimice observate după recunoașterea patogenului este explozia oxidativă ce determinată generarea SRO [185]. Nivelurile excesive de SRO sunt potențial dăunătoare structurii și funcțiilor celulare dacă nu vor fi detoxificate prin sistemele antioxidante. Prevenirea toxicității SRO necesită activarea așa numitei „rețea de gene SRO”, care este compus din cel puțin 150 de gene la *Arabidopsis* [191]. Sistemul de apărare antioxidantă a plantelor, include compuși enzimatici și non-enzimatici [314]. Enzimele de protecție includ catalazele, ascorbat peroxidazele, guaiacol peroxidazele și superoxid dismutazele.

4.3.1. Profilul transcripțional al genelor ce codifică superoxid dismutazele

Studiul biochimic realizat în cazul a șase genotipuri expuși la infestarea artificială cu lupoaie a scos în evidență tendința de diminuare a activității SOD până la etapele de 21-35 de zile ulterior urmată de creșterea acesteia până la fazele finale ale experimentului. Astfel, pentru a clarifica mai bine această reacție de răspuns la infestarea cu lupoaie a fost estimată valoarea cantitativă a transcripților enzimelor SOD. La floarea-soarelui se cunosc patru gene SOD, care au în calitate de cofactor metalele Mn și Cu/Zn.

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 variau 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. (Tabelul 4.3).

Rezultatele obținute indică un profil general al expresiei transcripților SOD variat în funcție de natura genetică a genotipurilor și a demonstrat profile diferite cu valori ce nu depășesc semnificativ martorul (Favorit R) și cu valori ce alternează de la subexpresie la supraexpresie (PR64LE20 R și Performer S).

Cultivarea pe fondal de infestare a genotipului Favorit R la primele trei etape de analiză a demonstrat valori ale expresiei genelor SOD ce nu au depășit limita martorului cu excepția unui singur caz – gena *Mn-SOD I* după 18 zile a fost subexpresată de 2,6 ori față de martor. Însă la etapele finale ale experimentului 53-67 de zile, conținutul de transcripți SOD s-a diminuat,

manifestând subexpresie cu valoare minimă de 3,4 ori față de martor pentru gena *Cu/Zn-SOD II* la etapa de 67 de zile (Figura 4.10).

Tabelul 4.3. Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul superoxidului

Genotip		Etapa de cultivare (zile)	Expresia relativă a genelor (un. c.)			
			<i>Mn-SOD I</i>	<i>Mn-SOD II</i>	<i>Cu/Zn-SOD I</i>	<i>Cu/Zn-SOD II</i>
Favorit R	Martor	18	0,029±0,003	0,372±0,017	0,142±0,003	0,714±0,005
		21	0,034±0,002	0,364±0,011	0,151±0,004	0,999±0,046
		35	0,020±0,003	0,337±0,002	0,273±0,008	0,545±0,005
		53	0,039±0,001	0,424±0,010	0,426±0,011	1,042±0,095
		67	0,007±0,001	0,678±0,024	0,169±0,005	0,229±0,010
	Cultivat pe fondal de infestare	18	0,011±0,004	0,246±0,013	0,103±0,008	0,578±0,002
		21	0,023±0,003	0,247±0,018	0,220±0,006	0,860±0,004
		35	0,014±0,001	0,256±0,005	0,341±0,015	0,409±0,006
		53	0,017±0,002	0,227±0,007	0,333±0,009	0,519±0,008
		67	0,003±0,000	0,420±0,020	0,072±0,004	0,067±0,002
PR64LE20 R	Martor	18	0,022±0,003	0,436±0,021	0,104±0,006	1,100±0,050
		21	0,086±0,005	12,117±1,091	0,016±0,001	0,017±0,001
		35	0,040±0,002	0,946±0,011	0,302±0,013	0,751±0,003
		53	0,049±0,001	0,390±0,032	0,273±0,006	0,714±0,006
		67	0,003±0,001	7,017±0,702	0,028±0,001	0,035±0,002
	Cultivat pe fondal de infestare	18	0,036±0,003	0,617±0,027	0,145±0,005	1,450±0,050
		21	0,027±0,001	26,017±2,364	0,004±0,001	0,003±0,001
		35	0,033±0,003	0,267±0,011	0,207±0,007	0,290±0,007
		53	0,013±0,002	0,290±0,023	0,209±0,003	0,326±0,013
		67	0,009±0,001	1,567±0,475	0,087±0,003	0,065±0,006
Performer S	Martor	18	0,073±0,005	0,241±0,016	0,585±0,003	1,800±0,100
		21	0,181±0,025	0,391±0,007	0,419±0,012	1,050±0,050
		35	0,052±0,003	0,195±0,020	0,321±0,008	0,849±0,004
		53	0,030±0,001	11,350±0,661	0,126±0,006	0,719±0,003
		67	0,011±0,002	183,500±13,528	0,077±0,001	0,143±0,006
	Infestat	18	0,153±0,011	0,876±0,023	0,272±0,002	2,217±0,076
		21	0,022±0,004	0,139±0,014	0,211±0,006	0,058±0,001
		35	0,021±0,002	0,155±0,016	0,419±0,011	0,553±0,005
		53	0,025±0,004	0,305±0,004	0,248±0,003	0,539±0,009
		67	0,053±0,005	20,367±1,266	0,112±0,006	0,113±0,006

Valorile prezentate $\bar{x} \pm S$ (media±deviația standard a eșantionului); valoarea expresiei relative calculată după formula ΔCt .

În cazul dat, relațiile de incompatibilitate dintre Favorit R și lupoaie pentru genele superoxid dismutazelor a determinat reducerea conținutului de ARNm către subexpresie la ultimele etape de cultivare ce corelează negativ cu activitatea enzimelor SOD, care au indicat valori mai sporite la etapa de 67 de zile la formele cultivate pe fondal de infestare.

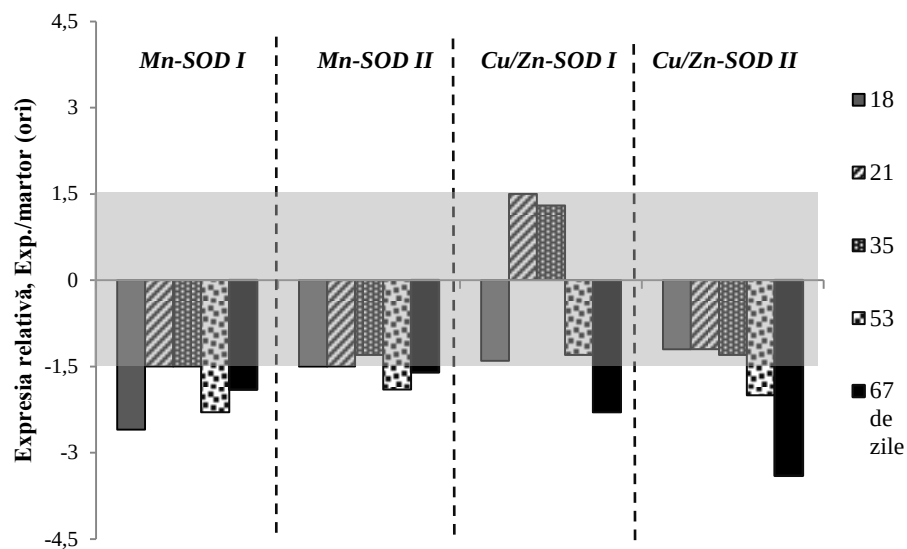


Fig. 4.10. Expresia relativă a genelor SOD (fold change) la genotipul Favorit R
Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), $^{**}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$.

Genotipul PR64LE20 R spre deosebire de Favorit R, s-a caracterizat printr-un profil ce alternează de la valori în limita martorului spre subexpresie și apoi supraexpresie. Această tendință a fost caracteristică pentru trei gene SOD: Mn-SOD I, Cu/Zn-SOD I și Cu/Zn-SOD II cu unele mici diferențe.

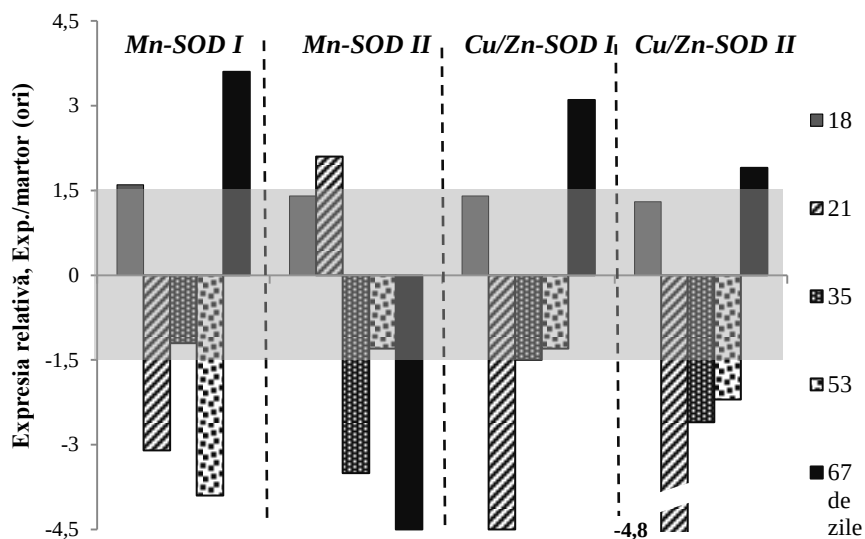


Fig. 4.11. Expresia relativă a genelor SOD (fold change) la genotipul PR64LE20 R
Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), $^{**}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$.

Astfel, conținutul de transcripti cu cofactorul Cu/Zn au aceeași dinamică: la 18 zile valori în limitele martorilor, urmată de subexpresia genelor la 21-35 de zile cu valori maxime la 21 de zile de 4,5 ori pentru gena Cu/Zn-SOD I și de 4,8 ori pentru Cu/Zn-SOD II (Figura 4.11). La etapa de 67 de zile valoarea expresiei acestora sporește până la 3,1 ori și 1,9 ori pentru gena

Cu/Zn-SOD I și respectiv *Cu/Zn-SOD II* (Figura 4.11). Însă, gena *Mn-SOD I* a manifestat valoare maximă de subexpresie la etapa de 53 de zile de 3,9 ori față de martor, urmată de supraexpresia de 3,6 ori (Figura 4.11). Transcriptul *Mn-SOD II* a prezentat un tablou diferit, caracterizat prin alternarea valorilor în limitele martorilor cu supraexpresie la 21 de zile de 2,1 ori și subexpresie la 35 și 67 de zile de 3,5 ori și respectiv de 4,5 ori (Figura 4.11).

În cazul combinației compatibile dintre Performer S și lupoaie, conținutul ARN-ului mesager al superoxid dismutazelor a prezentat un profil variat la toate genele. Activitatea acestora a înregistrat valori în limita martorului în opt cazuri din 20. Rezultate de supraexpresie a transcripturilor cu valori de 2,1 și, respectiv, 3,6 ori au fost identificate pentru genele *SOD* cu cofactorul Mn la etapa de formare a primelor atașamente (Figura 4.12). Gena *Mn-SOD I* de asemenea, a manifestat supraexpresie de 4,8 ori mai mare față de martor la etapa de dezvoltare a lăstarilor aerieni. Ulterior, acești doi transcripturi au relevat subexpresie după formarea primelor atașamente cu valori maxime de 8,3 ori pentru gena *Mn-SOD I* la etapa de 21 de zile și pentru gena *Mn-SOD II* cu rezultate de 37,2 ori mai sporite la etapa de dezvoltare a tuberculilor (Figura 4.12). *Pattern*-ul de expresie a transcripturilor enzimelor *SOD* cu cofactorul Cu/Zn s-a caracterizat prin subexpresie de 2,0-2,2 ori pentru gena *Cu/Zn-SOD I* și de 18,1 ori pentru gena *Cu/Zn-SOD II* la formarea primelor atașamente (Figura 4.12). Dintre aceste două gene valori de supraexpresie de 2,0 ori mai sporit față de martor au fost atestate doar pentru gena *Cu/Zn-SOD I* în momentul dezvoltării lăstarilor subterani (Figura 4.12).

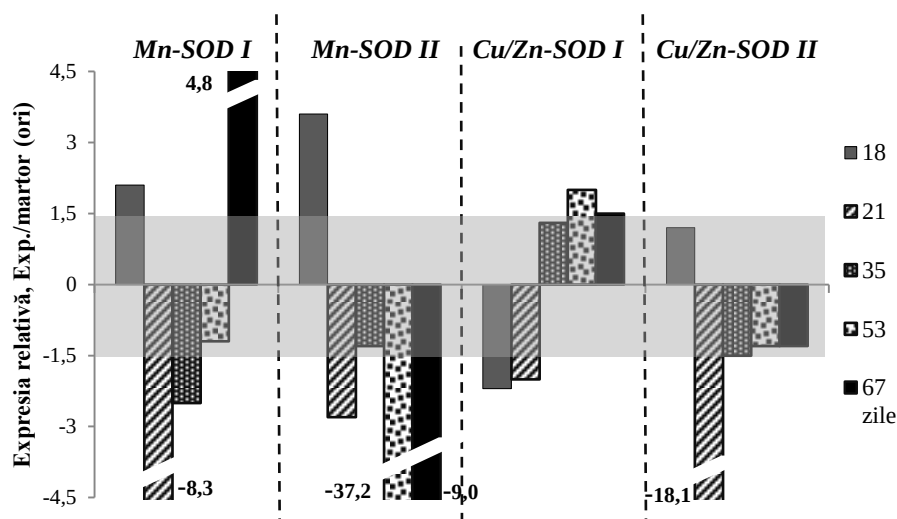


Fig. 4.12. Expresia relativă a genelor *SOD* (fold change) la genotipul Performer S
Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (*t test*), $^{**}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$.

În aspect integrativ al expresiei genelor la patosistemul Performer S – *O. cumana*, putem conchide că reacția de răspuns inițială în momentul recunoașterii patogenului de către gazdă și invers urmată de atașarea primelor apăsorii de lupoaie se caracterizează prin supraexpresia

genelor *Mn-SOD* ulterior, succedată de modificarea profilului în direcție diametral opusă de subexpresie care se menține în majoritatea cazurilor pe toată perioada de dezvoltare a patosistemului. Activitatea transcripțională a genelor *Cu/Zn-SOD* nu se modifică esențial în rezultatul infestării și dezvoltării patogenului cu mici excepții, la etapa de 21 de zile, transcriptul dat a indicat valori de supraexpresie de 18,1 ori (Figura 4.12).

Analiza datelor de expresie a genelor nu corelează perfect cu rezultatul activității acestora deoarece, atât localizarea subcelulară cât și activitatea factorilor de transcripție pot influența produsele de expresie prin modificări post-transcripționale și/sau post-translaționale, de interacțiune cu molecule mici și proteine. Acestea sunt extrem de importante prin faptul că complică identificarea conexiunilor cauzale între gene și metaboliți [130]. O astfel de reglare temporală este realizată prin mecanismele de semnalizare care orchestrează fluxul metabolic spre un răspuns eficient la modificările din exteriorul și interiorul plantei și a fost evidențiată la genotipul Performer S la nivelul expresiei genelor *SOD* (Figura 4.12) și al activității enzimelor respective (Figura 3.7 E). Intensificarea semnificativă a stării de stres a fost determinată preponderent de dinamica negativă în activitatea genelor (fluctuații de intensitate mare și evoluție variată) comparativ cu activitatea enzimelor *SOD* care a prezentat valori invers proporționale față de expresie și s-a menținut într-un echilibru homeostatic (fluctuații de intensitate mică comparativ egale) (Figura 4.13). Chiar dacă valorile de expresie *SOD* sunt diminuate, proteinele funcționale mențin echilibrul SRO și protejează structurile celulare de stresul oxidativ (Figura 3.7 E).

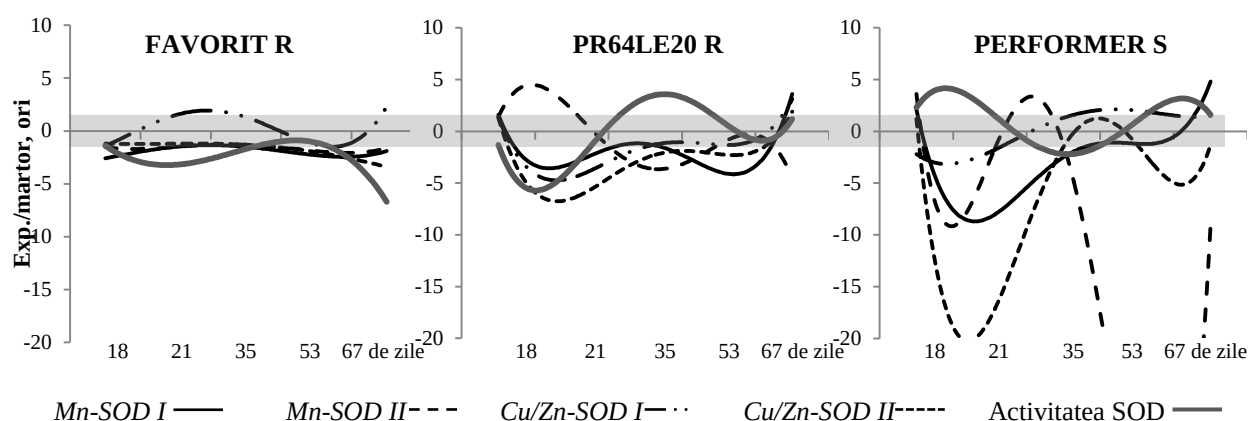


Fig. 4.13. Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor *SOD* și activității *SOD* ($R^2=1$)

Spre deosebire de genotipul sensibil, dinamica modificării profilului de expresie și al activității enzimelor la cele rezistente (Favorit R și PR64LE20 R) s-au evidențiat prin fluctuații de intensitate aproximativ egală și care tind să se stabilizeze în limitele normei fiziologice

(Figura 4.13). Astfel, alternarea temporală de inducere și represie a genelor etalează maniera concisă de coordonare a activității acestor mecanisme ca răspuns la potențialii agresori. Totuși, genotipurile rezistente se disting printr-o particularitate relevantă, la Favorit R dinamica activității SOD a exprimat opoziție față de activitatea celor patru gene *SOD*, iar la PR64LE20 R aceasta a corelat perfect cu trei gene (*Mn-SOD I*, *Cu/Zn-SOD I* și *Cu/Zn-SOD II*) (Figura 4.13). Această reacție a genotipului PR64LE20 R este asociată posibil cu starea de alarmă, exprimată prin co-expresia a trei gene *SOD* și corelarea cu activitatea metabolică a superoxid dismutazei (Figura 3.7 A, C).

4.3.2. Influența stresului biotic asupra activității genelor ce codifică ascorbat peroxidazele la floarea-soarelui

Ascorbat peroxidazele aparțin super-familiei de peroxidaze specifice la plante [163]. Studiile la nivelul genomului au demonstrat că *Arabidopsis* conține nouă gene APX; în timp ce orezul are opt și tomatele – șapte [64, 199, 266]. Diferite izoforme sunt clasificate în subfamilii în funcție de localizarea lor subcelulară. Dintre cele nouă gene APX identificate la *Arabidopsis*, trei codifică enzime citosolice – *APX1*, *APX2*, *APX6* [64, 155], iar *APX3*, *APX4*, *APX5* – sunt enzime localizate în microzomi determinați de necroza țesuturilor și activitatea peroxizomilor [27] și ultimul grup cuprinde izoformele cloroplastice – *APXs* și *APXt*.

La orez, izoformele cloroplastice reprezintă activitatea a trei gene, formele citosolice și peroxizomale sunt codificate de către două gene, iar *APX* mitocondrială – de o singură secvență nucleotidică [27, 266].

Pentru identificarea profilului de expresie a genelor APX au fost selectate două secvențe nucleotidice EST (*APX1* și *APX3*) elaborate în baza similarității cu utilizarea Instrumentului de Bază de Căutare a Alinierilor Locale (BLAST X) din baza de date nucleotidice a NCBI.

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. (cel mai vast interval la Favorit R) și mai diminuate 0,023-0,883 un. c. (cel mai mare interval la Performer S) pentru gena *APX3* (Tabelul 4.4).

Pattern-ul de expresie a genei enzimei citosolice *APX1* la genotipul Favorit R s-a caracterizat prin subexpresie slabă cu aceiași valoare de 1,7 ori, la două etape (18 și 53 de zile) și supraexpresie de 3,3 ori, la ultima etapă (Figura 4.14 A). Evaluarea în dinamică a conținutului transcriptului *APX3* a relevat valori în limitele martorului pe toată perioada de cultivare în condiții de stres biotic (Figura 4.14 A).

Tabelul 4.4. Activitatea transcripțională a genelor implicate în metabolismul peroxidului

Genotip	Etapa de cultivare (zile)	Expresia relativă a genelor (un. c.)			
		APX1		APX3	
		Martor	Cultivat pe fondal de infestare	Martor	Cultivat pe fondal de infestare
Favorit R	18	0,538±0,009	0,320±0,007	0,140±0,003	0,093±0,002
	21	0,558±0,024	0,617±0,036	0,073±0,003	0,071±0,001
	35	0,655±0,038	0,685±0,043	0,212±0,009	0,143±0,006
	53	2,108±0,204	1,260±0,108	0,037±0,001	0,055±0,005
	67	0,099±0,003	0,328±0,008	0,480±0,010	0,504±0,012
PR64LE20 R	18	1,262±0,158	0,810±0,019	0,046±0,001	0,600±0,005
	21	0,313±0,013	0,008±0,001	0,260±0,009	0,123±0,007
	35	0,707±0,029	0,650±0,026	0,325±0,012	0,159±0,008
	53	2,085±0,074	0,869±0,013	0,047±0,006	0,038±0,004
	67	0,052±0,004	0,248±0,016	0,725±0,041	0,591±0,018
Performer S	18	0,579±0,007	1,350±0,050	0,138±0,004	0,355±0,002
	21	0,856±0,007	0,225±0,005	0,127±0,005	0,023±0,002
	35	0,390±0,033	0,347±0,028	0,166±0,007	0,249±0,007
	53	0,664±0,036	1,003±0,018	0,023±0,002	0,046±0,002
	67	0,056±0,004	0,271±0,015	0,833±0,038	0,883±0,052

Valorile prezentate $\bar{x} \pm S$ (media±deviația standard a eșantionului); valoarea expresiei relative calculată după formula ΔCt .

Analiza profilului 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 puțin mai mari. Astfel, inhibarea foarte puternică a activității de 41,0 ori a fost semnalată la 21 de zile și de 2,4 ori, la 53 de zile (Figura 4.14 B). Ulterior, la etapa de 67 de zile gena a manifestat creșterea activității de 4,8 ori [13].

Transcriptul *APX3* nu a fost definitivat cu un profil similar primului genotip, din contra, acesta a manifestat activitate foarte sporită de 13,0 ori, la etapa de 18 zile, urmată de o ușoară subexpresie cu valori de 2,0 ori, la 21 și 35 de zile (Figura 4.14 B). De remarcat faptul că, aceste date relevă implicarea enzimei generate de gena *APX3* în activitatea de detoxifiere a peroxidului din microzomii generați în rezultatul necrozei, ce reprezintă una din reacțiile defensive. Prin urmare putem să presupunem că la acest genotip se formează atașamente pe rădăcinile proprii, dar datorită activității unor mecanisme ce induc necroza, patogenul nu ajunge să contacteze cu cilindrul central și moare [13].

În cazul genotipului Performer S profilul de expresie a genelor ascorbat peroxidazelor s-a individualizat în funcție de particularitățile genetice și fiziologice ale acestuia. Deși, acest genotip a fost infestat, conținutul de ARNm pentru transcriptul *APX1* a fost inițial supraexpresat de 2,3 ori, urmat de inhibarea genei prin subexpresie de 3,8 ori, peste 3 zile, care până la etapa de dezvoltare a lăstarilor subterani să revină la supraexpresie de 4,9 ori (Figura 4.15) [13].

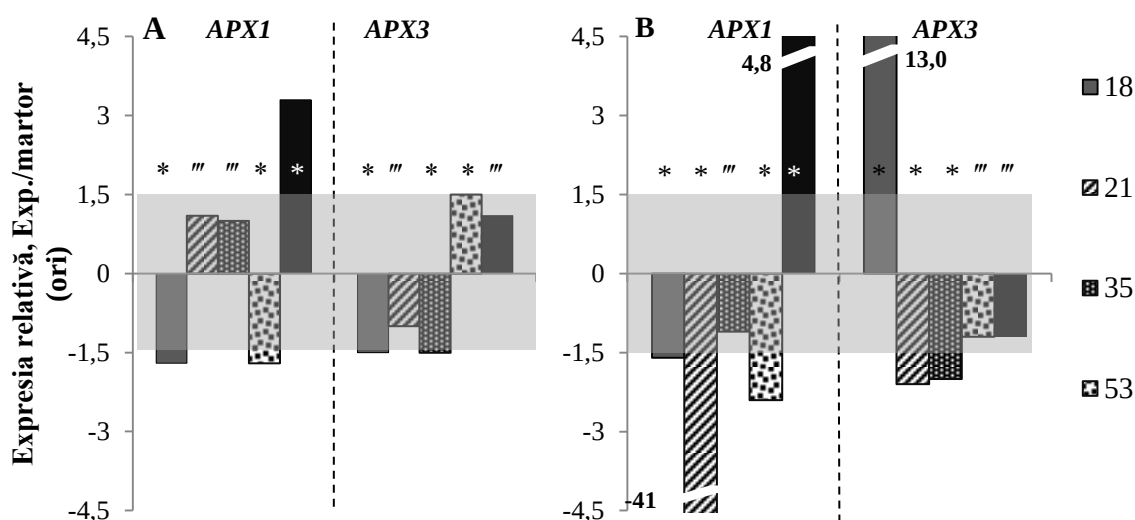


Fig. 4.14. Expresia relativă a genelor APX (fold change) la genotipurile rezistente

A – Favorit R, B – PR64LE20 R.

Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), *** $p > 0,05$, * $p < 0,05$.

Gena APX3 s-a remarcat de asemenea, prin supraexpresie de 2,6 ori, la etapa de formare a primelor atașamente, care ulterior, a fost inhibată de 5,5 ori în raport cu martorul peste 3 zile (Figura 4.15).

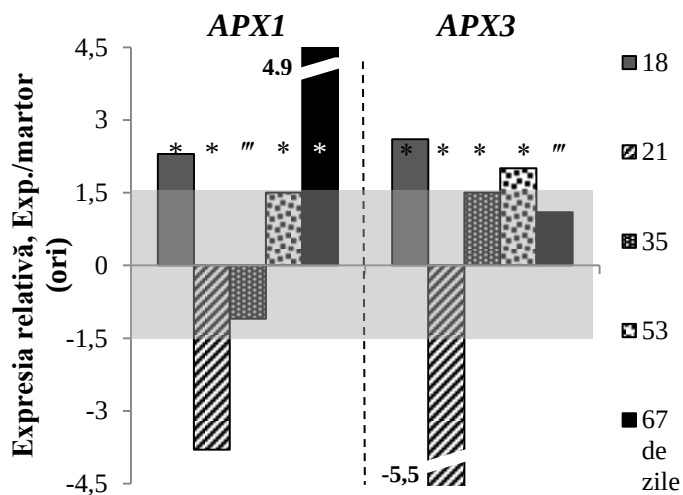


Fig. 4.15. Expresia relativă a genelor APX (fold change) la genotipul Performer S

Diferențele expresiei sunt remarcate comparativ cu martorul (t test), *** $p > 0,05$, * $p < 0,05$.

La etapele ulterioare după ce patogenul s-a conectat la vasele conducătoare ale gazdei activitatea genei a fost în limitele martorului cu excepția etapei de dezvoltare a lăstarilor subterani la care APX3 s-a supraexpresat de 2 ori. În cazul acestui genotip, prezintă interes faptul că ambele gene APX au reacționat similar în momentul de formare a primelor atașamente spre

sporirea conținutului la 18 zile, iar peste trei zile să fie inhibată. Posibil această reacție se datorează influenței patogenului asupra proceselor metabolice din planta gazdă.

La nivel de expresie a genelor *APX*, genotipul Favorit nu manifestă diferențe esențiale ale profilelor în raport cu alte gene studiate – fluctuații de intensitate mică pe parcursul întregii perioade de cultivare (Figura 4.16). Genele *APX* au intensitate egală de expresie, dar sunt în opoziție. Se poate de menționat că activitatea enzimelor ascorbat peroxidazele au înregistrat valori mai mari în corelație cu expresia relativă a genelor *APX*.

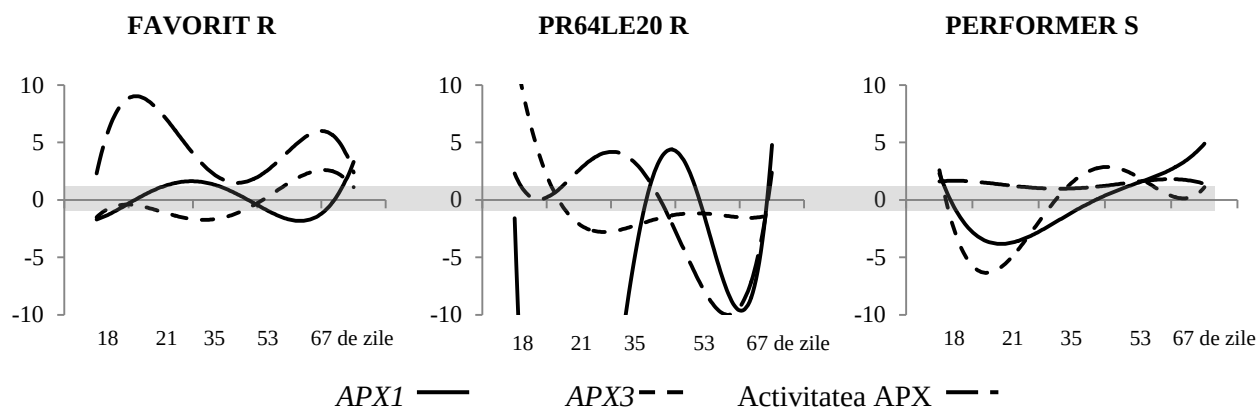


Fig. 4.16. Analiza comparativă a nivelului de expresie relativă a genelor *APX* și activității *APX* ($R^2=1$)

Al doilea genotip PR64LE20 R și în cazul genelor *APX* a manifestat fluctuații cu amplitudini înalte ale expresiei genelor și activității *APX*. Conținutul acestora este influențat de starea de alarmă la care a fost expus acest genotip, exprimată preponderent prin represia genelor și inhibiția activității enzimice (Figura 4.16).

Genotipul Performer S, în cazul metabolismului unor membri ai căii ascorbat peroxidazei s-a caracterizat prin stabilizarea conținutului *APX* (gene și enzime) pe perioada de dezvoltare în conexiune cu lupoaie după iritarea din momentul formării primelor atașamente (Figura 4.16). Astfel, datele de expresie corelează perfect cu cele ale activității enzimelor *APX*, însă acești compuși nu sunt suficienți pentru a lupta cu invazia patogenului, dar mențin echilibrul homeostatic în planta gazdă, permițându-i supraviețuirea, dar nu și dezvoltarea normală.

Generalizând rezultatele expuse cu privire la acest mecanism defensiv se poate de afirmat că la genotipurile rezistente funcționalitatea acestuia corespunde cu nivelul de activitate ale altor mecanisme expuse anterior. Astfel, cultivarea genotipurilor de floarea-soarelui pe fondal de infestare artificială cu lupoaie a determinat activarea ascorbat peroxidazei și unor gene *APX* ca reacție de răspuns la invazia lupoaiei. Profilul sumar *APX* al combinației incompatibile Favorit R – *O. cumana* a fost asemănător cu cel al sistemului compatibil Performer S – *O. cumana* și s-a

caracterizat prin stabilizarea indicilor pe perioada de cultivare. PR64LE20 R a manifestat o stare de alarmă determinată de alternarea valorilor de la subexpresie spre supraexpresie.

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 transcripților corelează direct cu cea a produșilor de expresie (acumularea compușilor și activitatea enzimelor), 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. 17).

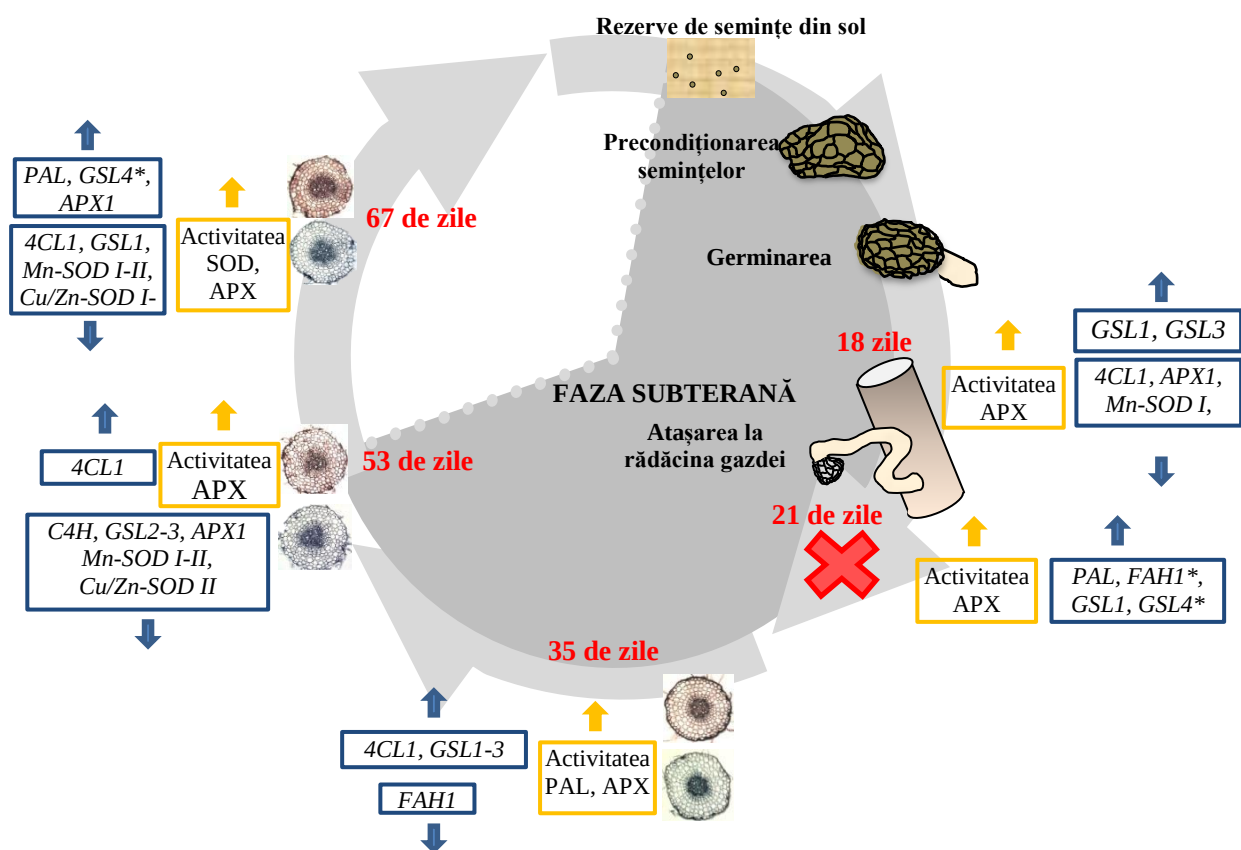


Fig. 4.17. Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului Favorit R

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 4.18).

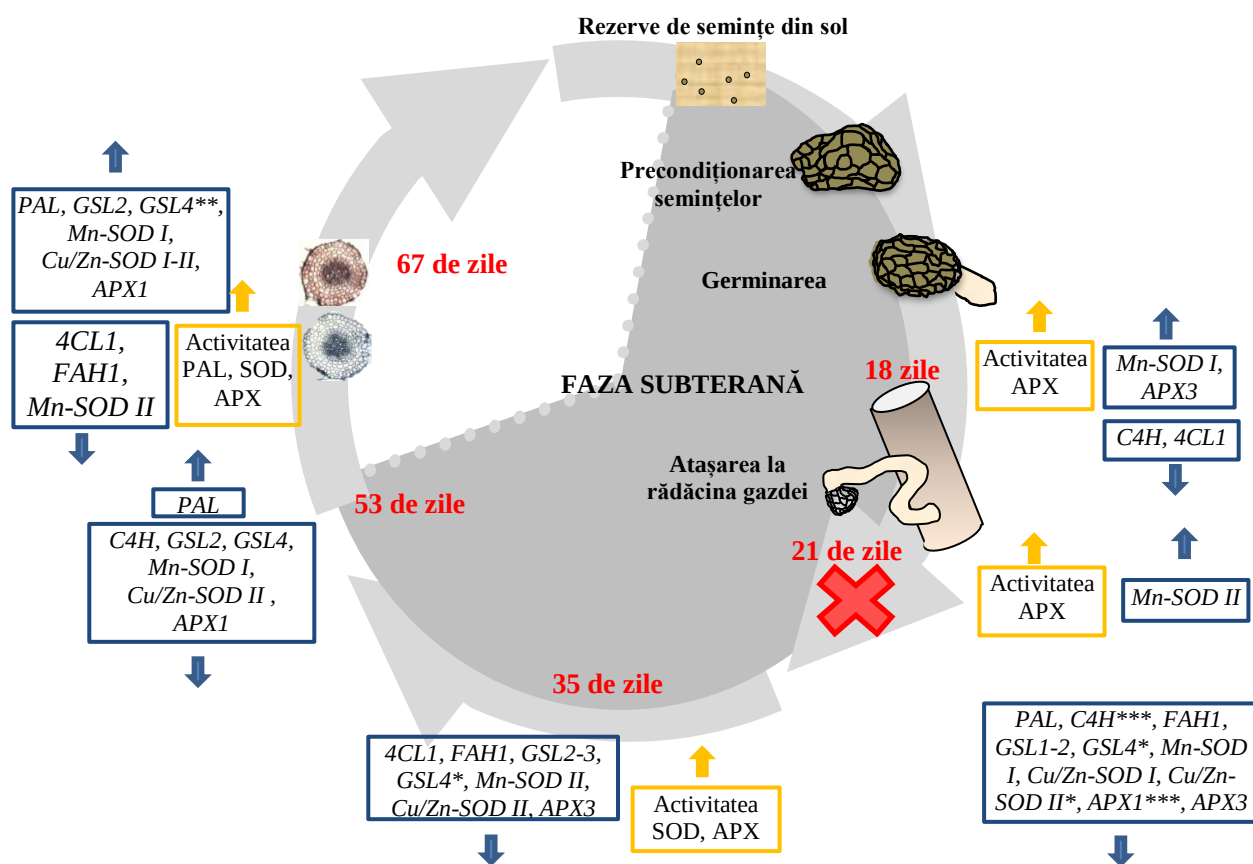


Fig. 4.18. Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului PR64LE20 R

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 neafectate 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 se observă 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 4.19).

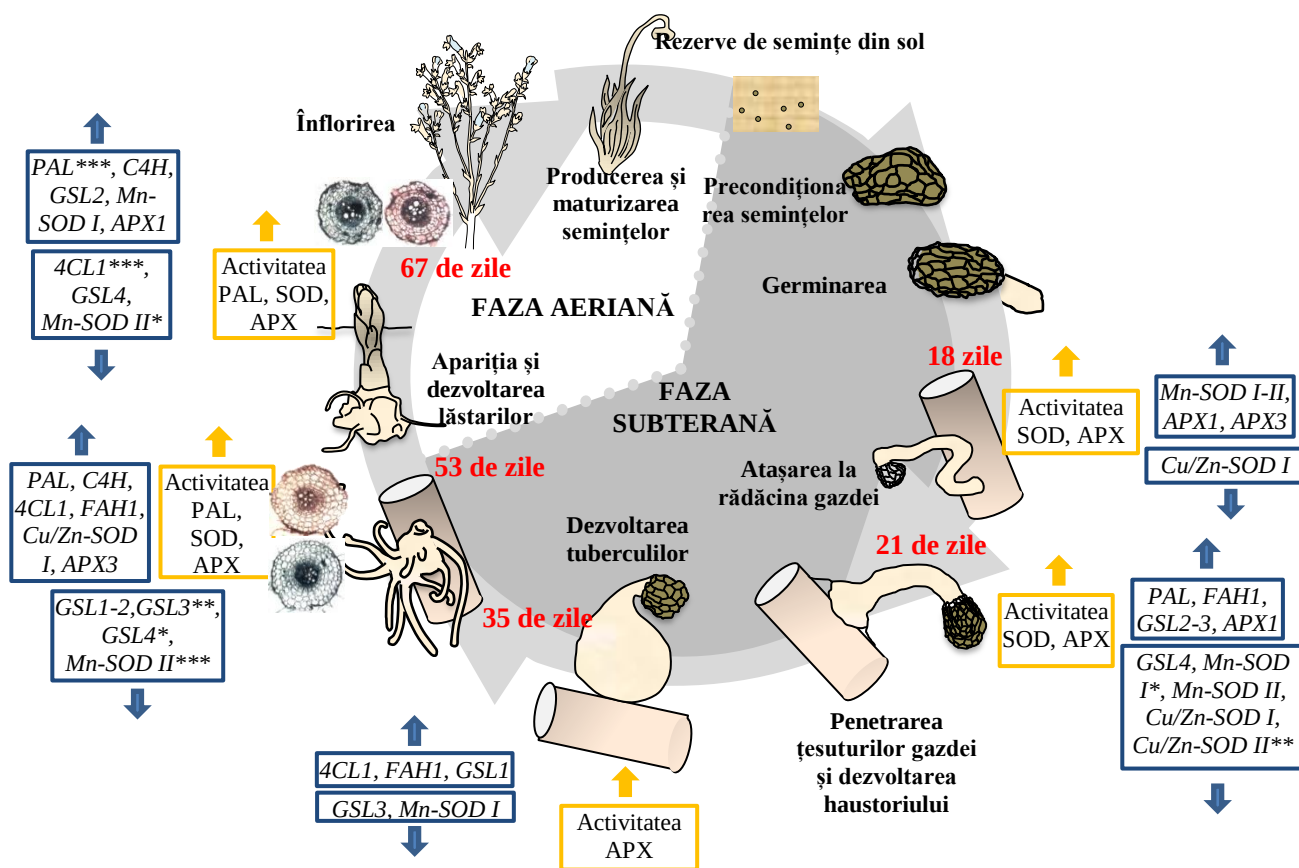


Fig. 4.19. Evidențierea modificărilor la nivel histochimic, biochimic și molecular al genotipului Performer S

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 în dependență completă 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 perfect cu profilul de expresie a genelor APX studiate pe tot parcursul dezvoltării patosistemului cu excepția etapei de dezvoltare a lăstarilor subterani. 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 observate 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. La acest genotip corespunde fenotipul morfologic întârziat în dezvoltare cu profilul molecular, indicând asupra unei incapacități a organismului de minimalizare a fluctuațiilor parametrilor analizați, cauzând pierderi de energie și substanță, importante în procesele de apărare.

Concluzii la capitolul 4

1. Nivelul de adaptare la fluctuațiile interne induse de factorii externi depinde de amploarea și frecvența acestora și de capacitatea de reglare a rezervelor de substanță și energie metabolică necesară menținerii stării fiziologice de rezistență. Analiza comparativă a expresiei a trei grupe de gene la trei variante de studiu: normă, incompatibilitate patogen-gazdă și patosistem a demonstrat profile diferite de expresie în cazul unei și aceleași reacții fiziologice (rezistență) [263].

2. Studiul *pattern*-elor de expresie a patru gene (*PAL*, *C4H*, *4CL1* și *FAH1*), care codifică enzime implicate în metabolismul fenilpropanoidelor la combinația incompatibilă al genotipului Favorit R, s-a remarcat prin corespunderea fenotipului morfologic cu cel molecular în manifestarea rezistenței. Genotipul PR64LE20 R a manifestat o stare de alarmă, aproape pe întreaga perioadă, exprimată preponderent prin represia sintezei ARNm a celor patru gene. Intensificarea semnificativă a stării de stres, manifestată prin ritmul mult mai sporit în acumularea secvențelor transcrise și a conținutului de lignină comparativ cu cel al activității enzimei PAL a fost evidențiat în cazul patosistemului Performer S – *O. cumana* [8].

3. Investigarea profilului de expresie a patru gene care codifică glucan sintaze (*GSL1-4*) la genotipurile rezistente și sensibile de floarea-soarelui supusă infestării artificiale cu lupoai a demonstrat profile diferite. La combinația incompatibilă Favorit R toate cele patru gene *GSL* s-au caracterizat prin supraexpresie, în special în primele etape de stabilire a conexiunilor mediate chimic cu semințele germinate de lupoai. În cazul patosistemului Performer S – *O. cumana* sporirea conținutului de transcripti a trei gene coincide cu invazia patogenului: *GSL1* după

formarea haustoriilor, iar *GSL2* și *GSL3* la formarea primelor atașamente și dezvoltarea lăstarilor aeriени. De asemenea, a fost pusă în evidență o dependență corelativă pozitivă în activitatea genelor *GSL2* și *GSL3* la toate genotipurile studiate pe parcursul perioadei ontogenetice de dezvoltare ale plantelor de floarea-soarelui [15].

4. Cultivarea în sol infestat cu semințe de lupoaie a genotipurilor rezistente și a celui sensibil a determinat inducerea sau represia genelor superoxid dismutazelor. Astfel, Favorit R s-a caracterizat printr-un echilibru homeostatic determinat de valori ale expresiei ce nu depășesc limitele martorului. PR64LE20 R a manifestat o stare de alarmă prin subexpresia și apoi supraexpresia a trei gene – *Mn-SOD I*, *Cu/Zn-SOD I* și *Cu/Zn-SOD II*. În cazul combinației compatibile, starea de stres a fost determinată de expresia variată și preponderent inhibată a celor patru gene *SOD*.

5. Cultivarea genotipurilor de floarea-soarelui pe fondal de infestare artificială cu lupoaie a determinat modificarea *pattern*-ului de expresie a genelor *APX* ca răspuns defensiv doar la două genotipuri PR64LE20 R și Performer S. La genotipul PR64LE20 R profilul molecular a fost exprimat preponderent prin represia transcripțiilor, pe când la genotipul Performer S - prin ritmul mult mai sporit în acumularea secvențelor transcrise. Profilul sumar al activității genelor *APX* al combinației incompatibile Favorit R – *O. cumana* nu a indicat modificări esențiale, ceea ce denotă asupra unei bune capacități de reglare și menținere a metabolismului în situații de stres biotic [13].

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

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 aeri. Totuși această reacție de apărare nu îi permite gazdei să lupte cu invazia patogenului [8, 87].
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 [8]. 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 [14].
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 [8, 13, 15].
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 [263].

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 donor de gene pentru strategiile de obținere a hibrizilor rezistenți față de atacul lupoaiei, 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. 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: UAȘM, 1994, pp. 31-32.
2. BULIMAGA, V., EFREMOVA, N., DENCICOV, L. *Metodă de determinare a activității superoxidismutazei*. Brevet de invenție 3752 G2, MD, C12N9/02. USM. Data depozit 28.03.2008. In: BOPI N. 2008, nr.11.
3. DUCA M., PORT A., CLAPCO, S., ZGARDAN, D., **TABĂRĂ, O.** Considerații generale privind mecanismele rezistenței plantelor la antofitele parasite din familia *Orobanchaceae*. In :*Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2016, vol. 2(329), pp. 7-16.
4. DUCA, M., ACCIU, A., CLAPCO, S. Distribuția geografică și caracteristica unor populații de *O. cumana* din Republica Moldova. In: *Buletinul AȘM, Științele vieții.*, 2017, vol. 2(332), pp. 65–76.
5. DUCA, M., și colab. Afinitatea și unele particularități fiziologice ale diferitor rase de lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.). In: *Știința agricolă*, 2016a, vol. 2, pp. 41-46.
6. DUCA, M., și colab. Managementul tehnologic în cultura florii-soarelui și expresia atacului cu *Orobanche cumana*. In: *Akadosmos*, 2015, vol. 4, pp. 75–83.
7. DUCA, M., și colab. Screening-ul molecular al rezistenței florii-soarelui la lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.) rasa E. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, 2009, vol. 3(309), pp. 81-88.
8. DUCA, M., **TABĂRĂ, O.**, NECHIFOR, V., PORT, A. Lignificarea pereților celulari la *Helianthus annuus* L. ca răspuns la atacul *Orobanche cumana* Wallr. In: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*, 2017a, vol. 3 (333), pp. 84-96
9. ROTARENCO, V. *Aspecte morfo-fiziologice de interacțiune gazdă-parazit (Helianthus annuus L. – Orobanche cumana Wallr.)*: tz. de doct. în biologie. Chișinău, 2010, 128 p.
10. ȘESTACOVA, T., **TABĂRĂ, O.** Mecanisme genetico-moleculare ale rezistenței plantelor la stresul biotic. In: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2015, vol. 3(327), pp. 14-27.
11. ȘTEFÎRȚĂ, A. Activitatea fermenților antioxidativi și reacția plantelor la secetă în perioadele critice. In: *Buletinul AȘM, Științele Vieții*, 2009, vol. 2(308), pp. 40-48.
12. ȘTEFÎRȚĂ, A., și colab. *Fiziologia stresului, adaptării și rezistenței la secetă a plantelor de cultură*. Chișinău: Tipografia AȘM, 2017, 372 p. ISBN 978-9975-62-408-4

13. **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.
14. **TABĂRĂ, O.** Activitatea superoxid dismutazei la plantele de floarea-soarelui infestate artificial cu lupoaie. In: *Buletinul AȘM, Științele Vieții*. 2019, vol. 1(337), p. 106-111.
15. **TABĂRĂ, O.,** NECHIFOR, V., PORT, A. Expresia genelor *GSL1-4* în rădăcinile de floarea-soarelui infectată cu lupoaie. In: *Buletinul AȘM. Științele Vieții*. 2017, vol. 2(332), pp. 85-93.
16. VRÂNCEANU, A. *Floarea-soarelui hibridă*. București, Ceres, 2000, 520 p. ISBN: 973-40-0453-0
17. ABD EL-MAKSoud, M.M. et al. Biochemical and histological markers for prediction of *Vicia faba* tolerance to *Orobanche*. In: *African Crop Science Conference Proceedings*, 2007, vol. 8, pp. 1997-2003.
18. ABO-ELYOUSR, K.A.M., et al. Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. In: *Crop Protection*, 2009, vol. 28(4), pp. 295–301.
19. AHONSI, M.O., et al. Selection of non-pathogenic ethylene-producing rhizobacteria for accelerated depletion of *Striga hermonthica* seed bank. In: *African Crop Science Journal*, 2002, vol. 10(2), pp. 145-156, doi: 10.4314/acsj.v10i2.27547
20. AHUJA, I., et al. Phytoalexins in defense against pathogens. In: *Trends Plant Sci.*, 2012, vol. 17, pp. 73–90.
21. AKIYAMA, K. Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, vol. 71(6), pp. 1405-1414.
22. AKIYAMA, K., et al. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Nature*, 2005, vol. 9(435), nr. 7043, pp. 824-827, doi:10.1038/nature03608
23. ALBRECHT, H., YODER, J.I., PHILLIPS, D.A. Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria versicolor*. In: *Plant Physiol.*, 1999, vol. 119(2), pp. 585-592.
24. ALSCHER, A.G., et al. Role of superoxide dismutase's (SODs) in controlling oxidative stress in plants. In: *Journal of Experimental Botany*, 2002, vol. 53, pp. 1331-1341.

25. AL-WAKEEL, S.A.M., et al. Induced systemic resistance: an innovative control method to manage branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.) in tomato. In: *IUFS J. Biol.*, 2013, vol. 72(1), pp. 9-21.
26. ANGELINI, R., et al. Involvement of polyamine oxidase in wound healing. In: *Plant Physiology*, 2008, vol. 146(1), pp. 162–177.
27. ANJUM, N.A. Catalase and ascorbate peroxidase - representative H₂O₂ - detoxifying heme enzymes in plants. In: *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, vol. 23(19), pp. 19002–19029, doi: 10.1007/s11356-016-7309-6
28. ANTONOVA, T., TER BORG, S. The role of peroxidase in the resistance of sunflower against *Orobanche cumana* in Russia. In: *Weed Research.*, 1996, vol. 36, pp. 113-121.
29. ARRUDA, R.L., et al. An approach on phytoalexins: function, characterization and biosynthesis in plants of the family *Poaceae*. In: *Ciência Rural*, 2016, vol. 46(7), pp. 1206–1216, doi: 10.1590/0103-8478cr20151164.
30. AUGER, B., et al. Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. In: *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2012, vol. 25, pp. 993–1004.
31. BACETE, L., et al. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. In: *Plant Journal*, 2018, vol. 93, pp. 614–636, doi: 10.1111/tpj.13807
32. BACIC, A., et al. Structural classes of arabinogalactan-proteins. In: *Chapter from book Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins*, 2000, pp. 11-23, doi: 10.1007/978-1-4615-4207-0_2
33. BANDARANAYAKE, P.C., et al. A single electron reducing quinone oxidoreductase is necessary to induce haustorium development in the root parasitic plant *Triphysaria*. In: *Plant Cell.*, 2010, vol. 22(4), pp. 1404-1419, doi: 10.1105/tpc.110.074831
34. BASAVARAJU, P., et al. Infection induced oxidative cross-linking of hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) is associated with restriction of *Colletotrichum sublineolum* in *sorghum*. In: *Journal of Plant Interactions*, 2009, vol. 4(3), pp. 179–186, doi: 10.1080/17429140802527169
35. BASSARD, J.E., et al. Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway. In: *The Plant Cell*, 2012, vol. 24(11), pp. 4465-4482.
36. BEATTIE, G.A. Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. In: *Annu. Rev. Phytopathol*, 2011, vol. 49, pp. 533–555.

37. BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, vol. 57, pp. 101–110.
38. BELMONDO, S., et al. Identification of genes involved in fungal responses to strigolactones using mutants from fungal pathogens. In: *Curr Genet*, 2017, vol. 63, pp. 201–213.
39. BHARTI, N., et al. Photomodulation of strigolactone biosynthesis and accumulation during sunflower seedling growth. In: *Plant Signal Behav*, 2015, vol. 10(8), e1049792, pp. 1-8.
40. BHATT, D., et al. Cloning, expression and functional validation of drought inducible ascorbate peroxidase (*Ec-apx1*) from *Eleusine coracana*. In: *Mol Biol Rep.*, 2013, vol. 40(2), pp. 1155-1165, doi: 10.1007/s11033-012-2157-z
41. BHATTACHARYA, A., et al. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. In: *Molecular Plant Pathology*, 2010, vol. 11(5), pp. 705–719.
42. BHUIYAN, N.H., et al. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. In: *Journal of Experimental Botany*, 2009b, vol. 60(2), pp. 509–521.
43. BHUIYAN, N.H., et al. Role of lignification in plant defense. In: *Plant Signaling & Behavior*, 2009a, vol. 4(2), pp. 158–159.
44. 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.
45. BOLLER, T., FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. In: *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2009, vol. 60, pp. 379–406, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
46. BONIFACIO, A., et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. In: *Plant Cell Environ*, 2011, vol. 34(10), pp. 1705-1722.
47. 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.
48. BOUWMEESTER, H.J., et al. Secondary metabolite signalling in host - parasitic plant interactions. In: *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, vol. 6, pp. 358–364.

49. 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.
50. BRADOW, J., et al. Germination stimulation in wild oats (*Avena fatua* L.) by synthetic strigol analogs and gibberellic acid. In: *J. Plant Growth Regul.*, 1990, vol. 9, pp. 35–41.
51. BRODHUN, F., et al. An iron 13S-lipoxygenase with an α -linolenic acid specific hydroperoxidase activity from *Fusarium oxysporum*. In: *PloS ONE*, 2013, vol. 8(5), pp. 1–16, e64919, doi:10.1371/journal.pone.0064919
52. CAMERON, D.D., SEEL, W.E. Functional anatomy of haustoria formed by *Rhinanthus minor*: linking evidence from histology and isotope tracing. In: *New Phytol*, 2007, vol. 174, pp. 412–419.
53. CARDOSO, C., et al. Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanch*e and *Phelipanche* spp. In: *Plant Science*, 2011, vol. 180, pp. 414–420, doi: 10.1016/j.plantsci.2010.11.007
54. CARVER, T.L.W., et al. Inhibition of phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.). In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1994, vol. 44, pp. 261–272.
55. CASE, A.J. On the origin of superoxide dismutase: an evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling. In: *Antioxidants*, 2017, vol. 6(82), pp. 1–21, doi: 10.3390/antiox6040082
56. CASSAB, G.I., VARNER, J.E. Cell wall proteins. In: *Ann Rev Plant Physiol.*, 1988, vol. 39, pp. 321–353.
57. CASTILLEJO, M.A., et al. Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanch*e *crenata* in *Medicago truncatula*. In: *BMC genomics*, 2009, vol. 10(294), pp. 1–17, doi: 10.1186/1471-2164-10-294
58. 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.
59. CAVERZAN, A., et al. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. In: *Genet Mol Biol*, 2012, vol. 35(4). pp. 1011–1019.
60. CHAIN, F., et al. A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. In: *MPMI*, 2009, vol. 22(11), pp. 1323–1330, doi: 10.1094/MPMI -22-11-1323

61. CHANG, A., et al. Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. In: *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, pp. 33591-33601.
62. CHEN, X.Y., KIM, J.Y. Callose synthesis in higher plants. In: *Plant Signaling & Behavior*, 2009, vol. 4(6), pp. 489-492.
63. CHENG, Y., et al. Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen. In: *BMC Plant Biology*, 2012, vol. 12(96), pp. 1-12.
64. CHEW, O., WHELAN, J., MILLAR, A.H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. In: *J Biol Chem.*, 2003, vol. 278(47), pp. 46869-46877.
65. CIMMINO, A., et al. Effect of fungal and plant metabolites on broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) seed germination and radicle growth. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, vol. 62(43), pp. 10485-10492, doi: 10.1021/jf504609w
66. CONN, C.E., et al. Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants. In: *Science*, 2015, vol. 349, pp. 540-543, doi: 10.1126/science.aab1140
67. COOK, C.E., et al. Germination stimulants. II. The structure of strigol - a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.), In: *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, vol. 94, pp. 6198-6199.
68. CREWS, L.J., MCCULLY, M.E., CANNY, M.J. Mucilage production by wounded xylem tissue of maize roots – time course and stimulus. In: *Func. Plant Biol.*, 2003, vol. 30, pp. 755–766.
69. CUI, S., et al. Haustorial hairs are specialized root hairs that support parasitism in the facultative parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. In: *Plant Physiol.*, 2016, vol. 170, pp. 1492-1503, doi: 10.1104/pp.15.01786
70. D'ARCY-LAMETA, A., et al. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. In: *Ann Bot.*, 2006, vol. 97(1), pp. 133-140.
71. DAWS, M.I., et al. Butenolide from plant-derived smoke functions as a strigolactone analogue: evidence from parasitic weed seed germination. In: *So. African J. Bot.*, 2008, vol. 74, pp. 116–120.
72. DECKER, E.L., et al. Strigolactone biosynthesis is evolutionarily conserved, regulated by phosphate starvation and contributes to resistance against phytopathogenic fungi in a moss, *Physcomitrella patens*. In: *New Phytologist*, 2017, vol. 216, pp. 455–468.

73. DELAVALT, P., et al. Molecular analysis of sunflower resistance mechanisms to *Orobanche cumana*. In: *COST 849 Meeting*, 2006, Lisbon, Portugal, pp. 27
74. DELUDE, C., et al. Primary fatty alcohols are major components of suberized root tissues of *Arabidopsis* in the form of alkyl hydroxycinnamates. In: *Plant Physiol*, 2016, vol. 171(3), pp. 1934-1950, doi: 10.1104/pp.16.00834
75. DEMIRBAS, S., ACAR, O. Superoxide dismutase and peroxidase activities from antioxidative enzymes in *Helianthus annuus* L. roots during *Orobanche cumana* Wallr. penetration. In: *Fresenius Environmental Bulletin*, 2008, vol. 17(8), pp. 1038-1044.
76. DENG, Y., LU, S. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. In: *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2017, vol. 36(4), pp. 257-290, doi: 10.1080/07352689.2017.1402852
77. DENNESS, L., et al. Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species - and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol.*, 2011, vol. 156, pp. 1364–1374, doi: 10.1104/pp.111.175737
78. DICKINSON, M. *Molecular plant pathology.*, London: Bios scientific publisher, 2003, 258 p. ISBN 1859960448 9781859960448
79. DIHAZI, A., et al. Structural and biochemical changes in salicylic-acid-treated date palm roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. In: *Journal of Pathogens*, 2011, article ID 280481, pp. 1-9, doi: org/10.4061/2011/280481.
80. DRAIE, R. Differential responses of commercial tomato rootstocks to branched broomrape. In: *Research in Plant Sciences*, 2017, vol. 5, pp. 15-25, doi: 10.12691/plant-5-1-3
81. DUCA, M. Historical aspects of sunflower researches in the Republic of Moldova. In: *Helia*, 2015, vol. 38(62), pp 79–93.
82. DUCA, M., CLAPCO, S., PORT, A. Analysis of the soil parameters in the context of sunflower infection by *Orobanche cumana* Wallr. In: *Sci. Pap. Agro. Ser.*, 2016, vol. 59(1), pp. 49–52.
83. DUCA, M., et al. Current status of sunflower crop management in Moldova. In: *19th International Sunflower Conference*, Edirne, Turkey, 2016b, pp. 606.
84. DUCA, M., et al. Impact of *Orobanche cumana* on sunflower cultivars on natural infected fields in Republic of Moldova. In: *International Plant Breeding Congress*, Antalia, Turkey, 2013, pp. 282.

85. DUCA, M., et al. Influence of environmental conditions on the virulence and distribution of *Orobanche cumana* Wallr. in the Republic of Moldova. In: *OCL*, 2018, vol. 26(3), pp. 1-10, doi: org/10.1051/ocl/2018049
86. DUCA, M., GLIJIN, A., ACCIU, A. The biological cycle of sunflower broomrape. In: *J. Plant Development*, 2013, vol. 20, pp. 71–78.
87. DUCA, M., **TABARA, O.** Histochemical aspects of *Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr. pathosystem. In: *Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași s. II a. Biologie vegetală*, 2016, vol. 62(2), pp. 19-28.
88. DUCA, M., **TABARA, O.**, NECHIFOR, V., PORT, A. Impact of *Orobanche cumana* Wallr. on callose accumulation in sunflower roots. In: *International Plant Breeding Conference*, Kyrenia, Turkey, 2017, pp. 87.
89. DURUFLÉ, H., et al. Proline hydroxylation in cell wall proteins: is it yet possible to define rules? In: *Front. Plant Sci.*, 2017, vol. 8, article ID 1802, pp. 1-10, doi: org/10.3389/fpls.2017.01802
90. 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.
91. EIZENBERG, H., et al. Non-chemical control of root parasitic weeds with biochar. In: *Front. Plant Sci*, 2017, vol. 8(939), pp. 1-9, doi: 10.3389/fpls.2017.00939
92. EIZENBERG, H., et al. Resistance to broomrape (*Orobanche* spp.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is temperature dependent. In: *Journal of Experimental Botany*, 2003, vol. 54(385), pp. 1305-1311.
93. ELLINGER, D., VOIGT, C.A. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. In: *Annals of Botany*, 2014, vol. 114, pp. 1349–1358.
94. ERICKSON, H.S., et al. Quantitative RT-PCR gene expression analysis of laser microdissected tissue samples. In: *Nature Protocols*, 2009, vol.4, nr. 6, pp. 902-922.
95. ESTABROOK, E., YODER, J. Plant – plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. In: *Plant Physiology*, 1998, vol. 116, pp. 1-7.
96. EVERT, R.F. *Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. 661 p., Online ISBN:9780470047385

97. EVIDENTE, A., et al. Polyphenols, including the new peapolyphenols A-C, from pea root exudates stimulate *Orobanche foetida* seed germination. In: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, pp. 2902–2907.
98. FERNÁNDEZ-APARICIO, M., et al. Investigation of amino acids as herbicides for control of *Orobanche minor* parasitism in red clover. In: *Frontiers In Plant Science*, 2017, vol. 8(842), pp. 167-178, doi: 10.3389/fpls.2017.00842
99. FERNÁNDEZ-APARICIO, M., et al. Low strigolactone root exudation: a novel mechanism of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) resistance available for faba bean breeding. In: *J. Agric. Food Chem.*, 2014, vol. 62(29), pp.7063–7071. doi: 10.1021/jf5027235
100. FERNÁNDEZ-APARICIO, M., et al. Stimulation of seed germination of *Orobanche* species by ophiobolin A and fusicoccin derivatives. In: *J. Agric. Food Chem.* 2008, vol. 56, pp. 8343–8347.
101. FERNÁNDEZ-APARICIO, M., FLORES, F., RUBIALES, D. Field response of *Lathyrus cicera* germplasm to crenate broomrape (*Orobanche crenata*). In: *Field Crops Research.*, 2009, vol. 113, pp. 321-327, doi: 10.1016/j.fcr.2009.06.009.
102. FERNÁNDEZ-APARICIO, M., FLORES, F., RUBIALES, D. The effect of *Orobanche crenata* infection severity in faba bean, field pea and grass pea productivity. In: *Frontiers in Plant Science*. 2016b, vol. 7(1409), pp. 1-8.
103. FERNÁNDEZ-APARICIO, M., REBOUD, X., GIBOT-LECLERC, S. Broomrape weeds. Underground mechanisms of parasitism and associated strategies for their control: a review. In: *Front. Plant Sci.*, 2016a, vol. 207(7), pp. 512-521, doi: 10.3389/fpls.2016.00135
104. FERNÁNDEZ-APARICIO, M., SILLERO, J.C., RUBIALES, D. Intercropping with cereals reduces infection of *Orobanche crenata* in legumes. In: *Crop Prot*, 2007, vol. 26, pp. 1166–1172.
105. FERNÁNDEZ-OCAÑA, A., et al. Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial *Mn-SOD*. In: *J. Plant Physiol.*, 2011, vol. 168(11), pp. 1303-1308.
106. FILIZ, E., TOMBULOĞLU, H. Genome-wide distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor*. In: *Turkish Journal of Biology*, 2015, vol. 9(1), pp. 49-59, doi: 10.3906/biy-1403-9

107. FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. In: *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971, vol. 9, pp. 275–296.
108. FLORS, V., TON, J., JAKAB, G. Absciscic acid and callose: team players in defence against pathogens? In: *J. Phytopathol.*, 2005, vol. 153, pp. 377-383.
109. 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), article ID e0152548, pp. 1-16, doi: 10.1371/journal.pone.0152548
110. FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. In: *Plant Cell*, 2005, vol. 17, pp. 1866-1875.
111. FRANKE, R., SCHREIBER, L. Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. In: *Curr Opin Plant Biol*, 2007, vol. 10, pp. 252–259.
112. FRYER, M.J., et al. Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. In: *Plant J*, 2003, vol. 33(4), pp. 691-705.
113. GAN, X., et al. Novel *trans*-ferulic acid derivatives containing a chalcone moiety as potential activator for plant resistance induction. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, vol. 65(22), pp. 4367-4377.
114. GARRIDO, I., et al. Oxidative stress induced in sunflower seedling roots by aqueous dry olive mill residues. In: *Plos ONE*, 2012, vol. 7(9), pp. 1-10.
115. GASCH, A.P, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. In: *Mol Biol Cell*, 2000, vol. 11, pp. 4241-4257.
116. GAYOSO, C., et al. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. In: *BMC Plant Biology*, 2010, vol. 10(232), pp. 1-19, doi: 10.1186/1471-2229-10-232
117. GINDRO, K., et al. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. In: *Vitis*, 2006, vol. 45(4), pp. 191–196.
118. 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*, Chişinău, 2014, pp. 16-17.
119. GOLDWASSER, Y., et al. Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptiaca*. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999, vol. 54, pp. 87-96.

120. GOMEZ-ROLDAN, V., et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. In: *Nature*, 2008, vol. 455, pp. 189–194.
121. GRANT, M., LAMB, C. Systemic immunity. In: *Curr Opin in Plant Biol.*, 2006, vol. 9, pp. 414-420.
122. GUST, A.A., PRUITT, R., NÜRNBERGER, T. Sensing danger: key to activating plant immunity. In: *Trends in Plant Sci*, 2017, vol. 22(9), pp. 779-791, doi: 10.1016/j.tplants.2017.07.005
123. HA, C.V., et al. Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2014, vol. 111, pp. 851-856.
124. HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. In: *Front. Plant Sci.*, 2012, vol. 3(77), pp. 1-5.
125. HAMIAUX, C., et al. DAD2 is an alpha/beta hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. In: *Curr Biol.*, 2012, vol. 22, pp. 2032-2036, doi: 10.1016/j.cub.2012.08.007
126. HASSAN, E.A., et al. Histochemical aspects of penetration and vascular connection of broomrape haustoria in the host root, and the possible implication of phenylpropanoids. In: *International Jornal of Agriculture and Biology*, 2004, vol. 6(3), pp.430-434.
127. HAUSSMANN, B.I.G., et al. Improved methodologies for breeding *Striga*-resistant sorghums. In: *Field Crops Res.*, 2000, vol. 66, pp. 195–211.
128. HIRT, H. *Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology*. Paris: Wiley-Blackwell, 2009, 274 p., ISBN: 978-3-527-32290-9
129. HOLBROOK-SMITH, D., et al. Small-molecule antagonists of germination of the parasitic plant *Striga hermonthica*. In: *Nat. Chem. Biol.*, 2016, vol. 12, pp. 724-729.
130. 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
131. HONG, Z., DELAUNEY, A.J., VERMA, D.P. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. In: *Plant Cell*, 2001, vol. 13, pp. 755–768.
132. HUMPHREY, A.J., GALSTER, A.M., BEALE, M.H. Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? In: *Nat. Prod. Rep.*, 2006, vol. 23, pp. 592–614.
133. HYUN, M.W., et al. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. In: *Mycobiology*, 2011, vol. 39(4), pp. 257-265.

134. IGIEHON, N.O., OLUBUKOLA, B. Below-ground-above-ground plant-microbial interactions: focusing on soybean, rhizobacteria and mycorrhizal fungi. In: *The Open Microbiology Journal*, 2018, vol. 12, pp. 261-279, doi: 10.2174/1874285801812010261
135. ITO, S., et al. Effects of triazole derivatives on strigolactone levels and growth retardation in rice. In: *PloS ONE*, 2011, vol. 6(7), pp. 21-23.
136. IVERSON, R.D., et al. Overview and status of the witchweed (*Striga asiatica*) eradication program in the Carolinas. In: *Invasive Plant Management Issues and Challenges in the United States*, 2011, pp. 51–68. doi: 10.1021/bk-2011-1073.ch006
137. JACOBS, A.K., et al. An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. In: *Plant Cell*, 2003, vol. 15, pp. 2503–2513.
138. JEANDET, P. Phytoalexins: current progress and future prospects. In: *Molecules*, 2015, vol. 20(2), pp. 2770–2774, doi: 10.3390/molecules20022770
139. JEANDET, P. Structure, chemical analysis, biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of phytoalexins. In: *Molecules*, 2018, vol. 23(61), pp.1-4, doi: 10.3390/molecules23010061
140. JIN, L., MACKEY, D.M. Measuring callose deposition, an indicator of cell wall reinforcement, during bacterial infection in *Arabidopsis*. In: *Methods Mol Biol.*, 2017, vol. 1578, pp. 195-205, doi: 10.1007/978-1-4939-6859-6_16.
141. JOEL, D.M. PORTNOY, V.H. The angiospermous root parasite *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) induces expression of a pathogenesis related (PR) gene in susceptible tobacco roots. In: *Ann. Bot.*, 1998, vol. 81, pp. 779-781.
142. JOEL, D.M. The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. In: *Crop Prot.*, 2000, vol. 19, pp. 753–758.
143. JOEL, D.M., BAR, H. *The seed and the seedling*. In: *Parasitic Orobanchaceae, Parasitic Mechanisms and Control Strategies*, JOEL, D.M., GRESSEL, J., MUSSELMAN, L.J. (eds), Berlin: Springer, 2013, pp. 147–166. online ISBN 978-3-642-38146-1
144. JOEL, D.M., et al. Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. In: *Phytochemistry*, 2011, vol. 72(7), pp. 624-634.
145. JOHNSON, A.W., et al. The preparation of synthetic analogs of strigol. In: *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, 1981, pp. 1734-1743, doi: 10.1039/P19810001734
146. JOHNSON, S.N., et al. Below-ground herbivory and root toughness: a potential model system using lignin-modified tobacco. In: *Physiological Entomology*, 2010, vol. 35(2), pp. 186–191.

147. JONES, J.D., DANGL, J.L. The plant immune system. In: *Nature*, 2006, vol. 444, p. 323–329, doi: 10.1038/nature052862006
148. KANDAKOV, A., et al. Sunflower market assessment in the Republic of Moldova. In: *11th International Scientific Conference Engineering For Rural Development*. Jelgava, Latvia, 2012, pp. 128-133.
149. KAO, Y.Y., HARDING, S.A., TSAI, C.J. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. In: *Plant Physiol.*, 2002, vol. 130, pp. 796-807.
150. KATOCH, R. Effect of elicitors and *E. polygoni* inoculation on the activity of phenol metabolizing enzymes in garden pea (*Pisum sativum* L.) In: *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 2005, vol. 18(2), pp. 87–91.
151. KHAN, Z.R., et al. Assessment of different legumes for control of *Striga hermonthica* in maize and sorghum. In: *Crop Sci*, 2007, vol. 47, pp. 730–736.
152. KIM, H.I., et al. Structure - activity relationship of naturally occurring strigolactones in *Orobanche minor* seed germination stimulation. In: *Journal of Pesticide Science*, 2010, vol. 35, pp. 344–347.
153. KLIEBENSTEIN, D.J., MONDE, R.A., LAST, R.L. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. In: *Plant Physiol*, 1998, vol. 118(2), pp. 637-650.
154. KOMATSU, S., et al. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. In: *Amino Acids*, 2010, vol. 39, pp. 1435–1449.
155. KOUSSEVITZKY, S., et al. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. In: *J Bio Chem*, 2008, vol. 283(49), pp. 34197–34203.
156. KUN, D., PUKANSZKY, B. Polymer/lignin blends: interactions, properties, applications. In: *European Polymer Journal*, 2017, vol. 93, pp. 618-641, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.04.035
157. KUSUMOTO, D., et al. Resistance of red clover (*Trifolium pratense*) to the root parasitic plant *Orobanche minor* is activated by salicylate but not by jasmonate. In: *Ann Bot.*, 2007, vol. 100(3), pp. 537–544, doi: 10.1093/aob/mcm148
158. LABROUSSE, P., et al. Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against *Orobanche cumana* Wallr. In: *Crop Protection*, 2004, vol. 23, pp. 407–413.

159. LABROUSSE, P., et al. Mineral nutrient concentration influences sunflower infection by broomrape (*Orobanche cumana*). In: *Botany*, 2010, vol. 88, pp. 839-849, doi: org/10.1139/B10-057
160. LABROUSSE, P., et al. Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. In: *Annals of Botany*, 2001, vol. 88, pp. 859-869.
161. LANE, J.A., et al. Resistance of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] to *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, a parasitic angiosperm. In: *New Phytol*, 1993, vol. 125, pp. 405–412.
162. LATTANZIO, V., et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry*, 2006, vol. 37, pp. 23-67.
163. LAZZAROTTO, F., et al. Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. In: *The New phytologist*. 2011, vol. 191, pp. 234-250, doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03659.x.
164. LE GALL, H., et al. Cell wall metabolism in response to abiotic stress plants. 2015, vol. 4, pp. 112-166, doi: 10.3390/plants4010112
165. LEE K.B., JERNSTEDT, J.A. Defense response of resistant host *Impatiens balsamina* to the parasitic angiosperm *Cuscuta japonica*. 2013, vol. 56, pp. 138, doi: 10.1007/s12374-013-0011-z
166. LETOUSEY, P., et al. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. In: *Plant Pathology*, 2007, vol. 56, pp. 536–546.
167. LEYSER, O. The control of shoot branching: an example of plant information processing. In: *Plant Cell and Environment*, 2009, vol. 32, pp. 694-703.
168. LI, P., et al. The efficacy and underlying mechanism of sulfone derivatives containing 1,3,4-oxadiazole on citrus canker. In: *Molecules*, 2015, vol. 20, pp. 14103-14117, doi: 10.3390/molecules200814103
169. LI, S., et al. Effect of GR24 stereoisomers on plant development in *Arabidopsis*. In: *Molecular Plant*, 2016, vol. 9, pp. 1432–1435.
170. LIGHT, M.E., et al. Smoke-derived butenolide: towards understanding its biological effects. In: *So. African J. Bot*, 2009, vol. 75(55), pp. 1–7.
171. 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.

172. LÓPEZ, M. A., BANNENBERG, G., CASTRESANA, C. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. In: *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008, vol. 11, pp. 420-427.
173. LÓPEZ, R., et al. Strigolactones: ecological significance and use as a target for parasitic plant control. In: *Pest Manag Sci.*, 2008, vol. 64, pp. 471–477, doi: 10.1002/ps.1692
174. LOSNER-GOSHEN, D., et al. Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) in host roots. In: *Ann Bot.*, 1998, vol. 81, pp. 319–326.
175. LOUARN, J., et al. Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific QTLs for different parasitism stages. *Front. In: Plant Sci.*, 2016, vol. 7, pp. 590, doi: 10.3389/fpls.2016.00590
176. LOZANO-BAENA, M., et al. *Medicago truncatula* as a model for nonhost resistance in legume-parasitic plant interactions. In: *Plant physiology*, 2007, vol. 145(2), pp. 437-449.
177. LUNA, E., et al. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. In: *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2011, vol. 24, pp. 183-193.
178. MAGALHAES SILVA MOURA, J.C., et al. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. In: *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, vol. 52(4), pp. 360–376.
179. MALEK, J., et al. Racial characterization and genetic diversity of sunflower broomrape populations from Northern Spain. In: *Phytopathologia Mediterranea*, 2017, vol. 56(1), pp. 70–76.
180. MARTÍN-SANZ, A., et al. Increased virulence in sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations from Southern Spain is associated with greater genetic diversity. In: *Front Plant Sci.*, 2016, vol. 7(589), pp. 1-9, doi: 10.3389/fpls.2016.00589
181. MARTÍN-SANZ, A., et al. Post-haustorial resistance based in an increase of phenolic compounds provides a powerful tool to control the parasitic weed broomrape in sunflower. In: *14th World Congress on Parasitic Plants*, USA, California, 2017, Disponibil: <https://digital.csic.es/handle/10261/167962>
182. MATUSOVA, R., MOURIK, T., BOUWMEESTER, H.J. Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. In: *Seed Sci. Res.*, 2004, vol. 14, pp. 335–344.
183. MAUCH-MANI, B. SLUSARENKO, A.J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. In: *Plant Cell*, 1996, vol. 8(2), pp. 203-212.

184. MELDAU, S., ERB, M., BALDWIN, I. Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. In: *Annals of Botany*, 2012, vol. 110, pp. 1503–1514, doi: 10.1093/aob/mcs212
185. MENDOZA, M. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. In: *Biotechnología Vegetal*, 2011, vol. 11, pp. 67-75.
186. MENEZES-BENAVENTE, L., et al. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). In: *Plant Sci.*, 2004, vol. 166, pp. 323–331.
187. MICCO, V., et al. Tyloses and gums: a review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. In: *IAWA Journal*. 2016, vol. 37, pp. 186-205, doi: 10.1163/22941932-20160130
188. MIEDES, E., et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. In: *Front Plant Sci.*, 2014, vol. 5(358), pp. 1-14, doi: 10.3389/fpls.2014.00358
189. MIGNOLET-SPRUYT, L., et al. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. In: *J. In: Exp. Bot.*, 2016, vol.67, pp. 3831-3844.
190. MILLER, R., et al. Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. In: *Annals of Botany*, 2017, vol. 119, pp. 681–687, doi: 10.1093/aob/mcw284
191. MITTLER, R., et al. Reactive oxygen gene network of plants. In: *Trends Plant Sci.*, 2004, vol. 9, pp. 490-498.
192. MOLINERO-RUIZ, L., et al. History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed. In: *A review. Spanish J Agric Res*, 2015, vol. 4(13), article ID e10R01, pp. 1–19.
193. MONSHAUSEN, G., et al. Ca^{2+} regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. In: *The Plant cell.*, 2009, vol. 21, pp. 2341-2356, 10.1105/tpc.109.068395.
194. MOORE, T.H.M., et al. New sources of resistance of Cowpea (*Vigna unguiculata*) to *Striga gesnerioides*, a parasitic angiosperm. In: *Euphytica*, 1995, vol. 84, pp. 165–174.
195. MUHAMMAD, A., et al. Reactive oxygen species (ROS) as defenses against a broad range of plant fungal infections and case study on ROS employed by crops against *Verticillium dahliae* wilts. In: *Journal of Plant Interactions*, 2018, vol. 13(1), pp. 353-363, doi: 10.1080/17429145.2018.1484188
196. MUR, L.A., et al. Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ ethylene plant defense pathways. In: *Frontiers in plant science*, 2013, vol. 4, pp. 1-24, doi: 10.3389/fpls.2013.00215

197. MUSSELMAN, L.J., DICKISON, W.C. The structure and development of the haustorium in parasitic In: *Scrophulariaceae. Bot J Linnean Soc.*, 1975, vol. 70, pp. 183-212.
198. MUTUKU, J.M., et al. The *WRKY45*-dependent signalling pathway is required for resistance against *Striga hermonthica* parasitism. In: *Plant Physiol*, 2015, vol. 168(3), pp. 1152–1163.
199. NAJAMI, N., et al. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: Its identification and characterization. In: *Molecular genetics and genomics*, 2008, vol. 279, pp. 171-82, doi: 10.1007/s00438-007-0305-2.
200. NAKAMURA, H., et al. Molecules of strigolactone perception by DWARF14. In: *Nat Commun.*, 2013, vol. 4 (1), pp. 1-10, doi: 10.1038/ncomms3613.
201. NANDINI, D., MOHAN, J.S.S., SINGH, G. Induction of systemic acquired resistance in *Arachis hypogaea* L. by *Sclerotium rolfsii* derived elicitors. In: *Journal of Phytopathology*, 2010, vol. 158(9), pp. 594–600.
202. NATH, K., et al. Developmental stage-dependent differential gene expression of superoxide dismutase isoenzymes and their localization and physical interaction network in rice (*Oryza sativa* L.). In: *Genes & Genomics*, 2014, vol. 36(1), pp. 45–55, doi: 10.1007/s13258-013-0138-9
203. NAWRATH, C., et al. Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. In: *Arabidopsis Book*, 2013, vol. 11, article ID e0167, pp.1-35, doi: 10.1199/tab.0167
204. NEFZI, F., et al. Response of some chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to *Orobanche foetida* Poir. parasitism. In: *Chilean journal of agricultural research*, 2016, vol. 76, pp. 170-178, doi: 10.4067/S0718-58392016000200006
205. NISHIMURA, M.T., et al. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. In: *Science*, 2003, vol. 301, pp. 969–972.
206. NOMURA, S., et al. Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds. In: *Plant Cell Reports*, 2013, vol. 32(6), pp. 829–838, doi: 10.1007/s00299-013-1429-y
207. NOREEN, S., et al. Exogenous application of salicylic acid enhances antioxidative capacity in salt stressed sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: *Plants Pak. J. Bot.*, 2009, vol. 41(1), pp. 473-479.
208. O'BRIEN, J.A., et al. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. In: *Planta*, 2012, vol. 236, pp. 765–779.

209. OANCEA, F., et al. New strigolactone mimics as exogenous signals for rhizosphere organisms. In: *Molecules*, 2017, vol. 22(6), pp. 961, doi: 10.3390/molecules22060961
210. OMELYANCHUK, N.A., et al. Auxin regulates functional gene groups in a fold-change-specific manner in *Arabidopsis thaliana* roots. In: *Scientific reports*, 2017, vol. 7(1), pp. 1-11, doi: 10.1038/s41598-017-02476-8
211. OTULAK-KOZIEŁ, K., KOZIEŁ, E., LOCKHART, B. Plant cell wall dynamics in compatible and incompatible potato response to infection caused by potato virus Y (PVY^{NTN}). In: *International journal of molecular sciences*, 2018, vol. 19(3), pp. 862, doi: 10.3390/ijms19030862
212. PĂCUREANU-JOIȚA, M. Current situation of sunflower broomrape around the world. In: *4th International Symposium on Broomrape in Sunflower*, Bucharest, Romania, 2018, pp. 21.
213. PACUREANU-JOITA, M., et al. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations in Romania. In: *Helia*, 2009, vol. 32(51), pp. 111-118.
214. PĂCUREANU-JOIȚA, M., VRÂNCEANU, A.V., STANCIU, D. Cincizeci de ani de activitate în ameliorarea florii-soarelui la Fundulea. In: *An. I.N.C.D.A. Fundulea*. 2007, Tom LXXV, , pp. 173-194.
215. PARKER, C., RICHES, C.R. *Parasitic weeds of the world: Biology and Control*. Wallingford: CAB International, 1993, 332 p. ISBN: 0851988733
216. PAVAN, S., et al. Characterization of low-strigolactone germplasm in pea (*Pisum sativum* L.) resistant to crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.). In: *MPMI*, 2016, vol. 29(10), pp. 743-749, doi: 10.1094/MPMI-07-16-0134-R
217. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Allelopathy and allelochemicals within the plant-parasitic weed interaction. Studies with the sunflower - *Orobanche cumana* system. In: *7th International Parasitic Weed Symposium*, Nantes, France. 2001, pp. 197-200.
218. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Histochemistry of the resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*. In: *Grain legumes annual meeting Norwich*, UK, 2005b, pp. 9.
219. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite. In: *Annals of Botany*, 2005c, vol. 95, pp. 935-942.
220. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanche crenata* and *Vicia sativa*. In: *Journal of Experimental Botany*, 2006b, vol. 57, pp. 931-942.

221. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Protein cross-linking, peroxidase and β -1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*. In: *Journal of Experimental Botany*, 2006a, vol. 57, pp. 1460-1469.
222. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Resistance and avoidance against *Orobanche crenata* in pea (*Pisum* spp.) operate at different developmental stages of the parasite. In: *Weed Research*, 2005a, vol. 45, pp. 379-387.
223. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Resistance to broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba*): cell wall changes associated with pre-haustorial defensive mechanisms. In: *Annals of Applied Biology*, 2007b, vol. 151(1), pp. 89–98.
224. PÉREZ-DE-LUQUE, A., et al. Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanche cumana* seed germination. In: *Phytochemistry*, 2000, vol. 58, pp. 45-50.
225. 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.
226. PÉREZ-VICH, B., et al. Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2004b, vol. 109, pp. 92–102.
227. PÉREZ-VICH, B., et al. Dominance relationships for genes conferring resistance to sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). In: *Helia*, 2004a, vol. 27, pp. 183–192.
228. PEYRONNET, R., et al. *AtMSL9* and *AtMSL10*: sensors of plasma membrane tension in *Arabidopsis* roots. In: *Curr Biol.*, 2008, vol. 18, pp. 730–734.
229. PIETERSE, C.M.J., VAN LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defence pathways. In: *Trends in Plant Science*, 1999, vol. 4(2), pp. 52–58.
230. PLAKHINE, D., et al. Maternal tissue is involved in stimulant reception by seeds of the parasitic plant *Orobanche*. In: *Annals of botany*, 2012, vol. 109(5), pp. 979-986.
231. POLONI, A., SCHIRAWSKI, J. Red card for pathogens: Phytoalexins in sorghum and maize. In: *Molecules*, 2014, vol. 19, pp. 9114–9133.
232. PRICOP, S.M., CRISTEA, S. The attack of the *Orobanche cumana* Wallr. and it's influence on a differential sunflower host assortment under Dobrogea conditions. In: *Research Journal of Agricultural Science*, 2012, vol. 44(2), pp. 78-84.
233. 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.

234. RAWAL, H.C., SINGH, N.K., SHARMA, T.R. Conservation, divergence, and genome-wide distribution of *PAL* and *POX* a gene families in plants. In: *International Journal of Genomics*, 2013, article ID 678969, pp. 1-10, doi: org/10.1155/2013/678969
235. RIBEIRO, C., et al. Rice peroxisomal ascorbate peroxidase knockdown affects ROS signaling and triggers early leaf senescence. In: *Plant Science*, 2017, vol. 263, pp. 55–65, 10.1016/j.plantsci.2017.07.009.
236. RISPAIL, N., et al. Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. In: *New Phytol.*, 2007, vol. 173, pp. 703–712.
237. ROSA, S.B., et al. Cytosolic APX knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. In: *Phytochemistry*, 2010, vol. 71(6), pp. 548-558.
238. ROUT, J.R., et al. Copper-stress induced alterations in protein profile and antioxidant enzymes activities in the in vitro grown *Withania somnifera* L. In: *Physiology and molecular biology of plants*, 2013, vol. 19(3), pp. 353-361.
239. RUBIALES, D. Can we breed for durable resistance to broomrapes? In: *Phytopathologia Mediterranea*, 2018, vol. 57(1), pp. 170–185, doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-22543
240. RUBIALES, D. Parasitic plants, wild relatives and the nature of resistance. In: *New Phytologist*, 2003, vol. 160, pp. 455–462.
241. RUBIALES, D., et al. Breeding approaches for crenate broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) managemen in pea (*Pisum sativum* L.). In: *PestManag. Sci.*, 2009, vol. 65, pp. 553–559, doi: 10.1002/ps.1740
242. RUBIALES, D., et al. Characterization of resistance in chickpea to crenate broomrape (*Orobanche crenata*). In: *Weed Sci.*, 2003, vol. 51, pp. 702–707, doi: 10.1614/P2002-151
243. RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. In: *Nature*, 2008, vol. 454(7206), pp. 841-845.
244. SAHM, A., et al. Anatomy and phenylpropanoid metabolism in the incompatible interaction of *Lycopersicum esculentum* and *Cuscuta reflexa*. In: *Acta Botanica.*, 1995, vol. 8, pp. 358–364.
245. SAITO, M.A., SIGMAN, D.M., MOREL, F.M.M. The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: The co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean–Proterozoic boundary? In: *Inorganica Chim. Acta.*, 2003, vol. 356, pp. 308–318, doi: 10.1016/S0020-1693(03)00442-0
246. SBAIHAT, L., et al. Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*. In: *The Scientific World Journal*, 2015, article ID 870520, pp. 1-9, doi:10.1155/2015/870520

247. SCHERP, P., GROTHA, R., KUTSCHERA, U. Occurrence and phylogenetic significance of cytokinesis-related callose in green algae, bryophytes, ferns and seed plants. In: *Plant Cell Reports*, 2001, vol. 20, pp. 143–149.
248. SCHREIBER, L. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. In: *Trends Plant Sci.*, 2010, vol. 15, pp. 546–553.
249. SCHWESSINGER, B., RONALD, P.C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. In: *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2012, vol. 63, pp. 451–482.
250. SEIFERT, G.J., BLAUKOPF, C. Irritable walls: the plant extracellular matrix and signaling. In: *Plant Physiol.*, 2010, vol. 153, pp. 467–478.
251. SERGHINI, K., et al. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobancha cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. In: *Journal of Experimental Botany*, 2001, vol. 52, pp. 2227–2234.
252. ȘESTACOVA, T., et al. Expression of defence-related genes in sunflower infected with broomrape. In: *Biotechnol Biothchnol Equip.*, 2016, vol. 30, pp. 685–691.
253. ȘESTACOVA, T., GISCĂ, I., CUCEREAVÎL, A., TABĂRĂ, O., PORT, A., DUCA, M. Expression of some antioxidant genes in sunflower infected with broomrape. În: *Analele Șt.ale Univ. „Al.I. Cuza”, Sec. Genetică și Biologie Moleculară*, 2015, Tom XVI, Fascicula 3, pp. 97–106.
254. SHAFI, A., et al. Expression of *SOD* and *APX* genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress. In: *Plant Molecular Biology*, 2015, vol. 87(6), pp. 615–631, doi: 10.1007/s11103-015-0301-6
255. SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. In: *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, vol. 6(4), pp. 365–371.
256. SHANNON, D.A., WEERAPANA, E. Covalent protein modification: the current landscape of residue-specific electrophiles. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, vol. 24, pp. 18–26.
257. SHARMA, P., et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. In: *Journal of Botany*, 2012, article ID 217037, pp. 1–26, doi: 10.1155/2012/217037
258. SHI, H., et al. Overexpression of cotton (*Gossypium hirsutum*) dirigent1 gene enhances lignification that blocks the spread of *Verticillium dahlia*. In: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2012, vol. 44, pp. 555–564.

259. STAUDER, R., et al. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the PHYTOENE SYNTHASE gene family. In: *Front Plant Sci.*, 2018, vol. 9(255), pp. 1-18, doi: 10.3389/fpls.2018.00255
260. STEFANOWICZ, K., LANNOO, N., VAN DAMME, E.J.M. Plant F-box proteins – judges between life and death critical. In: *Plant Sciences*, 2015, vol. 34(6), pp. 523-552.
261. STEWART, G., PRESS, M. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. In: *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, 1990, vol. 41, pp. 127-151.
262. STICHER, L., MAUCH-MANI, B., METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. In: *Annual review of phytopathology*, 1997, vol. 35, pp. 235-70, doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.235.
263. **TABARA O.**, PORT A., DUCA M. Pre-haustorial and post-haustorial resistance of sunflower infected with broomrape. In: *4th International Symposium on Broomrape in Sunflower*, București, România, 2-4 iulie 2018, pp. 43.
264. TAKAHAMA, U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. In: *Phytochemistry*, 2004, vol. 3(1-2), pp. 207–219.
265. TAKAHASHI, I., ASAMI, T. Target-based selectivity of strigolactone agonists and antagonists in plants and their potential use in agriculture. In: *Journal of Experimental Botany*, 2018, vol. 69(9), pp. 2241–2254, doi: 10.1093/jxb/ery126
266. TEIXEIRA, F.K., et al. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: Inferences from the rice genome. In: *J Mol Evol.*, 2004, vol. 59, pp. 761–770.
267. TENHAKEN, R. Cell wall remodeling under abiotic stress. In: *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 5(771), p. 1-9, doi: 10.3389/Fpls.2014.00771
268. THOMMA, B.P.H.J., et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. In: *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1998, vol. 95, pp. 15107–15111.
269. TIMKO, M.P., SCHOLLES, J.D. *Host reaction to attack by root parasitic plants*. In: *Parasitic Orobanchaceae, Parasitic Mechanisms and Control Strategies*, JOEL, D.M., GRESSEL, J., MUSSELMAN, L.J. (eds), Berlin: Springer, 2013, pp. 115-141. online ISBN 978-3-642-38146-1
270. TOH, S., et al. Structure-function analysis identifies highly sensitive strigolactone receptors in *Striga*. In: *Science*, 2015, vol. 350, pp. 203-207, doi: 10.1126/science.aac9476

271. TOMA, C., ANDRONACHE, A., GOSTIN, I. Researches regarding the histo-anatomy and floral morphogenesis in some *Orobanche* species. In: *Analele științifice ale Universității "Al. I. Cuza"*, Biologie vegetală, 2007, Tom LIII, , pp. 11-25.
272. TORRES, M. ROS in biotic interactions. In: *Physiologia Plantarum*, 2010, vol. 138, pp. 414–429.
273. TRONCHET, M., et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. In: *Mol. Plant Pathol.*, 2010, vol. 11, pp. 83–92.
274. UEDA, H., KUSABA, M. Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology*, 2015, vol. 169, pp. 138–147.
275. UENO, K., et al. Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. In: *Phytochemistry*, 2014, vol. 108, pp. 122-128.
276. UMEHARA, M., et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. In: *Nature*, 2008 , vol. 455, pp. 195–200.
277. UMEHARA, M., et al. Structural requirements of strigolactones for shoot branching inhibition in rice and *Arabidopsis*. In: *Plant and Cell Physiology*, 2015, vol. 56(6), pp. 1059–1072.
278. VAAHTERA, L., et al. Specificity in ROS signaling and transcript signatures. In: *Antioxid. Redox Signal.*, 2014, vol. 21, pp. 1422-1441.
279. VAN DER PLANK, J.E. Horizontal (polygenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight. In: *American Potato Journal*, 1966, vol. 43(2), pp. 43-52.
280. VANHOLME, R., et al. Lignin biosynthesis and structure. In: *Plant physiology*, 2010, vol. 153(3), pp. 895-905.
281. VASYUKOVA, I.N., OZERETSKOVSKAYA, L.O. Jasmonate-dependent defense signaling in plant tissues. In: *Russian Journal of Plant Physiology*, 2009, vol. 56, pp. 581-590, doi: 10.1134/S102144370905001X.
282. VAZQUEZ-COOZ, I., MEYER, R.W. A differential staining method to identify lignified and unlignified tissues. In: *Biotechnic & Histochemistry*, 2002, vol. 77(5-6), pp. 277–282, doi: 10.1080/bih.77.5-6.277.282
283. VELASCO, L., PÉREZ-VICH, B., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.M. Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision. In: *OCL*, 2016, vol. 23(2), article ID D203, pp. 1-8.

284. VELLOSILO, T., et al. Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. In: *Plant Physiol*, 2010, vol. 154, pp. 444–448.
285. VERMA, D.P., HONG, Z. Plant callose synthase complexes. In: *Plant Molecular Biology*, 2001, vol. 47, pp. 693–701.
286. VIDHYASEKARAN, P., et al. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* in rice leaves. In: *Phytoparasitica*, 2001, vol. 29(2), pp. 155–166.
287. VIEIRA DOS SANTOS, C., et al. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobanche ramosa* infection. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, vol. 62, pp. 297–303.
288. VIMALA, R., SURIACHANDRASELVAN, M. Induced resistance in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid. In: *Journal of Biopesticides*, 2009, vol. 2(1), pp. 111–114.
289. VISHWANATH S.J., et al. Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. In: *Plant Cell Reports*, 2014, vol. 34(4), pp. 573–586, doi: 10.1007/s00299-014-1727-z.
290. VOELKER, S.L., et al. Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. In: *Plant, Cell & Environment*, 2011, vol. 34(4), pp. 655–668, doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02270.x
291. VOIGT, C.A. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. In: *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, pp. 72–77, doi: 10.3389/fpls.2014.00168
292. VRÂNCEANU, A., et al. *Some aspects of the interaction Helianthus annuus L/ Orobanche cumana Wallr. and its implications in sunflower breeding*. In: *Biology and management of Orobanche: PIETERSE AH., VERKLEIJ JAC., TER-BORG S. (eds), Proceedings of the Third International Workshop on Orobanche and related Striga research*. Amsterdam, 1986, pp. 181–189.
293. VRANCEANU, A., et al. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr., different hosts and resistance sources and genes in sunflower. In: *Proc. 9th Int. Sunflower Conf.*, Torremolinos, Spain, Int. Sunflower Assoc., Paris, 1980, pp. 74–82.
294. VURRO, M., et al. Exogenous amino acids inhibit seed germination and tubercle formation of *Orobanche ramosa* (Broomrape): Potential application for management of parasitic weeds. In: *Biol. Control*, 2006, vol. 36, pp. 258–265.

295. WALLY, O., PUNJA, Z.K. Enhanced disease resistance in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants over-expressing a rice cationic peroxidase. In: *Planta*, 2010, vol. 232(50), pp. 1229–1239.
296. WANG, H., et al. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. In: *Plant Molecular Biology*, 2007, vol. 65(6), pp. 799–815.
297. WEGMANN, K., et al. Tolerance and resistance to *Orobanche*. In: *Proceedings of the International Workshop on Orobanche Research*. Tübingen, 1991, pp. 318–321.
298. WESTWOOD, J.H., et al. Expression of a defense-related 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene in response to parasitization by *Orobanche* spp. In: *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1998, vol. 11, pp. 530–536.
299. WESTWOOD, J.H., et al. The evolution of parasitism in plants. In: *Trends in Plant Science*, 2010, vol. 15(4), pp. 227–235, doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.004
300. WEYDERT, C.J., 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
301. WHITNEY, J.P. Broomrape (*Orobanche*) seed germination inhibitors from plant roots. In: *Annals of Applied Biology*, 1989, pp. 475–478, doi: 10.1111/j.1744-7348.1978.tb05976.x.
302. WIGCHERT, S.C.M., et al. Dose-response of seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche* toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. In: *J. Agric. Food Chem*, 1999, vol. 47, pp. 1705–1710.
303. XIA, X.J., et al. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. In: *J Exp Bot.*, 2015, vol. 66, pp. 2839–2856.
304. XU, L., et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. In: *Journal of Experimental Botany*, 2011, vol. 62(15), pp. 5607–5621.
305. XU, L., et al. Quantitative expression profile of PSGR in prostate cancer. In: *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2006, vol. 9. p. 56–61, doi: 10.1038/sj.pcan.4500836.
306. YADETA, K.A., THOMMA, J.B.P. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. In: *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4(97), pp. 1–12, doi: 10.3389/fpls.2013.00097
307. YANG, C., et al. Seed treatment with salicylic acid invokes defence mechanism of *Helianthus annuus* against *Orobanche cumana*. In: *Annals of Applied Biology*, 2016, vol. 169(3), pp. 408–422, doi: 10.1111/aab.12311

308. YAO, R., et al. Rice DWARF14 acts as an unconventional hormone receptor for strigolactone. In: *Journal of Experimental Botany*, 2018, vol. 69(9), pp. 2355–2365, doi: org/10.1093/jxb/ery014
309. YONEYAMA, K., et al. Difference in *Striga* - susceptibility is reflected in strigolactone secretion profile, but not in compatibility and host preference in arbuscular mycorrhizal symbiosis in two maize cultivars. In: *New Phytol.*, 2015, vol. 206, pp. 983-989, doi: 10.1111/nph.13375
310. YONEYAMA, K., et al. Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. In: *Planta*, 2013, vol. 238, pp. 885–894, doi: 10.1007/s00425-013-1943-8
311. YONEYAMA, K., et al. Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. In: *Plant and Cell Physiology*, 2010, vol. 51(7), pp. 1095–1103, doi: 10.1093/pcp/pcq055
312. YONEYAMA, K., et al. Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? In: *J Exp Bot.*, 2018, vol. 69(9), pp. 2231-2239, doi: 10.1093/jxb/ery090
313. YOSHIDA, S., et al. The haustorium, a specialized invasive organ in parasitic plants. In: *Annu Rev Plant Biol.*, 2016, vol. 67, pp. 643-66, doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111702
314. YOU, J., CHAN, Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. In: *Frontiers in plant science*, 2015, vol. 6, article ID 1092, pp. 1-15, doi: 10.3389/fpls.2015.01092
315. ZEHAR, N., et al. Study of resistance to *Orobanche ramosa* in host (oilseed rape and carrot) and non-host (maize) plants. In: *European Journal of Plant Pathology*, 2003, vol. 109, pp. 75–82.
316. ZÉLICOURT, A., et al. Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. In: *Planta*, 2007, vol. 226, pp. 591–600.
317. ZERNOVA, O., et al. Regulation of plant immunity through modulation of phytoalexin synthesis. In: *Molecules*, 2014, vol. 19(6), pp. 7480–7496, doi: 10.3390/molecules19067480
318. ZHAO, Q., DIXON, R.A. Altering the cell wall and its impact on plant disease: from forage to bioenergy. In: *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2014, vol. 52, pp. 69–91.
319. ДОСПЕХОВ, Б.А. *Методика полевого опыта*. Москва: Колос, 1979, 414 с.
320. НИКИТИЧЕВА, Е.И., ТЕРЁХИН, Е.С. Развитие семян и проростка *Orobanche pallidiflora* Wimm. et Grab. (*Orobanchaceae*) В: *Ботанический журнал СССР*. 1978, vol. 61(5), p. 690- 700.

321. ПАНЧЕНКО, А., АНТОНОВА, Т. Особенности защитной реакции устойчивых форм подсолнечника на внедрение заразики. В: *Селко-хоз. Биол.*, 1978, с. 62.
322. ПАНЧЕНКО, А., АНТОНОВА, Т. Реакция устойчивых форм подсолнечника на новые расы заразики. В: *Сборник- ВНИИМК*, 1975, р. 5-9.
323. СИБГАТУЛЛИНА, Г.В., и др. *Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие* Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011, 61 с.
324. УДОВЕНКО, Г.В. Механизм адаптации растений к стрессам. В: *Физиология и биохимия культурных растений*. 1979. Т. 11(2). с. 99-107.
325. <http://www.maia.gov.md> Strategia națională de dezvoltare agricolă și rurală pentru anii 2014 – 2020, accesat pe data 13 februarie 2015.
326. <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/> accesat pe data 22-26 decembrie 2014
327. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=sunflower%20actin> accesat pe data 8-12 decembrie 2014
328. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm> accesat pe data 22-26 decembrie 2014

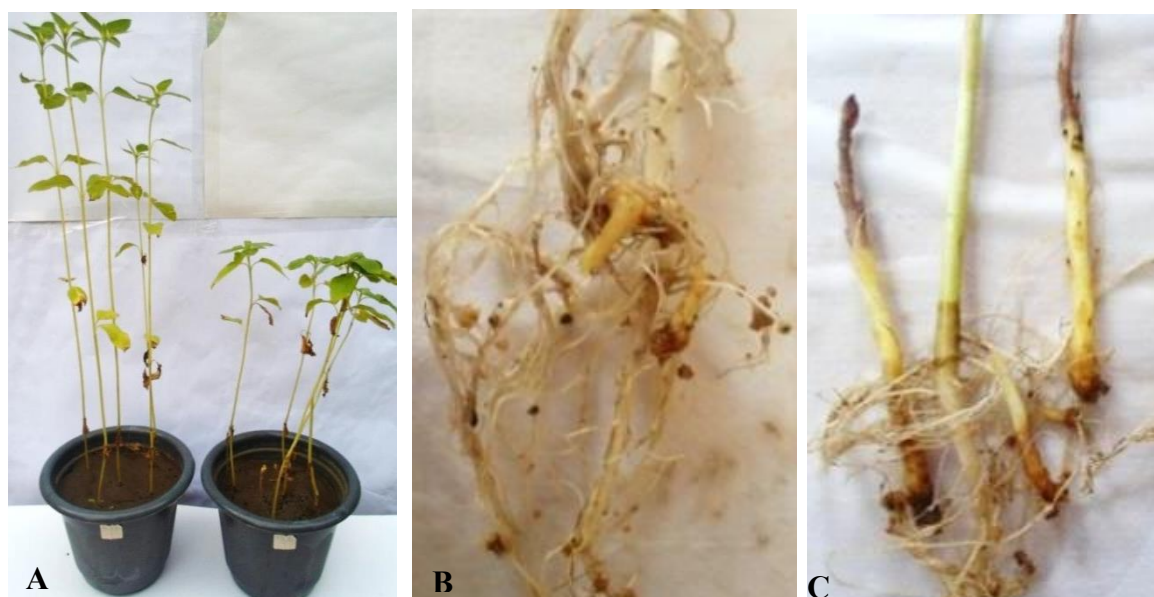
ANEXE

Anexa 1. Aspectul fenotipic al genotipurilor Favorit R și PR64LE20 R



A, C – Înălțimea plantelor martor și celor cultivate pe fondal de infestare; B, D – Aspectul morfologic al rădăcinilor genotipurilor cultivate pe fondal de infestare

Anexa 2. Aspectul fenotipic al genotipului Performer S



A – Înălțimea plantelor martor și a celor infestate (nedezvoltate); B – Aspectul morfologic al rădăcinilor infestate cu tuberculi – 35 de zile; C – Aspectul morfologic al rădăcinilor infestate cu lăstari aerieni fixați de rădăcini – 67 de zile

Anexa 3. Act de implementare a rezultatelor științifice în instruire

Ministerul Educației,
Culturii și Cercetării al Republicii Moldova
Universitatea de Stat "Dimitrie Cantemir"
r. Academiei 3/2, Chișinău, Republica Moldova, MD-2028
tel.: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md



Ministry of Education,
Culture and Research of the Republic of Moldova
"Dimitrie Cantemir" State University
3/2 Academiei str., Chisinau, MD-2028, Republic of Moldova
phone: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md

Nr. 05/en-83 din "12" iulie 2019

ACT DE IMPLEMENTARE

a rezultatelor tezei de doctor

**„Estimarea modificărilor fiziologice și moleculare ale răspunsului defensiv în sistemul
gază-parazit (*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.)”**

Prin prezenta se confirmă că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul tezei de doctor în biologie cu tema **„Estimarea modificărilor fiziologice și moleculare ale răspunsului defensiv în sistemul găză-parazit (*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.)”** realizată de dna Tabără Olesea, sunt implementate în curriculumul universitar pentru studii superioare de licență (ciclu 1) la disciplina *Biologie celulară și Fiziologie vegetală* la Departamentul Științe Biologice și Geonomice a Facultății Științe ale Naturii, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”.

Șef Departamentul Științe Biologice și Geonomice

dr., conf. univ.

BOIAN Ilie

Rector USDC

dr. hab., conf. univ.



HANGANU Aurelia

Anexa 4. Act de implementare a rezultatelor științifice în cercetare

Ministerul Educației,
Culturii și Cercetării al Republicii Moldova
Universitatea de Stat "Dimitrie Cantemir"
Academiei 3/2, Chișinău, Republica Moldova, MD-2028
tel.: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md



Ministry of Education,
Culture and Research of the Republic of Moldova
"Dimitrie Cantemir" State University
3/2 Academiei str., Chisinau, MD-2028, Republic of Moldova
phone: (+373) 022 73 80 16, fax: (+373) 022 73 74 44,
personal.univer@asm.md, www.usdc.md

Nr. 05/m-84/din "12" iulie 2019

ACT DE IMPLEMENTARE

a rezultatelor tezei de doctor

**„Estimarea modificărilor fiziologice și moleculare ale răspunsului defensiv în sistemul
gază-parazit (*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.)”**

Prin prezenta se confirmă că primerii specifici elaborați de dna Tabără Olesca în cadrul tezei de doctor în biologie cu tema **„Estimarea modificărilor fiziologice și moleculare ale răspunsului defensiv în sistemul gazdă-parazit (*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.)”** sunt utilizați pentru studiul expresiei genelor implicate în mecanismele defensive nespecifice și pentru testarea potențialului de rezistență a florii-soarelui la diferiți patogeni în cadrul Laboratorului Genomică, Centrul de Genetică Funcțională, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”.

Rector USDC

dr. hab., conf. univ.



HANGANU Aurelia

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Tabără Olesea

Semnătura

Data

CURRICULUM VITAE

TABĂRĂ OLESEA

Date de contact:

str. Mihai Eminescu, 47
s. Negrea, r-nul Hîncești, Republica Moldova,
+37326970528, +37360432548
teolesea@gmail.com.



Data și locul nașterii: 01.07.1986, or. Nijnevartovsc, Tiumeni, Rusia.

Cetățenia: MD.

Studii superioare:

1. 2014-2018 – studii de doctorat, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, specialitatea – 164.02 – Fiziologia vegetală.
2. 2008-2010 – studii de masterat, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea Biologie și Pedologie, specializarea Genetică moleculară. Diplomă seria AMC000000483.
3. 2005-2008 – studii de licență, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea Biologie și Pedologie, specialitatea Biologie moleculară. Diplomă seria ALII000001011.

Stagii: în ordine descrescătoare pe ani

- Stagiul practic la SCDA, Brăila și INCDA Fundulea, România 1-8 iulie 2018, 4-10 decembrie 2017, 10-15 iulie 2017.
- Training „*Metode de clusterizare*” 30 martie-5 aprilie 2018, CGF, UnAȘM
- Training „*Tehnici de cercetare în biologie moleculară*” 2-3 iulie 2015, Laboratorul de Genomică, UnAȘM
- Stagiul practic la Universitatea din Hohenheim, Stuttgart, Germania, 25-29 octombrie 2015.

Domeniile de interes științific:

Rezistența florii-soarelui la factorii biotici și abiotici, variabilitatea genetico-moleculară în baza markerilor moleculari (RAPD, SSR, ISSR), organisme modificate genetic etc.

Activitatea profesională:

15.09.2008-26.07.2010, Laborant superior, Catedra de Igienă, USMF „N. Testemițanu”

16.08.2010- 30.05.2014, Profesor de biologie și chimie, Gimnaziul Sofia, r-nul Hîncești

23.06.2014-prezent, Cercetător științific stagiar și apoi cercetător științific, Centrul Genetică Funcțională, USDC

Participări la proiecte științifice naționale și internaționale:

Proiecte instituționale:

1. 15.817.05.03F „Rezistența florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.) la lupoaie (*Orobancha cumana* Wallr.): mecanisme genetico-moleculare și fiziologice”, 2015 – 2019, din planul de cercetare al instituției;

2. 11.817.04.19F „Aspecte funcționale și genetico-moleculare ale genomului la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”, 2011 – 2014, din planul de cercetare al instituției în calitate de executant.

Proiecte internaționale:

3. 16.80013.5107.20/Ro, „Evaluarea unor hibrizi de floare-soarelui, privind rezistența la stresul hidric și termic, în România și Republica Moldova”, proiect bilateral moldo-român.

Proiect tineri cercetători

4. 19.80012.05.08F „Efectul imediat al fitopatazitelor *Orobanche cumana* Wallr. asupra florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”, 2019.

Proiect finanțat de RESINFRA

5. „Modernizarea infrastructurii de cercetare în vederea creșterii calității și competitivității în domeniul biologiei moleculare”, 2017-2018.

Participări la foruri științifice (naționale și internaționale):

2018

- International Conference of Agriculture and Food Engineering, 18-19 October 2018, Iasi, Romania. *Teză*
- International Congress on Oil and Protein Crops ”Eucarpia”, 20-24 May 2018, Chisinau, Republic of Moldova. *Teză și Raport oral*
- 4th International Symposium on Broomrape in Sunflower, 2-4 July 2018, Bucharest, Romania *Teză și Poster*

2017

- International Plant Breeding Conference, 15-20 October 2017, Kyrenia, Turcia. *Teză*
- Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători”, 15 iunie 2017, Chișinău, Republica Moldova. *Poster, Articol.*

2016

- A V-a ediție a Conferinței științifice (cu participare internațională) a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători” dedicată aniversării a 70-a de la crearea primelor Institute de Cercetare și a 55-a de la fondarea Academiei de Științe a Moldovei, 25 mai 2016. *Poster, Articol.*
- The International Conference ”Life Science in the Dialogue of Generations: Connections between Universities, Academia and Business Community”, 25 March 2016, Chisinau, Republic of Moldova. *Teză.*

2015

- The Xth International Congress of Geneticists and Breeders, 28 June – 1 July 2015, Chisinau, Republic of Moldova. *Teză, raport oral.*
- The XI International scientific conference for students and Phd students, 20-23 April 2015, Ukraine, Lvov
- Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători” Ediția a IV-a, UnAȘM, 10 martie, 2015, Chișinău, Republica Moldova. *Poster, teză.*

Lucrări științifice și științifico-metodice publicate:

18 lucrări științifice: 9 articole științifice, 9 comunicări la forumuri internaționale.

Premii, mențiuni, distincții etc.

2015 - **Bursa Regina Maria**, oferită de casa Regală a României

2017 – **Bursa de cercetare** în memoriam „Mircea Ciuhrii”

Cunoașterea limbilor:

limba română – limba maternă, limba rusă – fluent, limba franceză – bine, certificat B2, limba engleză – mediu.