СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

SOFIA UNIVERSITY
St. KLIMENT OHRIDSKI
FACULTY OF BIOLOGY

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

FACULTY OF BIOLOGY
SOFIA UNIVERSITY

**ДОКТОРСКА ПРОГРАМА: Биохимия**

**ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.3 Биологически науки**

**КАТЕДРА: Биохимия**

# Автореферат на

# Дисертационен труд

## Биотични фактори, модулиращи отношенията между паразитни цветни растения от род *Cuscuta* и техните гостоприемници


**Докторант**

**Стефан Светославов Савов**

**Научни ръководители:**

**доц. дн Любен Загорчев**
**доц. д-р Деница Теофанова**

**Ръководител катедра:**

**проф. д-р Иванка Цачева**

**Катедра Биохимия**

**Биологически факултет**

**Софийски университет „Св. Климент Охридски“**


**София, 2026 г.**

Дисертационният труд е написан на 119 страници. Онагледен е с 4 таблици и 39 фигури. Цитирани са 114 литературни източника.

Изследванията бяха извършени в катедра „Биохимия“ на БФ към СУ „Св. Климент Охридски“, факултет по Земеделие, Храни и Околна среда към Университет на Катания, Италия и факултет по Ботаника към Университет на Инсбрук, Австрия.

На Факултетен съвет проведен на 26.05.2026 г. беше гласувано петчленно научно жури, пред което да бъде осъществена защитата, в следния състав:

Вътрешни членове:

1. Доц. д-р Кирилка Младенова
2. Доц. д-р Йоана Кижева

Външни членове:

1. Проф. д-р Красимир Русанов (АБИ-ССА)
2. Проф. д-р Валя Василева (ИФРГ-БАН)
3. Доц. д-р Георги Бончев (ИФРГ-БАН)

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ……..г. от……..ч.

в заседателната зала на Биологически факултет съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в СУ „Свети Климент Охридски“ на открито заседание на научното жури.

Искам да изкажа благодарности на научните си ръководители доц. дн Любен Загорчев и доц. д-р Деница Теофанова за това, че ми дават знания и възможности да ги развивам, за доверието, търпението и за добрите идеи. Благодаря на целия екип на катедра „Биохимия“ към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ за възможността да работя в добра научна среда с ентусиазирани професионалисти.

Благодаря на Мартин, за цялата помощ в живота и науката. Благодаря на колегите от Австрия проф. Илзе Кранер, доц. Томас Роуч, д-р Ъруан Арк и Мориц Стегнер, че ме научиха на HPLC. Благодаря на проф. Витория Катара, Александрос Моска и Даниеле Никотра за чудесната обстановка и възможност да изучавам биоинформатика в Катания.

Благодаря на гл.ас. Калина Пачеджиева и доц. Анита Тошева за помощта при определянето на растения от нашата природа. Благодаря на доц. Илия Гьонов и доц. Албена Гьонова за помощта при работа с насекоми.

Работата по настоящата дисертация е финансирана от Европейския съюз - NextGenerationEU, чрез Националния план за възстановяване и устойчивост на Република България, проект № BG-RRP-2.004-0008 и от Фонд Научни Изследвания към Министерство на Образованието и Науката, проект № КП-06-Словакия-5 от 13.08.2024.

**Използвани съкращения**

ABA - абсцисиева киселина

ASV - Amplicon sequence variant

DW - сухо тегло

GA - гиберелинова киселина

GSH - редуциран глутатион

GSSG - оксилен глутатион в димер

IAA - индолоцетна киселина

IAAsp - конюгат на IAA с аспартат

JA - жасмонова киселина

OF - observed features, брой наблюдавани таксони

PCoA - анализ на главните координати

PR - свързани с патогенезата

RAPD - random amplified polymorphic DNA

ROS - реактивни кислородни видове

SA – салицилова киселина

## Въведение

Паразитните растения са група, изцяло или частично зависеща от пренос на молекули от други растения – гостоприемници. В България се срещат множество паразитни растения, някои от които хемипаразити (със запазена фотосинтеза, но се нуждаят от вода и разтворените в нея минерални вещества), а други – холопаразити (изцяло зависят от своя гостоприемник). С 9 вида е представен род *Cuscuta* (кукувича прежда), които са стъблени холопаразити, широко разпространени по диви и културни растения.

Както всички други растения, и кукувичата прежда може да бъде обект на стрес от различно биологично естество – гъби, бактерии, насекоми и други.

Известно е, че вирусите и микоплазмите срещани при *Cuscuta spp.* могат да бъдат пренасяни към гостоприемниците и обратно,. Засега доказателства за пряк пренос на бактерии все още липсват, като има само косвени наблюдения за частично припокриване на ендофитния микробиом.

Насекомите, свързани с паразитните растения също важни от екологична гледна точка, с цел контролиране на популациите им, когато става дума за фитофаги, и за разпространението им, що става дума за опрашители. Важни представители на първата група са хоботниковите бръмбари от род *Smicronyx*, които могат да снасят яйцата си в стъблата и цветовете на *Cuscuta sp.* и развилите се от тях ларви водят до формирането на гали – структури с нетипична физиология и метаболизъм.

Изучаването на биотичните взаимодействия между паразита и неговия микробиом и инсектом е ключово с цел разбиране на физиологията на растението. Освен това, то може да спомогне за разкриване на потенциални методи за ограничаване на заразяването, особено в случаите, когато са засегнати културни растения.

Въпреки наличните в литературата данни по отношение на различни биотични фактори, влияещи върху взаимоотношенията паразит-гостоприемник, все още ненапълно изяснени са механизмите, стоящи в основата на модулиращия им ефект. Именно разкриването на промените, предизвикани от тях е залегнало в целите на настоящия дисертационен труд.

## Цели и задачи

Целта на дисертационния труд е да се идентифицират биохимичните и молекулярни механизми, стоящи в основата на промените, настъпващи в следствие на влияние на биотични фактори върху паразитното растение *Cuscuta campestris*.

Формулирането ѝ е базирано на две научни хипотези, разглеждащи проблема в светлината на микробиома и инсектома като биотични фактори:

Хипотеза 1: Галообразуването води до стресов отговор при паразитното растение, подложен на хормонална и епигенетична регулация.

Хипотеза 2: Наблюдават се двупосочни взаимоотношения между паразитното растение и неговия микробиом с модулиращ ефект - налични са тесни връзки и взаимодействия между *Cuscuta spp.* и ризосферните микроорганизми на гостоприемника, както и между ендофитните съобщества на двойката паразит-гостоприемник.

С цел проверка на хипотезите са поставени следните научни задачи:

Към хипотеза 1:

1. Оценка на отговора срещу оксидативен стрес на *C. campestris*, предизвикан при образуване на гали на *Smicronyx sp.* и дефиниране на промените в молекулни маркери за антиоксидантна защита.

2. Анализ на модификациите в хормоналния профил на паразитното растение вследствие на галообразуване.

3. Определяне на диференциалната генна експресия на белтъци със специфични функции за защита срещу патогенеза.

4. Идентифициране на наличието на промени в ДНК метилирането, предизвикани от фитофаги, и съответстващият им физиологичен ефект.

Към хипотеза 2:

1. Определяне на двустранните взаимоотношения на ендофитните микробиални съобщества на двойката паразит-гостоприемник.

2. Оценка на потенциала на *C. campestris* като вектор на ендофитни микроорганизми.

3. Идентифициране на ризосферните микробиални съобщества на различни гостоприемници и промените настъпващи при паразитизъм на *C. campestris*.

**Материали и методи**

Растителен материал от *Cuscuta campestris* – стъбла и гали, както и гостоприемници на паразита са събрани от различни локации в района на София и София-област.

Кукувича прежда е отглеждана в лабораторни условия върху гостоприемници *Arabidopsis thaliana* и *Thellungiella salsuginea.*

Методи, използвани при изработването на настоящата дисертация:

RAPD анализ за таксономично определяне на представителни на род *Cuscuta* (Noshad et al., 2021).

LC-MS за определяне на концентрациите на растителни хормони (Buchner et al., 2017).

HPLC за околичествяване на токохроманоли (Remias et al., 2005) и водоразтворими антиоксиданти (Bailly & Kranner, 2011).

qPCR за определяне нивата на относителна експресия на гени, свързани с производството на PRбелтъци.

Изолиране на тотална растителна ДНК и последващ анализ на статуса на метилиране чрез бисулфитно секвениране и биоинформатична обработка в софтуер DSS и KOBAS(Mao et al., 2005, Feng et al., 2014; Park & Wu, 2016; Wu et al., 2015).

Изолиране на бактериална ДНК и последващо NGS секвениране на V3-V4 региони на 16S рДНК за определяне на таксономична принадлежност на ендофитни и почвени микроорганизми при различни представители на *Cuscuta campestris* и нейните гостоприемници.

QIIME 2 за обработка на биоинформатични данни от секвениране на 16s рДНК (Bolyen et al., 2019).

GelAnalyzer за анализ на големина на ДНК фрагменти (Lazar Jr. & Lazar Sr.).

GrapPad Prism8 за еднофакторен ANOVA, Student's T-test и графично представяне на данните от HPLC анализи, алфа и бета разнообразие (Principal Coordinates Analysis PCoA) на микробиални съобщества, както и анализите за степен на метилиране на ДНК.

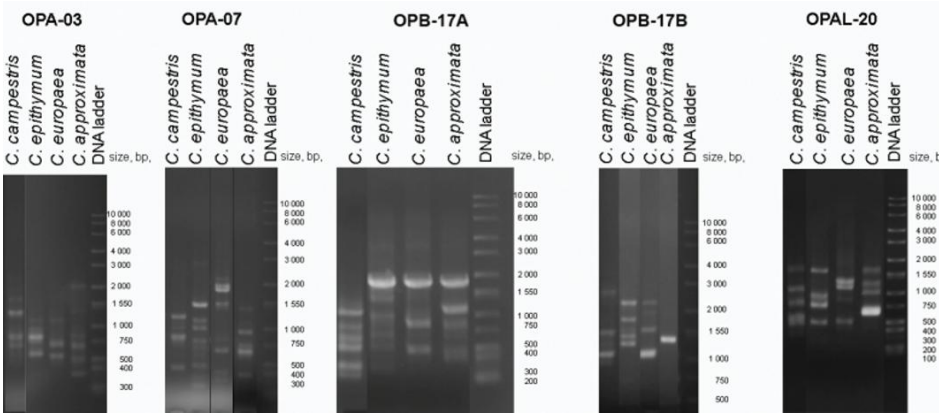
Microsoft Excel за изготвяне на графики за относителното таксономично разнообразие и диференциалното разпределение на бактериални съобщества.

Софтуер CFX Maestro за изчисляване на нивата на относителна генна експресия и представянето им в графики.

**Резултати и дискусия**

**RAPD анализ**

При използваните пет праймера се наблюдават разлики в амплификацията на полиморфни фрагменти (random amplified polymorphic DNA, RAPD) при различните видове кукувича прежда. Броят наблюдавани фрагменти варира от 1 (*C. approximata* с OPB-17B) до 15 (*C. epithymum c* OPB-17A). Като цяло *C. campestris* и *C. epithymum* са представени с най-голям брой фрагменти при различните праймери, а *C. approximata* - с най-малко (с изключение на OPB-17A). Представителни RAPD профили са показани на Фигура 1. Създадена е референтна база данни за всеки отделен вид *Cuscuta*, включващ характеристични комбинации от такива профили. Тя е използвана за всички използвани растения кукувича прежда в настоящата дисертация, като спрямо нея те са определени като *C. campestris.*




Фигура 1. RAPD профили на четири вида от род *Cuscuta*, в присъствието на пет вида праймери. Посочени са използваните полиморфни праймери (отгоре) и големините на фрагмените на използвания маркер (DNA ladder - вдясно) (Teofanova et al., 2025).

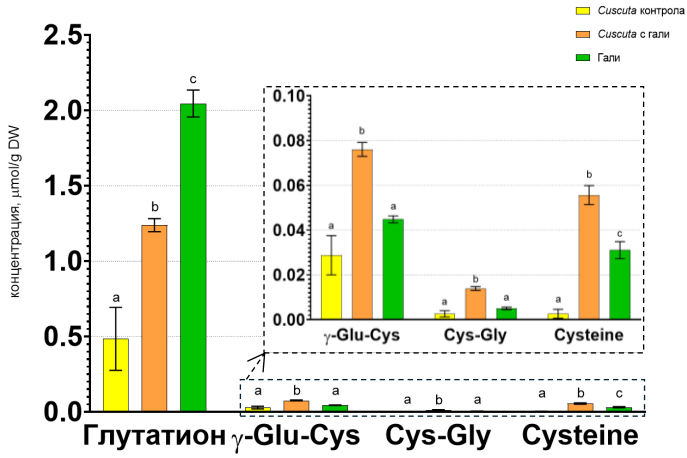
**Оксидативен стрес и антиоксидантен отговор при галообразуване**

Формирането на гали води до пренастройване на метаболизма в засегнатите тъкани, включително промяна във фотосинтетичните процеси и други енергозависими пътища които не са типични за паразитното растение (Ushima et al., 2024). Подобни процеси могат да доведат до повишено образуване на реактивни кислородни видове (ROS) , което от своя страна изисква засилена антиоксидантна защита. В този контекст високите нива на редуциран глутатион (GSH) и други антиоксиданти в галите могат да се разглеждат като механизъм за поддържане на редокс хомеостазата в условия на локален оксидативен стрес.

Наблюдаваните значително по-високи концентрации GSH в галите (2.04 µmol/g DW (сухо тегло)) в сравнение с контролна кукувича прежда (0.48 µmol/g DW), както и повишените му нива в заразените стъбла (1.24 µmol/g DW) (Фигура 2), отразяват локалния адаптивен отговор на растението към биотичния стрес, индуциран от развиващата се ларва. Това вероятно е свързано със засилен метаболитен оборот на глутатиона, потвърждаващо се от повишените нива на прекурсорите цистеин и γ-глутамил-цистеин, и на продукта на

разграждане цистеинил-глицин (Bachhawat & Yadav, 2018) в стъблата с гали и потенциалното им пренасочване от тях към галите (Du et al., 2024), което предполага активна регулация на този антиоксидантен пул.

Фиг.2 Концентрация на редуцирани глутатион, γ-глутамил-цистеин, цистеинил-глицин и цестеин в проби от стъбла и гали на *C.campestris*. Различни букви обозначават статистически значими разлики



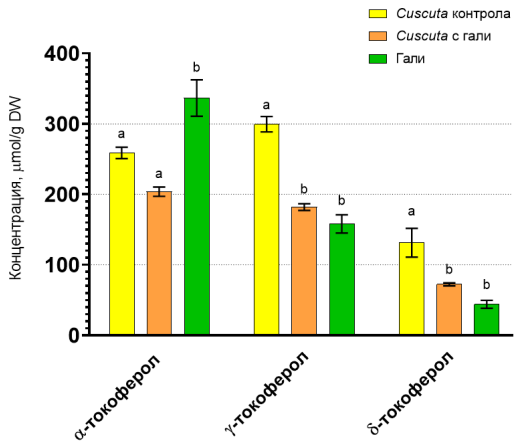

($p<0.05$) в рамките на едно изследвано съединение, изчислени чрез еднофакторен ANOVA.

Ниските концентрации на окислен глутатион (GSSG) и на окислени форми на цистеина във всички групи, както и високото съотношение GSH/GSSG (приблизително 100:1), показват, че въпреки наличието на стресови фактори, клетките се намират в силно редуциращи условия. Това предполага ефективно функциониращи механизми, които поддържат глутатиона в редуцирана форма, сред тях вероятно висока активност на ензими като глутатионредуктаза (Zagorchev et al., 2013) . Така наблюдаваните промени отразяват по-скоро превантивна адаптация, отколкото настъпил значителен оксидативен стрес към момента на измерването.

По-ниските числови стойности на редукционния потенциал при заразените растения и галите (съответно -254 mV и -246 mV) в сравнение с контролните (-186 mV) (Фигура 3) допълнително подкрепят идеята за засилена редуцираща среда в следствие на галообразуване. Това може да се разгледа и като системен ефект, при който сигналите, генерирани в зоната на инфекция, водят до промени и в съседните тъкани. Подобна реакция би могла да повиши общата устойчивост на растението към последващи стресови въздействия, включително вторични инфекции от патогени, като по този начин би се запазила жизнеспособността както на растението, така и на развиващото се насекомо (Hernández et al., 2017).

Фигура 3. Редукционен потенциал в проби от стъбла и гали на *C.campestris*, изчислен спрямо концентрациите на редуциран и окислен глутатион. Различни букви обозначават статистически значими разлики ($p<0.05$), изчислени чрез еднофакторен ANOVA.

Друг молекулен маркер за антиоксидантен отговор са нивата на токоферолите (Фигура 4), които също корелират с предишните наблюдения. Значително по-високата концентрация на α-токоферол в галите (336.64 µmol/g DW, в сравнение с 258.81 µmol/g DW при контрола) предполага засилена нужда от липидна антиоксидантна защита, тъй като α-токоферолът е с основна роля при предпазването на мембранните липиди срещу прекисно окисление, а също така има роля и в модулацията на цялостния отговор при биотичен стрес. Едновременното намаляване на γ-токоферол в същите тъкани вероятно е свързано с метаболитно пренасочване към синтез на α-токоферол, тъй като γ-токоферолът служи като негов прекурсор (Savignac et al., 2022). При контролните растения се наблюдават по-високи нива на γ- и δ-токоферол, което отразява различен физиологичен статус, при който липсва необходимост от интензивно преобразуване към α-токоферол. Това разпределение на токоферолните форми предполага, че различните съединения изпълняват специфични роли в зависимост от метаболитното състояние и типа стрес.

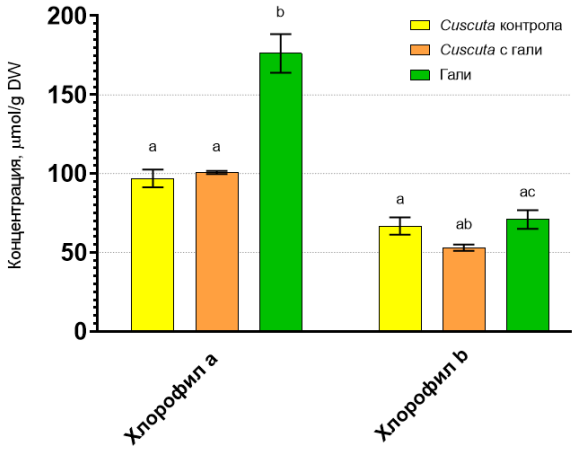



Фигура 4. Концентрация на токофероли в проби от стъбла и гали на *C.campestris*. Различни букви обозначават статистически значими разлики ($p<0.05$) в рамките на едно изследвано съединение, изчислени чрез еднофакторен ANOVA.

В обобщение, наблюдаваните биохимични промени могат да се обяснят с комплексен отговор на кукувичата прежда към индуцирания от ларвата стрес, включващ локално и системно активиране на антиоксидантни механизми, пренастройване на глутатионовия метаболизъм и селективно натрупване на различни липидно-разтворими антиоксиданти. Тези процеси осигуряват поддържане на клетъчната хомеостаза и създават условия за продължително съществуване на взаимодействието между растението и насекомото.

**Промени в пигментния профил в отговор на биотичен срес**

Гореспоменатата хипотеза за функционални промени във фотосинтетичния апарат допълнително се подкрепя от получените данни за различните видове хлорофил (Фигура 5). Значително по-високата концентрация на „хлорофил a“ в галите (176.2 µmol/g DW в сравнение със 96.9 µmol/g DW при контролни стъбла) предполага увеличен капацитет за първични фотохимични реакции, докато относително стабилните нива в контролните и заразени стъбла отразяват запазено, но ограничено фотосинтетично състояние. „Хлорофил b“, който е свързан основно периферните части на светлосъбиращите комплекси (Zagorchev et al., 2021), не показва съществени промени, което може да означава, че разширяването на фотосинтетичния капацитет в галите е по-скоро свързано с реакционните центрове, отколкото с антенните комплекси. Въпреки това редица промени се наблюдават в голям брой от останалите типове пигменти в отговор на стреса от галообразуване.




Фигура 5. Концентрация на хлорофил a и хлорофил b в проби от стъбла и гали на *C.campestris*. Различни букви обозначават статистически значими разлики ($p<0.05$) в рамките на едно изследвано съединение, изчислени чрез еднофакторен ANOVA.

Част от наблюдаваните промени в профила на каротеноидите (Фигура 6) вероятно се дължат на динамиката на ксантофилния цикъл (включващ зеаксантин и по-епоксидираните антера- и виолаксантин) (Remias et al., 2005) и адаптацията на растението към различни светлинни условия, както и чрез специфичните метаболитни особености на галите. Значително повишените концентрации на виолаксантин в заразените стъбла (8.52 µmol/g

DW) и особено в галите (15.73 µmol/g DW) в сравнение със контролата (4.15 µmol/g DW), съпроводени с по-ниски нива на зеаксантин, предполагат изместване на равновесието в ксантофилния цикъл към по-епоксидираните форми. Процесът на ензимно превръщане на зеаксантин във виолаксантин (през антераксантин) обичайно се наблюдава в условия на ниска осветеност (low-light), докато при висока осветеност (high-light) процесът протича в обратна посока с натрупване на зеаксантин, който има ключова роля в нефотохимичното разсейване на излишъка от светлинна енергия (Fernández-Marín et al., 2021).

В този контекст по-ниските нива на зеаксантин и по-високите на виолаксантин в галите могат да отразяват среда, функционално наподобяваща low-light условия, въпреки че тези структури са изложени на светлина. При кукувичата прежда, която еволюционно има редуциран фотосинтетичен капацитет, подобно изместване може да показва опит за частично активиране на фотосинтетични процеси в галите, но при условия, които не водят до интензивно светлинно натоварване. Данните от заразените стъбла имат потвърдителен характер за това предположение, тъй като са толкова осветени, колкото и незаразени стъбла, но се наблюдава частична промяна в посока, идентична на тази в галите.

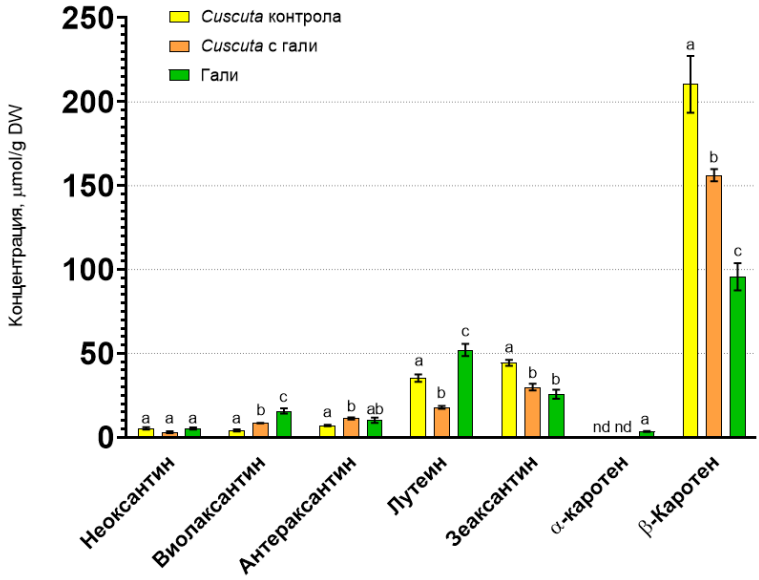
Повишените нива на антераксантин (междинен метаболит между зеаксантин и виолаксантин) в заразените стъбла и галите, също подкрепят активното протичане на ксантофилния цикъл. Натрупването му може да е индикатор за динамично равновесие между двете крайни форми, вероятно в отговор на променливи локални условия.

Наблюдава се отговор тип „low-light“, за разлика от „high-light“ при нестресирана *Cuscuta*. Увеличаването на нивата виолаксантин в галите, съпроводено с по-ниски нива на зеаксантин не е артефакт на метода, защото се наблюдава и в заразени стъбла. Стимулираната, но не и пълноценна фотосинтеза, показва, вероятна липса на всички необходими елементи, затова като компенсаторен механизъм галата се държи като „low-light“ растение в опит да замени липсите.

Концентрацията на неоксантин остава относително непроменена между групите, което е очаквано, тъй като той не участва директно в ксантофилния цикъл, но е структурен компонент на светлосъбиращите комплекси. Липсата на значими разлики предполага, че основната организация на тези комплекси не е драматично нарушена.

Интересна е тенденцията при лутеина, който при здрави стъбла е 35.28 µmol/g DW, значително по-нисък в заразените стъбла (17.48 µmol/g DW) и силно повишен в галите (52.05 µmol/g DW). Лутеинът има ключова роля в стабилизирането на светлосъбиращите комплекси и във фотозащитата, като не участва директно в ксантофилния цикъл (Xie et al., 2021). По-ниските му нива в заразените тъкани биха могли да отразяват частично разграждане или пренасочване на каротеноидния метаболизъм в условия на стрес, при които структурата на фотосистемите е нарушена. От друга страна, високата му концентрация в галите може да е свързана с изграждането или стабилизирането на нови или модифицирани фотосинтетични комплекси, което е в съответствие с повишените нива на хлорофили в тези структури (Фигура 5).

Всички вече изброени пигменти са част от каротеноидния метаболизъм. Специфични модулации в него могат да обяснят наличието на α-каротен само в галите (Фигура 6). Известно е, че α- и β-каротен се синтезират чрез разклонение в каротеноидния биосинтетичен път от ликопен, след което от α-каротен може да се синтезира лутеин а от β-каротен - зеаксантин (и другите ксантофили) (Venado et al., 2017). Така значителното намаляване на β-каротен в заразените стъбла (156.28 µmol/g DW) и още повече в галите (95.71 µmol/g DW в сравнение с 210.42 µmol/g DW при незаразени стъла) може да се обясни с повишеното му използване като прекурсор за ксантофили. Също така е вероятно понижената му концентрация да е в следствие на гасене на радикали (включително азотни и хидроксилни) и последващата му деградация (Han et al., 2012), което от своя страна е свързано и с антиоксидантната функция на тези молекули.



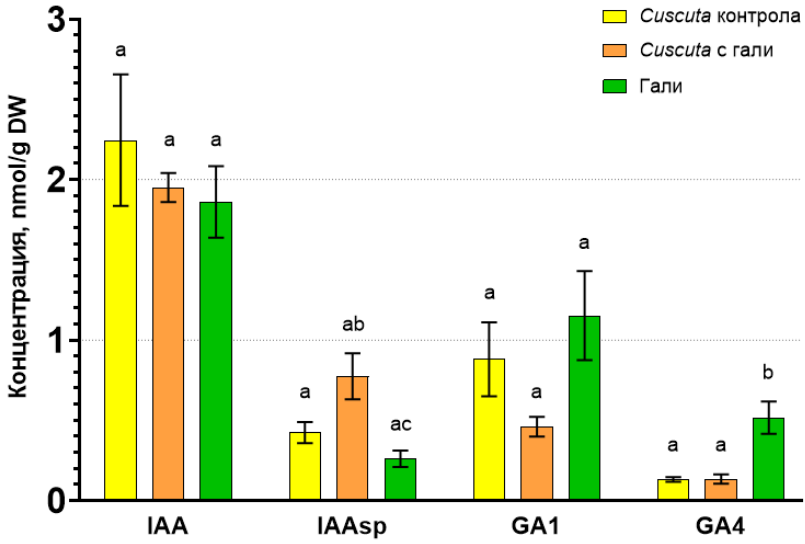

Фигура 6. Концентрация на различни каротеноиди в проби от стъбла и гали на *C.campestris*. Различни букви обозначават статистически значими разлики ($p<0.05$) в рамките на едно изследвано съединение, изчислени чрез еднофакторен ANOVA.

**Влияние на галообразуването върху хормоналния профил**

При галообразуването се наблюдава растеж и разрастване на тъканите на гостоприемника (в случая кукувича прежда), който типично се дефинира като стресово явление. Това предполага координирана регулация, при която се съчетават процеси на защита и поддържане на подходяща вътрешна среда, свързани с промени в нивата на растежните и стресовите хормони (Фигура 7 и Фигура 8). Концентрацията на свободната индол-3-оцетна киселина (IAA) остава сходна между трите групи (контролни, заразени стъбла и гали),

докато диференциалните промени в нивата на нейния конюгат с аспартат (IAAsp, метаболитно неактивна форма) показват, че регулацията на ауксиновия сигнал вероятно се осъществява чрез механизми на „складиране“ и инактивиране на IAA (Hayashi et al., 2021) извън галите. Въпреки това, сходните нива и на двете ауксинови групи предполагат че формирането на галите не е базирано на този тип хормонална регулация.

Разликите в размерите и степента на разрастване на галите по-вероятно се дължат на действието на гиберелините (GA), отколкото на ауксините. Значително по-високата концентрация на $GA_4$ в галите (0.52 nmol/g DW в сравнение с 0.13 nmol/g DW при двете стъблени групи), както и тенденцията за повишени нива на $GA_1$ (Фигура 7), са в съответствие с добре установената роля на гиберелините в стимулирането на клетъчното удължаване и органогенезата. Наблюдението, че цветове често се развиват в близост до галите допълнително подкрепя тази интерпретация, тъй като гиберелините участват активно в прехода към репродуктивно развитие и могат да стимулират формирането на такива органи (Castro-Camba et al., 2022).

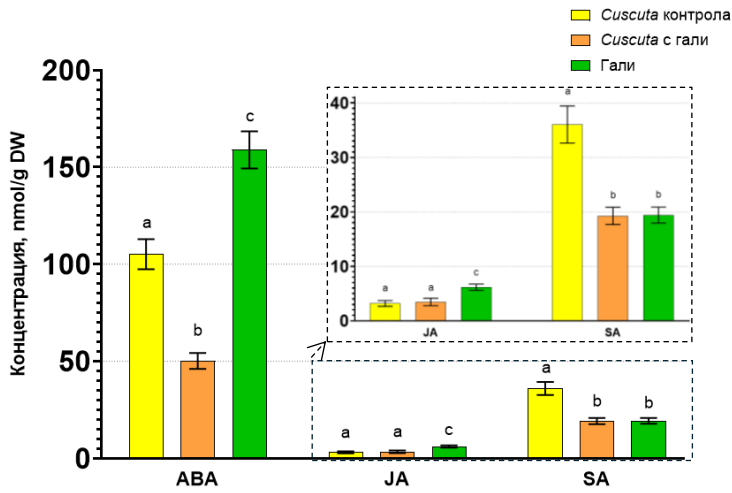



Фигура 7. Концентрация ауксини и гиберелини в проби от стъбла и гали на *C.campestris*. Различни букви обозначават статистически значими разлики ($p<0.05$) в рамките на едно изследвано съединение, изчислени чрез еднофакторен ANOVA.

По отношение на стресовите хормони, повишените нива на абсцисиева киселина (ABA) в галите (159.02 nmol/g DW) в сравнение с стъбла без гали (105.21 nmol/g DW) и стъбла с гали (50.23 nmol/g DW) (Фигура 8) насочват към важна роля в регулацията на водния баланс. ABA е ключов фактор за намаляване на транспирацията чрез контрол на устицата.

Като се има предвид, че кукувичата прежда по принцип притежава ограничен брой устица, допълнителното повишаване на ABA вероятно води до още по-силно ограничаване на водните загуби (Li et al., 2015). Това може да създава по-стабилна и контролирана вътрешна среда в тъканите на галите, което е потенциално благоприятно за развитието на ларвата. В същото време ABA е свързана и с поддържането на редокс хомеостазата (активирайки аскорбат-глутатионовия цикъл) (Li et al., 2022), което корелира с наблюдаваните по-рано високи нива на редуциран глутатион и други антиоксиданти.

Жасмоновата киселина (JA), чиито нива също са повишени в галите (6.17 nmol/g DW срещу 3.18 nmol/g DW при контроли) (Фигура 8), вероятно участва в активирането на защитни механизми срещу биотичен стрес. JA е добре известна с ролята си в отговорите срещу увреждане и нападение, включително чрез индуциране на синтеза на защитни съединения. Паралелно с това, понижените нива на салицилова киселина (SA) в заразените тъкани (19.26 nmol/g DW) и галите (19.40 nmol/g DW, срещу 36.03 nmol/g DW при здрави растения) предполагат изместване на баланса между JA- и SA-зависимите сигнални пътища. SA обикновено се свързва със защита срещу биотрофни патогени, включително бактерии и някои гъби, както и с активиране на гени за PR белтъци (Yang et al., 2019). Намалените нива на SA могат да означават активна промяна на този тип защита, за сметка на JA-зависими механизми, което да се контролира директно от ларвата с цел нейното преживяване.




Фигура 8. Концентрация на стресови хормони в проби от стъбла и гали на *C.campestris*. Различни букви обозначават статистически значими разлики ($p<0.05$) в рамките на едно изследвано съединение, изчислени чрез еднофакторен ANOVA.

Тази хормонална крос-регулация вероятно е тясно свързана и с метаболитните промени, наблюдавани по-рано. Повишените нива на ABA и JA могат да стимулират антиоксидантните системи, включително натрупването на глутатион (GSH), както и

промени в липидния метаболизъм, свързани със стабилизиране на мембраните чрез токофероли и каротеноиди. От своя страна, редокс състоянието може да влияе върху експресията на защитни гени, включително PR гени (свързани с патогенезата), като по този начин се осигурява интегриран отговор между растеж, защита и метаболитна адаптация (Huchzermeyer et al., 2022).

В обобщение, данните предполагат, че формирането и поддържането на галите е резултат от балансирано взаимодействие между растежни и стресови хормони, при което гиберелините играят водеща роля в разрастването, а ABA и JA – в адаптацията и защитата. Едновременно с това се наблюдава потискане на SA-зависимите пътища, което може да отразява специфична стратегия за регулиране на защитния отговор при тези условия.

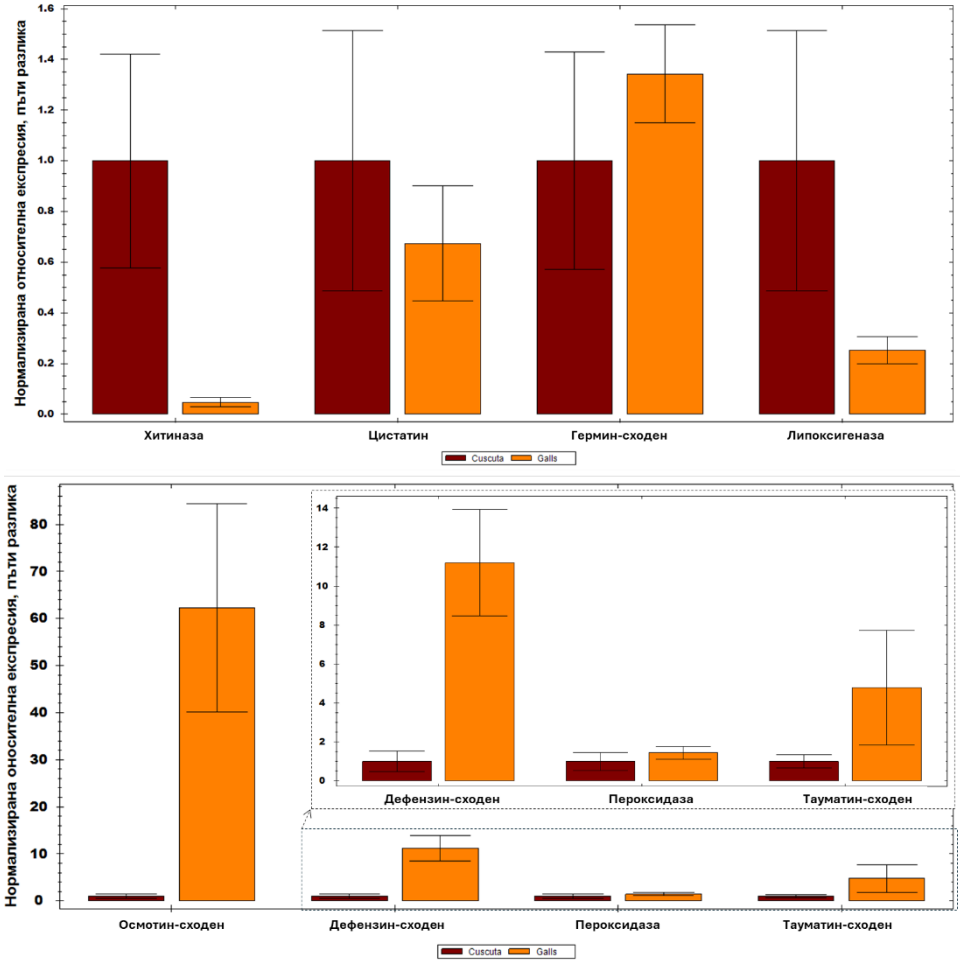
**Промени в експресията на гени, свързани с PR белтъци**

Промени в експресията на PR гени (Фигура 9) могат да се разглеждат като логично продължение на вече обсъдените хормонални и метаболитни адаптации, при които се постига двупосочен отговор – ограничена защита спрямо галообразуващия организъм и едновременно засилена защита срещу вторични стресови фактори. Силно намалената експресия на хитиназа (21.25 пъти по-ниска), липоксигеназа (3.96 пъти по-ниска) и инхибитори на цистеинови протеази (1.48 пъти по-ниска) в галите в сравнение с незаразени растения показва селективно потискане на защитни механизми, вероятно от самата ларва, които биха могли директно да повлияят върху развитието ѝ. Хитиназите разграждат хитина – основен компонент на кутикулата на насекомите, поради което наблюдаваната промяна предполага избягване на директно увреждане. По аналогичен начин е променена експресията на цистатините, които ограничават активността на протеази, участващи в храносмилането на растителноядни организми (Kaur et al., 2022) и липоксигеназите, свързани с биосинтезата на оксилипини, причиняващи оксидативен стрес при растителноядни насекоми (Singh et al., 2022).

Паралелно с това се наблюдава силно повишена експресия на гени за други PR белтъци, като осмотин-, дефензин- и тауматин-сходни протеини (съответно 62.234; 11.188 и 4.795 пъти повече в сравнение с контроли). Тези молекули са добре известни с ролята си в защита срещу гъбични и бактериални патогени, включително чрез нарушаване на мембранната цялост или агрегация на цитоплазмени молекули в клетките на нападателя (Kaur et al., 2022). Значителното им увеличение в галите може да се тълкува като механизъм за предпазване на тези метаболитно активни структури от вторични инфекции. Това е в съответствие с понижените нива на салицилова киселина и повишените на JA и абсцисиева киселина, които заедно могат да пренасочат защитата към анти-некротрофна, вместо анти-биотрофна (което би засегнало насекомите) (Joshi et al., 2021).

Повишената експресия на пероксидази (1.441 пъти увеличение) и гермин-сходни белтъци (1.341 пъти повече), макар и по-умерена, също е показателна за активиране на редокс-свързани защитни механизми. Тези ензими участват в генерирането и детоксикацията на реактивни кислородни видове (Kaur et al., 2022), което ги свързва пряко с наблюдаваните високи нива на глутатион и други антиоксиданти. По този начин PR отговорът не е

изолиран процес, а част от по-широка редокс регулация, която включва както водоразтворими (GSH), така и липидно-разтворими антиоксиданти (токофероли и каротеноиди).



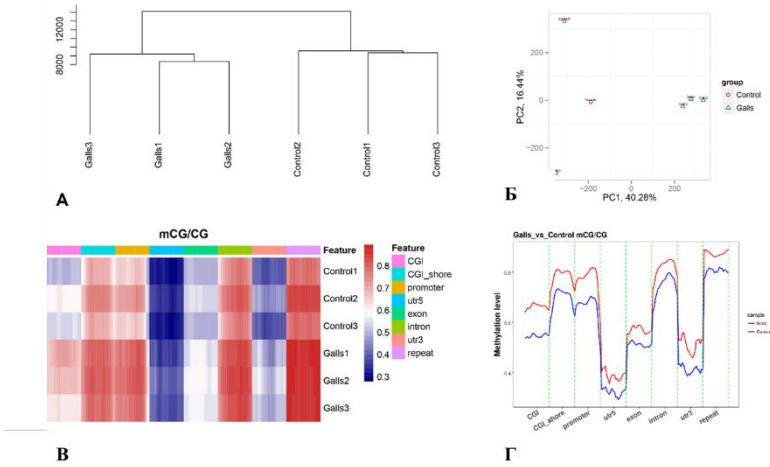

Фигура 9. Относителна генна експресия на гени, свързани със синтеза на PR-белтъци при контролни растения *C.campestris* и гали. Експресията е контролата е представена като стойност = 1, а експресията в галите като пъти разлика от контролната. С червено - контролни растения, с оранжево - гали.

Интеграцията на тези данни с хормоналния профил подсказва, че ABA вероятно играе ключова роля в координацията на този отговор. Освен че ограничава транспирацията и подпомага поддържането на стабилна вътрешна среда, ABA е известна с участието си в регулацията на PR гени, особено такива, свързани с осмотичен и оксидативен стрес (Joshi et al., 2021). Това, заедно с ограничената активност на SA-зависими пътища, може да

обясни защо защитата е насочена повече към патогени, отколкото към самия причинител на галите.

**Промени в метиломния профил предизвикани от фитофаги**

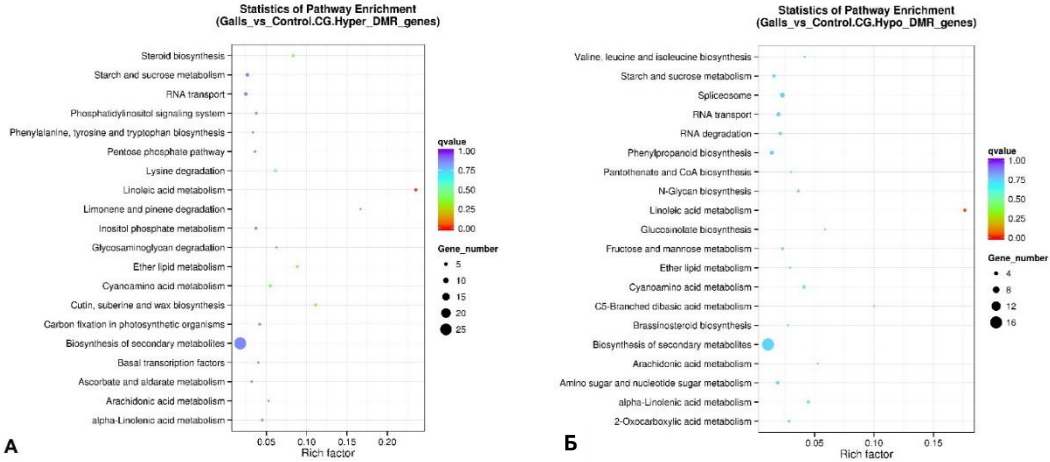
Физиологичните и метаболитни разлики при галите могат да се дължат както на молекули с произход от развиващото се насекомо и/или паразита, така и на промени в метилирането на растителната ДНК и свързаното с това влияние върху генната експресия. Наблюдаваните изменения в общия профил на метилиране (Фигура 10) показват ясно разграничение между галите и контролните растения, като се отчита повишено ниво на метилиране във всички геномни региони, но най-високо в промотори и CpG острови. Това е в съответствие с ролята на ДНК метилирането като вариант на епигенетичен механизъм за адаптация към стрес и пренастройване на генната експресия (Silva et al., 2022). В контекста на кукувичата прежда, където е налице силно модифициран метаболизъм, тези епигенетични промени вероятно отразяват допълнително ниво на регулация, необходимо за поддържане на специфичното състояние на галите.




Фигура 10. Глобални разлики в профила на метилиране и групиране на проби от *C.campestris* и техни гали. А) Йерархично групиране на пробите, базирано на съотношението mCG/CG в целия геном. Б) Анализ на главните компоненти (PCA), изграден на база профил на метилиране. В) Топлинна карта на нивата mCG/CG в различни генни участъци (CGI - CG острови; CGI_shore - участъци в близост до CG оострови; промоторни региони, utr5 - 5' нетранслирани учсастъци; екзони; интрони, utr3 - 3' нетранслирани участъци и повтори в генома). По редове са представени различните проби, по колони - различните генни участъци. Наситеността на оцветяването е в зависимост от степента наметилиране. Г) Усреднени стойности за метилирането в различни генни участъци при контролни растения (син цвят) и гали (червен цвят).

Една от основните хипотези, която може да се направи на база на данните, е че метилирането участва в селективно пренастройване на енергийния метаболизъм и едновременно ограничаване на директния защитен отговор срещу ларвите (Фигури 11 и 12). Хиперметилирането в промоторни региони може да бъде един от начините за

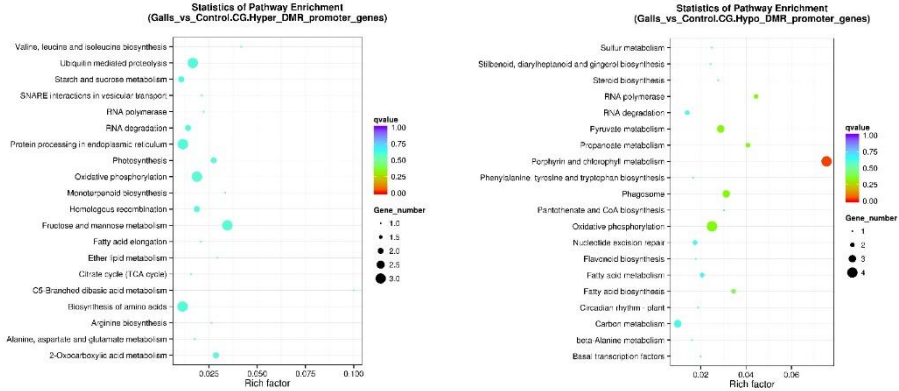
потискане на експресия на някои PR-свързани гени (хитинази, цистатини). В същото време обаче защитният отговор не е изцяло изключен, ако се съди по експресията за дефензини, осмотини и тауматин-сходни белтъци. Данните за метилиране не сочат към обогатяване на класически защитни пътища (SA- и JA-зависими), но се наблюдават промени в пътища, косвено свързани със защита. Пример за това е хиперметилирането на гени, свързани с „биосинтез на кутин, суберин и восъци“ може да бъде свързано с промени в кутикулата и повишена пропускливост на тъканите, което би могло да улесни преноса на вещества както и намалена бариерната функция (Ziv et al., 2018). От друга страна, хипометилирането на гени, касаещи „фенилпропаноиден метаболизъм“ и „флавоноиден метаболизъм“ предполага синтезиране на вторични метаболити със защитна функция (Ramaroson et al., 2022), но вероятно с минимални количествени изменения предвид степента на обогатяване на гените (Фигура 11).




Фигура 11. Анализ на гени, свързани с DMRs чрез KEGG обогатяване на метаболитни пътища при гали, в сравнение с контролни растения *C. campestris*. А) Хиперметилиране (в CG контекст). Б) Хипометилиране (в CG контекст). Представени са 20те най-обогатени метаболитни пътя.

Особено показателни са данните за метаболизма на порфирини и хлорофили (Фигура 12 Б), където се наблюдава хипометилиране на промоторни участъци. Това е в съответствие с повишените нива на хлорофили и каротеноиди, както и с предходните наблюдения за частично „реактивиране“ на фотосинтетични процеси в галите. Въпреки това, едновременното хиперметилиране на гени, свързани със светлинните и тъмнинните реакции (Фигура 12 А), показва, че този процес вероятно не е насочен към ефективна фотосинтеза в класическия смисъл. По-вероятно е това да има допълнителни функции, като поддържане на локален $O_2/CO_2$ баланс, участие в антиоксидантната защита или осигуряване на междинни метаболити (Haiden et al., 2012).

Промените наблюдавани при пътищата, свързани с въглехидратния, мастния и аминокиселинния метаболизъм (Фигура 11), предполага цялостна метаболитна реорганизация при галите. Данните сочат към ограничаване на складирането и транспорта на захари и насочване към тяхното разграждане и използване като източник за синтез на мастни киселини. Това е в съответствие с наблюдаваните промени в липидния метаболизъм и с обогатяването на гени за пътища като „метаболизъм на линоленова киселина“, който може да е свързан както с биосинтезата на JA, липидната сигнализация, така и с изхранване на ларвата. Мастните киселини са ключови за енергийния метаболизъм, развитието и метаморфозата на насекомите (Kaczmarek et al., 2024) и наблюдаваните индикации за активиран синтез и потиснато удължаване на тези молекули отново предполагат целенасочена промяна в липидния метаболизъм. Същото касае и пренастройването на аминокиселинния метаболизъм - насочване към синтез на ароматни аминокиселини, което може да осигури незаменими и условно незаменими съединения.




Фигура 12. Анализ на промоторни участъци на гени, свързани с DMRs чрез KEGG обогатяване на метаболитни пътища при гали, в сравнение с контролни растения *C. campestris*. А) Хиперметилиране (в CG контекст). Б) Хипометилиране (в CG контекст). Представени са 20те най-обогатени метаболитни пътя.

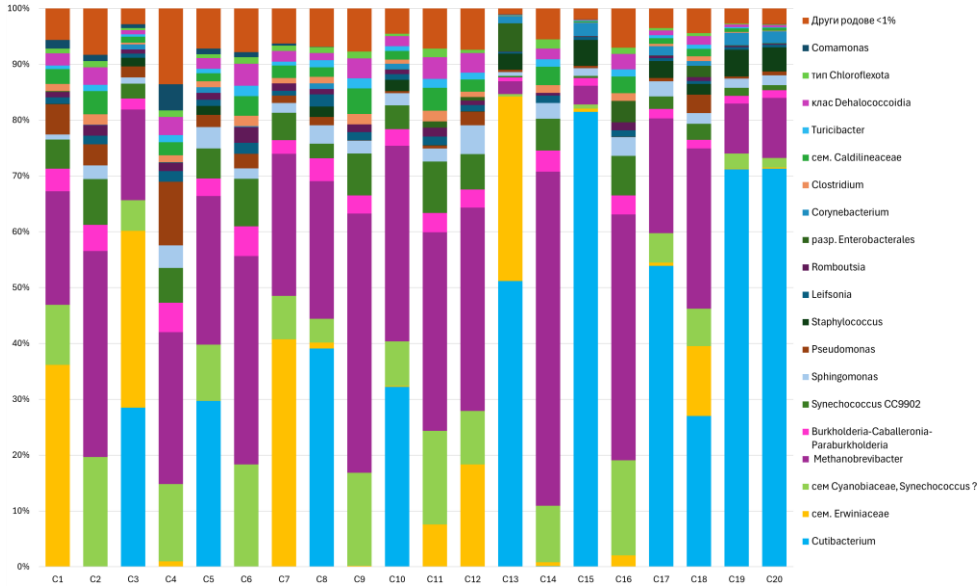
В обобщение може да се предположи, че промените, свързани с галообразуването са поне частично подложени и на епигенетична регулация. Тя може да е свързана както с диференциален метиломен профил, така и с промени в РНК метаболизма. Известно е, че малки некодиращи РНК могат да бъдат синтезирани и складирани, които могат да инхибират различни гени (собствени или на потенциални патогени). Това предположение се подкрепя и от получаваните данни (Фигури 11 и 12) за диференциално метилиране и обогатяване на гени и промоторни участъци, свързани с РНК транспорт, синтез и деградация.

**Ендофитни съобщества при *Cuscuta campestris* и гостоприемниците ѝ**

Изследването на структурата и припокриването на микроорганизмите, живеещи в тъканите на *Cuscuta* и нейните гостоприемници могат да бъдат разгледани в няколко различни насоки.

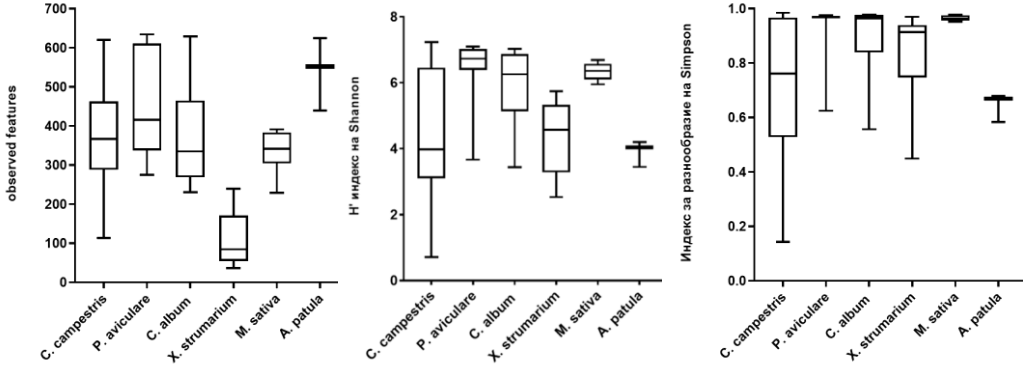
На първо място големият брой неанотирани таксони сред откритите ASVs (Amplicon sequence variant, уникални последователности получени от секвениране) представя ограниченията на метабаркодирането като метод за идентификация, както и нуждата от постоянно обновяване на базите данни. Въпреки това, толкова голямо разнообразие на успешно определени таксони не би могло да бъде постигнато чрез стандартните методи за култивиране в хранителна среда.

Данните за основните родове показват, че около 6,5% от откритите при *Cuscuta* се срещат при всички проби, вероятно дължащо се на потенциално конститутивни взаимодействия, задължителни за паразита. Сред откритите при всички паразити ендофитни микроорганизми (Фигура 13), с най-голяма тежест са представители на сем. Erwiniaceae, родовете *Methanobrevibacter*, *Sphingomonas*, *Synechococcus*, *Pseudomonas* и групата *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*. За тях е известно, че са типични групи ендофитни микроорганизми, повечето от които са с положителен ефект за нарастването на растенията и асимилацията на $CO_2$ (Sellappan et al., 2022). За други родове се наблюдават големи разлики между пробите, например род *Cutibacterium* е добре представен (25-50 % от общия състав) в някои проби и слабо представен или липсващ при други. Така, още чрез разглеждане на относителната представеност на таксоните се забелязват разлики както по отношение на разделението паразит-гостоприемник, така и според вида гостоприемник. Те вероятно се дължат на своеобразен селективен подбор от страна на паразита.

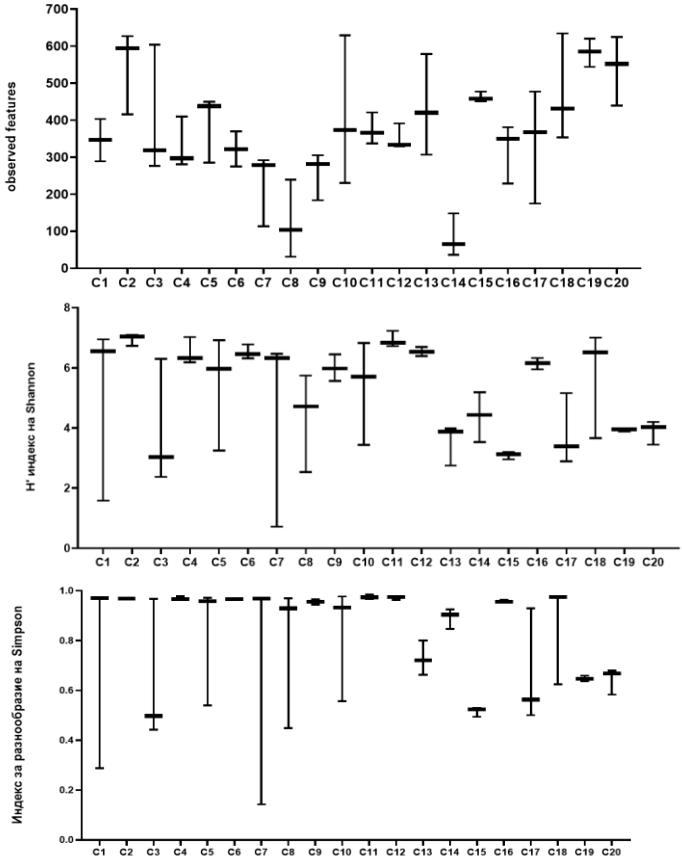



Фигура 13. Относително разнообразие на родовете ендофитни микроорганизми открити в проби от *C.campestris* (нечетни номера) и техните гостоприемници (четни номера). Представени са таксоните, съставляващи повече от 1% от откритите ASVs.

Относно вътрешното разнообразие на пробите (алфа разнообразие) (Фигура 14) се наблюдава вариация в броя таксони (OF, observed features) и равномерност на разпределението им (Shannon и Simpson) в зависимост от вида растение. Тъй като при *Cuscuta* се наблюдават най-ниски стойности за Shannon (както медианна, така и при обхвата на стойностите), може да се предположи, че по-голямо значение при паразита имат доминиращите видове ендофити, докато други са поне частично потиснати. Това може да е в следствие на вътрешните условия при *Cuscuta*, които да действат като селективен филтър върху равномерността на съобществата. Потенциални причини могат да са както факта, че само някои микроорганизми могат да преминават от гостоприемника към паразита, така и липсата на фотосинтеза на локално ниво и съответстващите изменени метаболитни характеристики. При някои проби кукувича прежда се наблюдават значително повече таксони в сравнение с гостоприемника им (Фигура 15, OF), което вероятно е свързано с наличието им още в семената, вследствие на прехвърляне от почвата или от предходен гостоприемник.



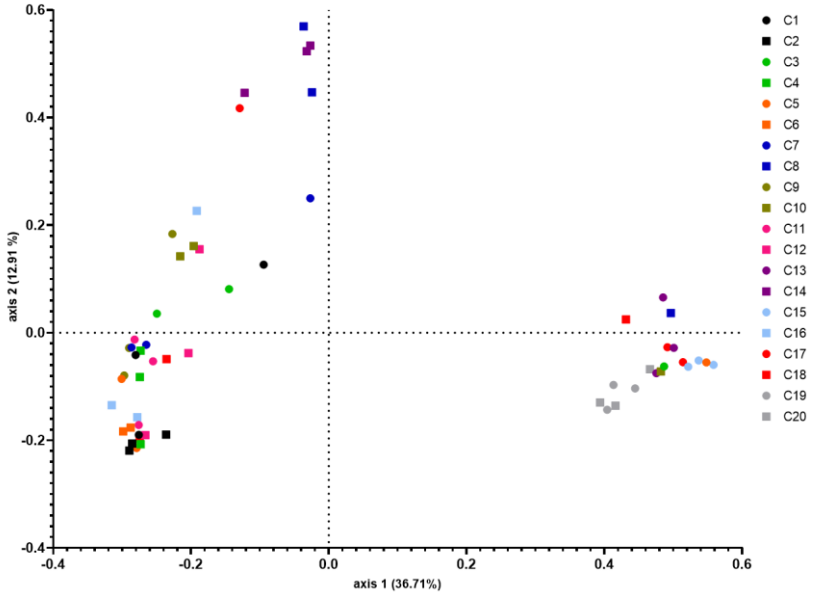

Фигура 14. Статистически индекси за алфа разнообразието за ендофитния микробиом според вида изследвано растение - OF (ляво), Shannon (среда) и Sipson (дясно). Представен е box plot на интерквартилния размах 25-75%, медиана ± обхват на стойностите.



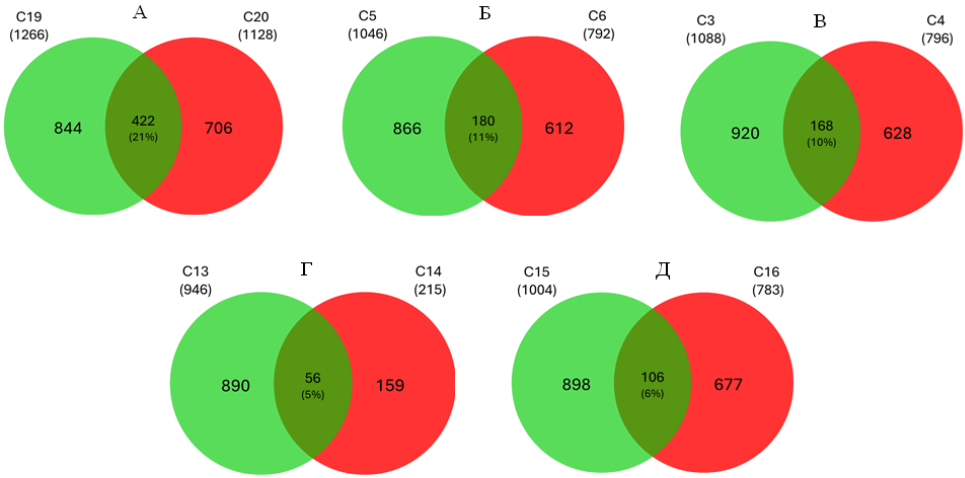

Фигура 15. Статистически индекси за алфа разнообразието на ендофитния микробиом на 20-те проби, представено чрез индексите - OF (горе), Shannon (среда) и Sipson (долу). Графиките показват медиана ± обхват на стойностите, тъй като са изготвени на базата на 3 повторения на проба.

Данните от разнообразието в ендофитния микробиом могат да бъдат обобщени при сравнителния анализ на бета разнообразието (Фигура 16). Приликите и разликите при различните двойки предполагат голямо припокриване на микробиома на паразита с този на някои гостоприемници (особено изразено при *A. patula* и *C. album*) и значително по-слабо при други (напр. при *X. strumarium)*. В допълнение с това, наблюдаваните данни на Фигура 17 за споделени ASVs насочват към хипотезата, че ендофитните съобщества при паразита са в различна степен обвързани с тези на гостоприемника. Наблюдава се ясно изразен зависим от гостоприемника ефект по отношение на потенциала за векторен пренос на ендофитни микроорганизми от и към паразита. На база на тези данни може да се направи оценка на вероятността за обмен на микроорганизми между двете растения спрямо гостоприемника в реда:

*Atriplex patula* > *Chenopodium album* > *Polygonum aviculare* > *Medicago sativa* > *Xanthium strumarium.*




Фигура 16. PCoA диаграма на бета разнообразието на ендофитните бактериални съобщества. С кръг са представени проби от *C. campestris*, с квадрат - гостоприемници. Двойка паразит-гостоприемник са обозначени с еднакъв цвят.



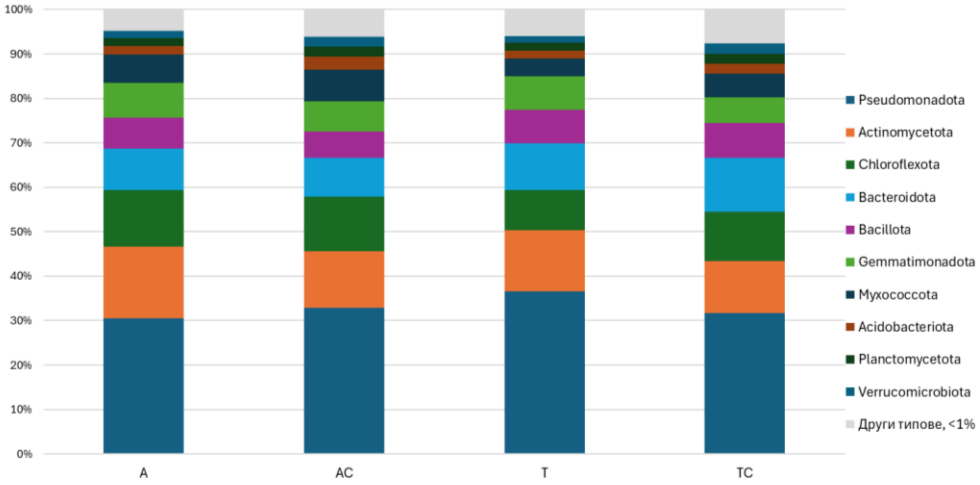

Фигура 17. Venn-диаграми на пет избрани двойки паразит-гостоприемник, представящи общите ASVs откривани и при двата партньора на взаимодействието. В зелено - *C.campestris*, в червено -

гостоприемник. Гостоприемниците в двойките са както следва: А - *A.patula* . Б - *P.aviculare* , В - *C. album,* Г- *M. sativa*, Д - *X. strumarium*.

Въпреки малкия брой изследвани видове гостоприемници, може да се направи предположение, че векторния пренос е поне частично обвързан с таксономичния им статус, тъй като *A. patula* и *C. album* принадлежат към едно семейство (Щирови (Amaranthaceae)), а те, заедно с *P. aviculare* спадат към разред Карамфилоцветни (Caryophyllales).

**Промени в почвения микробиом при заразяване с *C. campestris***

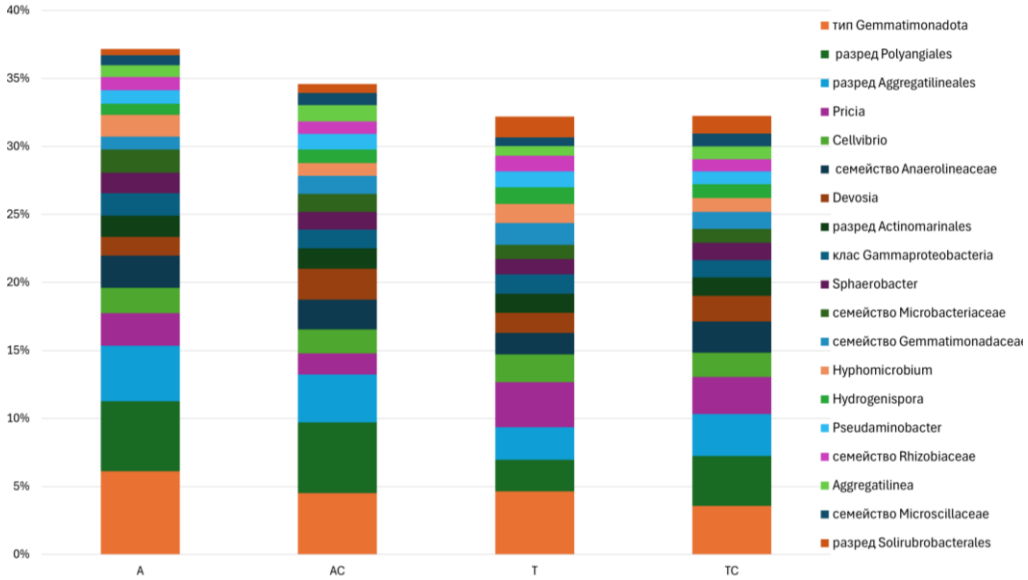
Направена е оценка и на разнообразието на почвения микробиом на стрес-толерантен (*Thellungiella salsuginea)* и чувствителен (*Arabidopsis thaliana)* гостоприемник в присъствие или отсъствие на кукувича прежда. Общият таксономичен профил на микробиома показва високо разнообразие и относително стабилна структура, очаквано зависими от гостоприемника. Доминиращите бактериални типове (Фигура 18) – Pseudomonadota, Actinomycetota, Chloroflexota и Bacteroidota – съставляват по-голямата част от микробиалните съобщества. Подобна доминация е характерна за почвени екосистеми и отразява функционалната им роля в разграждане на органична материя, циркулацията на хранителни вещества и поддържане на почвената хомеостаза (Karimi et al., 2018). Наблюдаваните разлики между заразени и контролни проби, макар и умерени, могат да се дължат на промени в секретирани от корените вещества и съответно в наличните субстрати за микробната активност, което е добре описан механизъм за взаимодействие между растения и почвен микробиом (Seitz et al., 2024).




Фигура 18. Относително разнообразие на типове почвени микроорганизми открити в проби контролен и заразен с кукувича прежда *Arabidopsis thaliana* (А и АС), както и контролна и заразена *Thellungiella salsuginea* (Т и ТС). Представени са таксоните, съставляващи повече от 1% от откритите ASVs

Намаляването на Actinomycetota при заразяване и при двата растителни вида може да има значение, тъй като представители на тази група често участват в разграждането на сложни органични съединения и в синтеза на антимикробни вещества (Karimi et al., 2018). Потенциалното им понижаване може да доведе до промяна в конкурентните взаимодействия в почвата. От друга страна, промените при Pseudomonadota са противоположни при двата гостоприемника, което подсказва, че ефектът от заразяването е силно зависим от растителния вид и неговите специфични взаимодействия с микробиома.

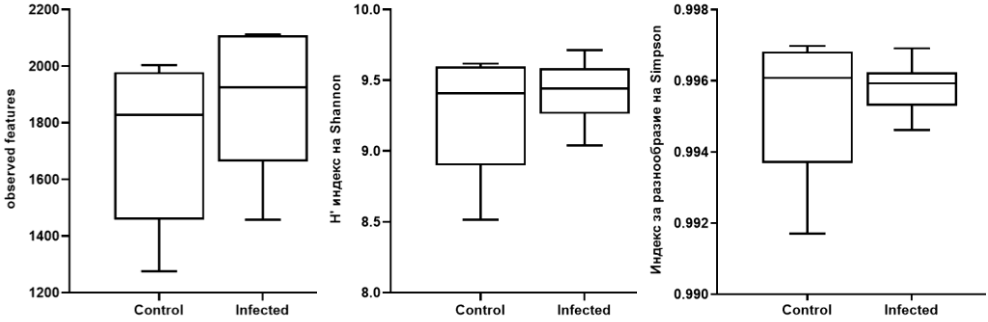
Анализът на родово ниво (Фигура 19) показва, че макар малък брой таксони да доминират, по-голямата част от разнообразието се формира от редки родове (под 1% представеност). Това е типично за почвените микробни екосистеми и предполага наличие на „скрито“ функционално разнообразие, което може да се активира при промяна на условията (Jousset et al., 2017). Наблюдаваното намаляване на доминиращи таксони (напр. представители на Gemmatimonadota) и увеличаване на други (напр. Polyangiales) при заразени *T. salsuginea* вероятно отразява пренареждане на екологичните ниши и ресурсната конкуренция.



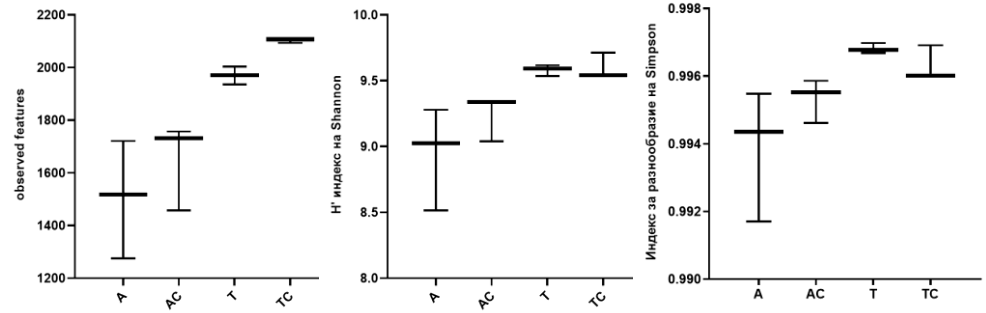

Фигура 19. Относително разнообразие на родовете почвени микроорганизми открити в проби контролен и заразен с кукувича прежда *Arabidopsis thaliana* (A и AC), както и контролна и заразена *Thellungiella salsuginea* (T и TC). Представени са само таксоните, съставляващи повече от 1% от откритите ASVs. Някои родове са анотирани като част от по-висок таксономичен ранг.

Вътрегруповото (алфа-) разнообразие (Фигура 20) показва, че като цяло заразяването не води до значими промени в богатството и равномерността на микробиалните общности, когато пробите се разглеждат обединено. Това предполага, че почвеният микробиом е относително независим от присъствието на паразит. Въпреки това, при разглеждане на отделните групи се наблюдават разлики, особено между двата гостоприемника, като

*Thellungiella salsuginea* показва по-високо разнообразие и по-равномерно разпределение на таксоните (Фигура 21). Това може да се свърже с известната ѝ по-висока устойчивост към стрес и различен профил на коренови ексудати, които поддържат по-разнообразна микробна общност.



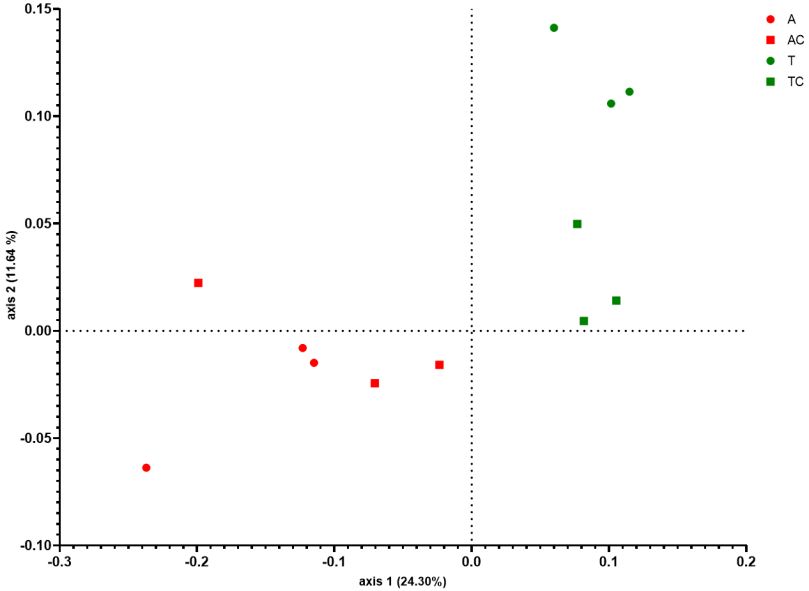

Фигура 20. Статистически индекси за алфа разнообразието на почвения микробиом на незаразени растения *A. thaliana* и *T. salsuginea* (Control) и заразени с кукувича прежда растения от същите видове (Infected). OF (ляво), Shannon (среда) и Sipson (дясно). Представен е box plot на интерквартилния размах 25-75%, медиана ± обхват на стойностите.




Фигура 21. Статистически индекси за алфа разнообразието на почвения микробиом на незаразени растения *A. thaliana* (A) и *T. salsuginea* (T) и заразени с кукувича прежда растения от същите видове (съответно AC и TC). OF (ляво), Shannon (среда) и Sipson (дясно). Графиките показват медиана ± обхват на стойностите, тъй като са изготвени на базата на 3 повторения на проба.

Сравнителният анализ на почвения микробиом между всички изследвани проби (бета-разнообразие) (Фигура 22) показва, че отново основният фактор, определящ структурата на микробиома, е видът на гостоприемника, а не наличието на заразяване. Това подчертава

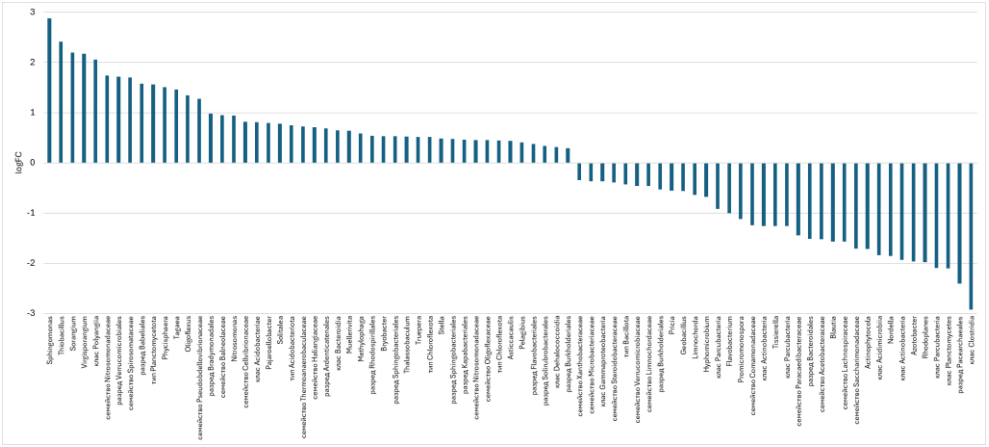
водещата роля на растението-гостоприемник при оформянето на микробната общност чрез специфични метаболитни и физиологични характеристики. Все пак, при *T. salsuginea* се наблюдава известна зависимост спрямо заразяването, което предполага, че при този вид ефектът от външното въздействие може да бъде по-изразен.



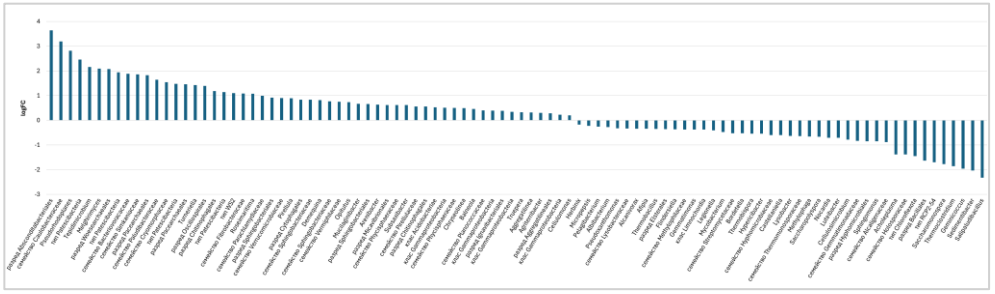

Фигура 22. PCoA диаграма на бета разнообразието на почвените бактериални съобщества на *A. thaliana* (червено) и *T. salsuginea* (зелено). С кръг са отбелязани незарзени растения, с квадрат - растения, заразени с *C. campestris*.

Диференциалният анализ (Фигури 23 и 24) разкрива, че въпреки липсата на значими разлики в глобалните индекси на разнообразие, отделни таксони реагират съществено на променените условия. По-големият брой диференциално представени таксони при *Thellungiella salsuginea* е в съответствие с по-високото ѝ общо разнообразие и предполага по-гъвкава и динамична микробна структура. Това подчертава, че стабилността на микробиома е по отношение на общия брой таксони (включително доминиращи), но има наличие на вътрешна реорганизация, при която отделни групи се увеличават или намаляват, без да се нарушава цялостната структура.

В обобщение, получените резултати показват, че почвеният микробиом е силно повлиян от растителния гостоприемник и проявява относителна устойчивост към външни въздействия (присъствието на паразит) на ниво общо разнообразие. В същото време обаче се наблюдават съществени промени в състава на отделни таксони в зависимост от статута на заразяване, което предполага фина регулация, вероятно медиирана от паразита чрез модификация на метаболизма на гостоприемника




Фигура 23. Диференциално променени родове почвени микроорганизми при *A. thaliana*, заразена с *C. campestris* в сравнение с незаразени растения. Някои родове са анотирани като част от по-висок таксономичен ранг.




Фигура 24. Диференциално променени родове почвени микроорганизми при *T. salsuginea*, заразена с *C. campestris* в сравнение с незаразени растения. Някои родове са анотирани като част от по-висок таксономичен ранг.

**Изводи**

1. RAPD маркерите позволяват молекулярно таксономичното определяне и разграничаване на отделните видове *Cuscuta*.

Изводи, потвърждаващи Хипотеза 1:

2. Галообразуването вероятно предизвиква оксидативен стрес, който ефективно се неутрализира от антиоксидантните системи на паразитното растение.

3. Формирането на гали е съпроводено с координиран, доминиран от абсцисиева и жасмонова киселина хормонален защитен отговор, съпроводен със засилена експресия на някои свързани с патогенезата гени.

4. Формирането на гали предизвиква епигенетични промени, насочени към препрограмиране на метаболизма на *Cuscuta* спрямо нуждите на ларвите.

Изводи, потвърждаващи Хипотеза 2:

5. Ендофитният микробиом на паразитното растение зависи силно от растението гостоприемник, което предполага активен пренос на микроорганизми при едни взаимоотношения и по-слаб при други.

6. Паразитизмът на *Cuscuta* spp. донякъде влияе на състава на почвения микробиом, въпреки че влиянието на растението-гостоприемник е значително по-силно.

**Приноси на дисертационния труд**

Приноси с фундаментален характер

1. Допълнени са данните относно молекулните взаимодействия паразит (*Cuscuta* spp.) - епипаразит (*Smicronyx*), което допринася за по-добро разбиране на тези сложни взаимоотношения и поставя под съмнение негативното влияние на епипаразита.

2. Демонстриран е епигенетичния контрол, предизвикан от галообразуващите насекоми при формирането на гали.

3. Установени са основните групи ендофитни микроорганизми в *Cuscuta campestris* в България и ролята на гостоприемниците върху техния състав.

4. Установено е индиректното влияние на паразитното растение върху почвения микробиом, който има отношение към почвеното здраве.

Приноси с научно-приложен характер

5. Валидирана е методика за таксономично определяне на видове *Cuscuta*, срещащи се в България.

6. Натрупани са резултати, изясняващи ролята на *Cuscuta* като потенциален резервоар и вектор на ендофитни патогенни микроорганизми.

**Публикации и участия в научни конференции, свързани с дисертационния труд**

Публикувани са две **научни публикации** с данни, представени в дисертационния труд :

1. Denitsa Teofanova, Kalina Pachedjieva, Anita Tosheva, Bianka Marinova, **Stefan Savov**, Martin Savov, Tzvetelina Zagorcheva, Lyuben Zagorchev, Application of RAPD markers for Cuscuta species identification and biodiversity, PhytoKeys, issue:265, 2025, pages:1-12, doi:https://doi.org/10.3897/phytokeys.265.152696, Ref, Web of Science, (IF = 1.5 - 2024), SCOPUS Quartile: Q2 (2025)

2. **Stefan Savov**, Bianka Marinova, Denitsa Teofanova, Martin Savov, Mariela Odjakova, Lyuben Zagorchev, Parasitic Plants—Potential Vectors of Phytopathogens, Pathogens, vol:13, issue:6, 2024, doi:https://doi.org/10.3390/pathogens13060484, Ref, Web of Science, (IF = 3.7 - 2023), SCOPUS Quartile: Q1 (2024)

Към момента са забелязани седем **цитирания** на публикация, свързани с дисертацията:

**Stefan Savov**, Bianka Marinova, Denitsa Teofanova, Martin Savov, Mariela Odjakova, Lyuben Zagorchev, Parasitic Plants—Potential Vectors of Phytopathogens, Pathogens, vol:13, issue:6, (2024), doi.org/10.3390/pathogens13060484

1. McCann, P., Megaw, J., & Gobert, G. N. Parasite-associated microbiomes: An unseen microenvironment. Advances in parasitology, 131, 31-70. (2026) doi.org/10.1016/bs.apar.2026.03.001

2. Wiśniewska, K., Przemieniecki, S.W., Krawczyk, K. *et al.* Diversity and functional traits of the flower stigma microbiome in heterotrophic and autotrophic plants: *Phelipanche ramosa* vs. its host *Nicotiana tabacum*. Scientific Reports **16**, 706 (2026). doi.org/10.1038/s41598-025-30322-9

3. Zagorchev, L., Zagorcheva, T., Teofanova, D., & Odjakova, M. Methods of Control of Parasitic Weeds of the Genus Cuscuta—Current Status and Future Perspectives. Plants, 14(15), 2321. (2025). https://doi.org/10.3390/plants14152321

4. Kulus, D., Tymoszuk, A., & Cichorek, M..Genetic Stability and Photosystem II Functioning of In Vitro-Recovered Lamprocapnos spectabilis (L.) Fukuhara After ZnO+ Ag Nanoparticles or Melatonin Exposure During Vitrification—Preliminary Study. International Journal of Molecular Sciences, 26(22), 10817. (2025).doi.org/10.3390/ijms262210817

5. Li, C., Wang, Y., Cao, X., Lu, K., Li, L., & Jiang, J. SNARE Protein CfSec22 Mediates Vesicular Trafficking to Regulate Growth, Conidiogenesis, and Pathogenesis of Ceratocystis fimbriata. Microorganisms, 13(10), 2305. (2025). doi.org/10.3390/microorganisms13102305

6. Alwan, S. H., Al-Khesraji, T. O., & Samarrai, G. A. Effect of The Host Type and The Parasite Species on The Phytochemicals of Two Dodder Species, Compared to Healthy Hosts. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 1549, No. 1, p. 012132). IOP Publishing. (2025), DOI: 10.1088/1755-1315/1549/1/012132

7. Radouane, N., Errafii, K., Mouhib, S., Mhand, K. A., Legeay, J., & Hijri, M..Potential plant-to-plant transmission: shared endophytic bacterial community between Ziziphus lotus and its parasite Cuscuta epithymum. Microbial ecology, 87(1), 119. (2024). DOI: 10.1007/s00248-024-02421-z

Част от резултатите в настоящия труд са представени на **международни и национални научни форуми**:

1. **Stefan Savov**, Tzvetelina Zagorcheva, Denitsa Teofanova, Lyuben Zagorchev, METHYLOME ANALYSIS OF SMICRONYX GALLS ON CUSCUTA CAMPESTRIS. International conference on natural sciences & biotechnology - Kliment's Days, 6-7 November 2025, Sofia, Bulgaria. Book of abstracts p.107

2. Atanas Paunov, **Stefan Savov**, Denitsa Teofanova, Lyuben Zagorchev. IN VITRO SYSTEM FOR EVALUATION OF HOST-INDEPENDENT RESPONSE TO ABIOTIC STRESS IN CUSCUTA CAMPESTRIS. Youth Scientific Conference 60 years Department "Biochemistry, 17 October 2025, Sofia, Bulgaria. Book of abstracts p. 49

3. **Stefan Savov**, Denitsa Teofanova, Bianka Marinova, Lyuben Zagorchev. QUANTITATIVE CHANGES IN THE GENE EXPRESSION FOR PATHOGENESIS RESISTANCE PROTEINS IN CUSCUTA SUBJECTED TO SMICRONYX INFESTATION. Youth Scientific Conference 60 years Department "Biochemistry, 17 October 2025, Sofia, Bulgaria. Book of abstracts p. 51

4. **Stefan Savov**, Maria Nikolova, Martin Savov, Bianka Marinova, Denitsa Teofanova, Lyuben Zagorchev. CAROTENOID PROFILING OF DIFFERENT CUSCUTA SPECIES. 6$^{th}$ International Conference on Natural Products Utilization from Plants to Pharmacy Shelf, 27-30 May 2025, Bansko, Bulgaria. Book of abstracts p.256

5. Lyuben Zagorchev , **Stefan Savov**, Denitsa Teofanova. Interaction between soil microbiota, host plants, and stem parasitic plants of the genus Cuscuta under salinity. 1 st Annual Conference of the MiCropBiomes COST Action, 11-12 September 2024, Porto, Portugal. Book of abstracts p.40

Научно-изследователските дейности, извършени в настоящия дисертационен труд са финансирани от следните **научни проекти**:

1. Проект на Софийски университет „Св. Климент Охридски“- „Маркер за иновации и технологичен трансфер (SUMMIT)“, Научна група 3.1.8. „Растителни паразити“ (2023-2026) финансиран от Европейския съюз - NextGenerationEU, чрез Националния план за възстановяване и устойчивост на Република България. Номер на проекта: BG-RRP-2.004-0008. Ръководител на научната група: доц. дн Любен Загорчев.

2. „Инсектом на паразитните растения: характеристика на насекомите, свързани с членовете на паразитните растения от род Cuscuta – потенциал за биологичен контрол, Ръководител“ (2024-2026), финансиран от Фонд Научни Изследвания. Номер на договора:КП-06-Словакия/5. Ръководител на проекта: доц. дн Любен Загорчев.

**Използвана литература**


1. Bachhawat, A. K., & Yadav, S. (2018). The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ-glutamyl cycle. *IUBMB Life*, *70*(7), 585–592. https://doi.org/10.1002/iub.1756
2. Bailly, C., & Kranner, I. (2011). Analyses of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Relation to Seed Longevity and Germination. In A. R. Kermode (Ed.), Seed Dormancy: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Vol. 773, pp. 343–367). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-231-1_20
3. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., … Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37(8), 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9
4. Buchner, O., Roach, T., Gertzen, J., Schenk, S., Karadar, M., Stöggl, W., Miller, R., Bertel, C., Neuner, G., & Kranner, I. (2017). Drought affects the heat-hardening capacity of alpine plants as indicated by changes in xanthophyll cycle pigments, singlet oxygen scavenging, α-tocopherol and plant hormones. Environmental and Experimental Botany, 133, 159–175. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.010
5. Castro-Camba, R., Sánchez, C., Vidal, N., & Vielba, J. M. (2022). Plant Development and Crop Yield: The Role of Gibberellins. *Plants*, *11*(19), 2650. https://doi.org/10.3390/plants11192650
6. Du, B., Haensch, R., Alfarraj, S., & Rennenberg, H. (2024). Strategies of plants to overcome abiotic and biotic stresses. *Biological Reviews*, *99*(4), 1524–1536. https://doi.org/10.1111/brv.13079
7. Feng, H., Conneely, K. N., & Wu, H. (2014). A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. Nucleic Acids Research, 42(8), e69–e69. https://doi.org/10.1093/nar/gku154
8. Fernández-Aparicio, M., Yoneyama, K., & Rubiales, D. (2011). The role of strigolactones in host specificity of Orobanche and Phelipanche seed germination. *Seed Science Research*, *21*(1), 55–61. https://doi.org/10.1017/S0960258510000371
9. Han, R.-M., Zhang, J.-P., & Skibsted, L. H. (2012). Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. *Molecules*, *17*(2), 2140–2160. https://doi.org/10.3390/molecules17022140
10. Hayashi, K., Arai, K., Aoi, Y., Tanaka, Y., Hira, H., Guo, R., Hu, Y., Ge, C., Zhao, Y., Kasahara, H., & Fukui, K. (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications*, *12*(1), 6752. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27020-1
11. Hernández, J. A., Barba-Espín, G., & Diaz-Vivancos, P. (2017). Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants. In *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance* (pp. 309–329). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66682-2_14

12. Huchzermeyer, B., Menghani, E., Khardia, P., & Shilu, A. (2022). Metabolic Pathway of Natural Antioxidants, Antioxidant Enzymes and ROS Providence. In *Antioxidants* (Vol. 11, Number 4). MDPI. https://doi.org/10.3390/antiox11040761
13. Joshi, V., Joshi, N., Vyas, A., & Jadhav, S. K. (2021). Pathogenesis-related proteins: Role in plant defense. In *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites: Applications and Immunization for Plant Growth and Protection* (pp. 573–590). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00025-9
14. Jousset, A., Bienhold, C., Chatzinotas, A., Gallien, L., Gobet, A., Kurm, V., Küsel, K., Rillig, M. C., Rivett, D. W., Salles, J. F., van der Heijden, M. G. A., Youssef, N. H., Zhang, X., Wei, Z., & Hol, W. H. G. (2017). Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *The ISME Journal*, *11*(4), 853–862. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.174
15. Kaczmarek, A., Wrońska, A. K., Sobich, J., & Boguś, M. I. (2024). *Insect Lipids: Structure, Classification and Function* (pp. 1–45). https://doi.org/10.1007/978-3-032-04842-4_805
16. Karimi, B., Terrat, S., Dequiedt, S., Saby, N. P. A., Horrigue, W., Lelièvre, M., Nowak, V., Jolivet, C., Arrouays, D., Wincker, P., Cruaud, C., Bispo, A., Maron, P.-A., Bouré, N. C. P., & Ranjard, L. (2018). Biogeography of soil bacteria and archaea across France. *Science Advances*, *4*(7). https://doi.org/10.1126/sciadv.aat1808
17. Kaur, A., Kaur, S., Kaur, A., Kaur Sarao, N., & Sharma, D. (2022). Pathogenesis-Related Proteins and Their Transgenic Expression for Developing Disease-Resistant Crops: Strategies Progress and Challenges. In *Case Studies of Breeding Strategies in Major Plant Species*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.106774
18. Lazar Jr., I., & Lazar Sr., I. (2026). GelAnalyser (26.1). www.gelanalyzer.com
19. Li, S., Liu, S., Zhang, Q., Cui, M., Zhao, M., Li, N., Wang, S., Wu, R., Zhang, L., Cao, Y., & Wang, L. (2022). The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances. *Frontiers in Plant Science*, *13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1050132
20. Mao, X., Cai, T., Olyarchuk, J. G., & Wei, L. (2005). Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. Bioinformatics, 21(19), 3787–3793. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti430
21. Noshad, Q., Ajaib, M., Kiran, A., Ishtiaq, M., Bashir, T., & Siddiqui, M. F. (2021). Study on genetic diversity of Cuscuta reflexa Roxb. and few members of convolvulaceae on the basis of RAPD and SDS-PAGE. Pakistan Journal of Botany, 53(3). https://doi.org/10.30848/PJB2021-3(13)
22. Park, Y., & Wu, H. (2016). Differential methylation analysis for BS-seq data under general experimental design. Bioinformatics, 32(10), 1446–1453. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw026
23. Ramaroson, M.-L., Koutouan, C., Helesbeux, J.-J., Le Clerc, V., Hamama, L., Geoffriau, E., & Briard, M. (2022). Role of Phenylpropanoids and Flavonoids in Plant Resistance to Pests and Diseases. *Molecules*, *27*(23), 8371. https://doi.org/10.3390/molecules27238371

24. Remias, D., Lütz-Meindl, U., & Lütz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga Chlamydomonas nivalis. *European Journal of Phycology*, *40*(3), 259–268. https://doi.org/10.1080/09670260500202148
25. Savignac, J. M., Atanasova, V., Chéreau, S., Ortéga, V., & Richard-Forget, F. (2022). Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxigenic Fungal Species. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Number 16). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms23169303
26. Seitz, V. A., McGivern, B. B., Borton, M. A., Chaparro, J. M., Schipanski, M. E., Prenni, J. E., & Wrighton, K. C. (2024). Cover crop root exudates impact soil microbiome functional trajectories in agricultural soils. *Microbiome*, *12*(1), 183. https://doi.org/10.1186/s40168-024-01886-x
27. Silva, A. C., Ruiz-Ferrer, V., Müller, S. Y., Pellegrin, C., Abril-Urías, P., Martínez-Gómez, Á., Gómez-Rojas, A., Berenguer, E., Testillano, P. S., Andrés, M. F., Fenoll, C., Eves-van den Akker, S., & Escobar, C. (2022). The DNA methylation landscape of the root-knot nematode-induced pseudo-organ, the gall, in Arabidopsis, is dynamic, contrasting over time, and critically important for successful parasitism. *New Phytologist*, *236*(5), 1888–1907. https://doi.org/10.1111/nph.18395
28. Singh, P., Arif, Y., Miszczuk, E., Bajguz, A., & Hayat, S. (2022). Specific Roles of Lipoxygenases in Development and Responses to Stress in Plants. In *Plants* (Vol. 11, Number 7). MDPI. https://doi.org/10.3390/plants11070979
29. Teofanova, D., Pachedjieva, K., Tosheva, A., Marinova, B., Savov, S., Savov, M., Zagorcheva, T., & Zagorchev, L. (2025). Application of RAPD markers for Cuscuta species identification and biodiversity. *PhytoKeys*, *265*, 1–12. https://doi.org/10.3897/phytokeys.265.152696
30. Ushima, R., Sugimoto, R., Sano, Y., Ogi, H., Ino, R., Hayakawa, H., Shimada, K., & Tsuchida, T. (2024). New Gall-Forming Insect Model, Smicronyx madaranus: Critical Stages for Gall Formation, Phylogeny, and Effectiveness of Gene Functional Analysis. *Insects*, *15*(1). https://doi.org/10.3390/insects15010063
31. Venado, R. E., Owens, B. F., Ortiz, D., Lawson, T., Mateos-Hernandez, M., Ferruzzi, M. G., & Rocheford, T. R. (2017). Genetic analysis of provitamin A carotenoid β-cryptoxanthin concentration and relationship with other carotenoids in maize grain (Zea mays L.). *Molecular Breeding*, *37*(10), 127. https://doi.org/10.1007/s11032-017-0723-8
32. Wu, H., Xu, T., Feng, H., Chen, L., Li, B., Yao, B., Qin, Z., Jin, P., & Conneely, K. N. (2015). Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. Nucleic Acids Research, gkv715. https://doi.org/10.1093/nar/gkv715
33. Xie, Y., Xiong, X., & Chen, S. (2021). Challenges and Potential in Increasing Lutein Content in Microalgae. *Microorganisms*, *9*(5), 1068. https://doi.org/10.3390/microorganisms9051068
34. Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and

Abiotic Stresses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349

35. Zagorchev, L., Atanasova, A., Albanova, I., Traianova, A., Mladenov, P., Kouzmanova, M., Goltsev, V., Kalaji, H. M., & Teofanova, D. (2021). Functional characterization of the photosynthetic machinery in smicronix galls on the parasitic plant cuscuta campestris by jip-test. *Cells*, *10*(6). https://doi.org/10.3390/cells10061399
36. Zagorchev, L., Seal, C. E., Kranner, I., & Odjakova, M. (2013). A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Number 4, pp. 7405–7432). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms14047405
37. Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y. G., & Xia, Y. (2018). Multifunctional Roles of Plant Cuticle During Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01088