



АВТОРЕФЕРАТ

към дисертационен труд

за придобиване на научната степен „доктор на науките“

(4.3 Биологически науки – Молекулярна биология)

**Влияние на биотични и абиотични фактори върху
паразитизма на стъблени холопаразитни растения
от род *Cuscuta* L. (сем. Convolvulaceae)**

доц. д-р Любен Иванов Загорчев

Катедра „Биохимия“

Биологически факултет

Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Март, 2023

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на катедрения съвет на катедра Биохимия при Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ (протокол №697 от 21.03.2023 г.). Официалната защита ще се състои на:.....

Научно жури:

Акад. проф. дбн Румен Панков

Проф. дбн Спасимир Тонков

Проф. д-р Стоян Шишков

Акад. проф. дбн Иван Иванов – ИМБ, БАН

Проф. дсн Росица Бъчварова – АБИ, ССА

Проф. д-р Елена Георгиева – ИФРГ, БАН

Проф. д-р Валя Василева – ИФРГ, БАН

Резервни членове:

Доц. д-р Детелин Стефанов

Проф. дбн Иван Атанасов – АБИ, ССА

Финансиране и проектна дейност:

Изследванията в настоящата дисертация са извършени с финансовата подкрепа на следните организации и проекти, на които дисертантът е ръководител:

“Сравнителна оценка на конкурентните взаимоотношения между инвазивното интродуцирано паразитно растение *Cuscuta campestris* и местни представители на род *Cuscuta* посредством екологични, молекулярно-генетични и биохимични подходи”, договор КП-06-Н31/10 11.12.2019, Фонд Научни Изследвания, МОН, България

„Взаимодействие между гостоприемници и срещащи се в България и Китай стъблени паразитни растения от род *Cuscuta* в условия на солеви стрес – екологично и селскостопанско значение“, Проекти за двустранно сътрудничество България-Китай, договор ДНТС/ Китай 01/5 от 16.12. 2016, Фонд Научни Изследвания, МОН, България. Партньор: Проф. д-р Junmin Li, Университет на Тайджоу, Китай

“Селекция на антитела срещу белтъци, индуцирани в отговор на паразитизъм от *Cuscuta campestris* в устойчивия гостоприемник *Solanum lycopersicum* посредством фагов дисплей”, договор 80-10-96/16.04.2020, ФНИ на Софийски Университет

Talented Young Scientist Program of the Ministry of Science and Technology, People’s Republic of China

Общи данни за дисертационния труд

Дисертацията е написана на 277 страници (190 страници основен текст и 87 страници приложения). В литературния обзор са използвани 10 авторски фигури и 3 авторски таблици. Резултатите са илюстрирани с 76 фигури и 13 основни таблици и са цитирани 337 литературни източника. Представените резултати са публикувани в 20 научни публикации, с намерени 351 цитата в Scopus.

Увод и актуалност на научната проблематика

Членовете на род *Cuscuta* включват около 200 вида стъблени холопаразитни растения в семейство Convolvulaceae, които имат значително влияние върху естествени и селскостопански растителни съобщества. Като цяло представителите на род *Cuscuta* се разглеждат като генералисти – инфектират голямо разнообразие от растителни видове и единично растение може едновременно да паразитира върху няколко различни гостоприемници. Селскостопанското значение на няколко вида *Cuscuta* е значително, причинявайки тежки загуби на реколта в световен мащаб.

Въпреки огромното селскостопанско и екологично значение на паразитните растения от род *Cuscuta*, все още има огромни неясноти относно разпространението, таксономичния статус и молекулните механизми на паразитизъм. Отделно от това, влиянието на абиотични и биотични стресови фактори, колкото и да е добре изучено в растенията по принцип, почти не е засегнато при тези растения. Паразитните растения не са рядкост в предизвикателни среди – с повишена соленост или недостиг на вода, замърсени или при неблагоприятни температури. Субоптималните условия могат да променят предпочитанията им към гостоприемника, както и чувствителността му към паразитизъм. От друга страна допълнителният стрес от страна на инфекцията с *Cuscuta* може да окаже съществено влияние върху способността на гостоприемниците да се адаптират към други стресови влияния. За да се разбере по-добре техният потенциал за въздействие върху съвременното земеделие във време на климатични промени, трябва да се приложи по-систематичен

подход, който изисква разработването на подходящи модели на устойчиви на стрес и чувствителни към стрес двойки гостоприемници и паразитни растения.

Настоящата дисертация има за цел да задълбочи познанията за разпространението на тези паразити в Република България, техния спектър от гостоприемници и генетичното разнообразие чрез класически и молекулярни подходи. Обобщени са резултати от научно-експериментална работа, извършена в периода 2017-2022 година от групата по Молекулярна биология на растителната клетка към катедра Биохимия на Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски“ в сътрудничество с колеги катедри Ботаника, Биофизика и Екология и опазване на природната среда на факултета, както и в международно сътрудничество с колеги от Китай, Сърбия, Австрия и Италия. Дисертантът, доц. д-р Любен Загорчев е водещ учен в тези изследвания, с основна роля в планирането и извършването на тези изследвания, в анализа на резултатите и оформянето на научните публикации.

Изследвано е влиянието на абиотичен стресов фактор – засоляване, върху всички етапи от паразитизма, както върху паразита, така и върху неговите гостоприемници. Използвани са широк спектър биохимични и молекулярно-биологични подходи. Чрез метагеномен анализ е оценено влиянието на паразитизма върху почвените микробни съобщества. Сред биотичните стресови фактори са изследвани галообразуващите епипаразитни насекоми от род *Smicronyx*, както и растителноядни насекоми от гризач и смучещ тип. Проверена е и хипотезата, че представителите на род *Cuscuta* са потенциални резервоари и вектори на растителни вируси.

Получените резултати имат съществен принос за изясняване на фундаментални научни проблеми, касаещи взаимодействията растение – паразит в условия на субоптимални параметри на околната среда, които имат и приложно значение, като основа за предвиждане на ефектите на абиотичен стрес в светлината на климатичните промени върху разпространението, селскостопанското и екологично въздействие на тези широко-разпространени паразитни растения.

1. Литературна справка

Паразитните цветни растения са приблизително 4000 вида, разпределени в повече от 20 семейства, което представлява около 1.5% от всички известни видове висши растения (Westwood et al. 2010), с най-много представители в семействата Orobanchaceae и Loranthaceae. Тези високо-специализирани организми се характеризират с частична или пълна загуба на фотосинтетична способност и зависят от гостоприемниците си за получаване на органични съединения, минерални елементи и вода (Bungard 2004). Паразитните растения се класифицират в две основни категории. Хемипаразитите съдържат хлорофил и са способни да фотосинтезират. От гостоприемника те получават вода и минерални елементи. Холопаразитите са нефотосинтезиращи и зависят изцяло от гостоприемника (Hegenauer et al. 2017; Nickrent and Musselman 2004). Паразитните растения осъществяват връзка с растенията-гостоприемници и абсорбират хранителни вещества посредством специализиран орган, наречен хаустория, добре дефинирана структурна и физиологична връзка с гостоприемника.

Род *Cuscuta* включва около 200 вида стъблени холопаразитни растения в семейство Convolvulaceae (Braukmann et al. 2013), които имат значително влияние върху естествени и селскостопански растителни съобщества. В българската флора родът е представен от 9 вида, от които *Cuscuta campestris* е северноамерикански вид, който е интродуциран и инвазивен за България. Селскостопанското значение на няколко вида от род *Cuscuta* е

значително, причинявайки тежки загуби на реколта в световен мащаб (Parker 2012). Селскостопанското значение на *Cuscuta* в България не е добре документирано. Жизненият цикъл на паразитите от род *Cuscuta* преминава през няколко ясно дефинирани етапа – покълване, локализация и увиване около подходящ гостоприемник, формиране на хаустории и последващо развитие. Екологичната стратегия на паразитните растения включва дълбок физически и вероятно физиологически покой (Jayasuriya et al. 2008), който осигурява дълготрайно присъствие на семената в почвата и покълване в продължение на десетки години. Доматите (*Solanum lycopersicum* L.) са показани като резистентни (или несъвместими) гостоприемници за *Cuscuta* spp. (Amini et al. 2017; Sahm et al. 1995). Молекулната основа на тази резистентност е до голяма степен неизвестна.

Почти всички видове *Cuscuta* запазват някаква способност да фотосинтезират (McNeal et al. 2007a). В рамките на рода фотосинтетичният капацитет е загубен в различна степен. За разлика от други членове на рода, *C. campestris* запазва значителна част от гените в пластома (Braukmann et al. 2013). Критичната стъпка в развитието на тези растения е локализацията, закачането и формирането на хаустория върху чувствителен гостоприемник. Формирането на хаустория започва се с формиране на адхезивен диск, също известен като прехаустория. Следващият етап представлява фазата на проникване, която се ръководи от комплекс от ензими, които модифицират структурата на клетъчната стена на клетките на гостоприемника. Клетките на върха на хаусторията се означават като „търсещи хифи“, чиято функция е да установят контакт с проводящите елементи на гостоприемника. При достигане на такива „търсещите хифи“ обграждат проводящите елементи и формират връзка, която може да бъде само с флоема или с ксилема и флоема (Kaiser et al. 2015). Най-основното и директно влияние на паразита върху гостоприемника безспорно е свързано с директното извличане на хранителни вещества – както органични съединения, така и минерални елементи и вода. Докладвано е също намаляване на фотосинтетичната активност на гостоприемника при инфекция с *Cuscuta* (Saric-Krsmanovic et al. 2018).

Паразитните растения могат да бъдат засегнати от абиотични стресови фактори по подобен начин, както и техните гостоприемници, напр. от ограничения в покълването на семената и развитието на младите растения поради засушаване и/или засоляване, или косвено, т.е. поради ограничения, свързани с гостоприемника. Последното е особено вярно за холопаразитите, повечето от които нямат или имат ограничен контакт с почвата и нефотосинтезират. Те са силно зависими от наличието на гостоприемници и абиотичните стресови фактори потенциално намаляват това наличие. "Качеството" на гостоприемника обаче може да не зависи само от наличието на биомаса. Когато са изложени на абиотични стресови фактори, като засушаване и засоляване, гостоприемниците могат да натрупват по-високи концентрации на осмопротектанти, които са потенциално богати на ресурси субстрати за паразитите, което може дори да подобри качеството на гостоприемника в сравнение с гостоприемниците, които не са подложени на стрес (Frost et al. 2003). Допълнително, абиотичният стрес може да повлияе на способността на гостоприемника да демонстрира адекватна защитна реакция срещу инфекция, или напротив, тази реакция да е по-силна.

2. Цел и задачи

Основна цел на дисертационния труд е да бъде характеризирано видовото разнообразие на род *Cuscuta* в България и да бъде изследвано влиянието на биотични и абиотични фактори върху взаимоотношенията паразит – гостоприемник.

Целта е формулирана за да тества няколко основни хипотези.

Хипотеза 1. Интродуцираният вид *Cuscuta campestris* има по-висок инвазивен и паразитен потенциал от местните видове.

За тестване на тази хипотеза са поставени следните научни задачи:

- 1.1. Характеризиране на видовото и генетично разнообразие на представителите на рода в България.
- 1.2. Характеризиране на спектъра от гостоприемници в зависимост от видовото и генетично разнообразие.

Хипотеза 2. Взаимодействието паразит-гостоприемник се повлиява от абиотични и биотични стресови фактори.

За тестване на тази хипотеза са поставени следните научни задачи:

- 2.1. Изследване влиянието на биотични фактори – вид гостоприемник върху паразитизма при *Cuscuta* spp.
- 2.2. Изследване влиянието на абиотични фактори – засоляване върху различни етапи от паразитизма на *Cuscuta* spp.

Хипотеза 3. Паразитите от род *Cuscuta* са обект на влиянието на биотични фактори, които значително променят метаболизма им.

За тестване на тази хипотеза са поставени следните научни задачи:

- 3.1. Изследване влиянието на биотични фактори – растителни патогени върху паразитизма на *Cuscuta* spp.
- 3.2. Изследване на *Cuscuta* spp. като гостоприемници и вектори на растителни патогени.

3. Материали и методи

3.1 Растителен материал

Семенен и вегетативен материал от *Cuscuta campestris*, *C. europaea*, *C. approximata* и *C. epithymum* са събирани в периода 2017 – 2022 г. на територията на Република България. Семена от останалите видове са предоставени безвъзмездно от колеги от Китай, Сърбия и Обединеното кралство.

3.2 Методични подходи

Молекулярна таксономия и филогенетичен анализ – таксономичният статус на изследваните проби е потвърден чрез специфично размножаване чрез PCR, секвениране и BLAST на частични фрагменти от гените за малката рибозомална субединица ITS1, 5.8S и ITS2, както и частичен фрагмент от гена за голямата рибозомална субединица. Генетичното разнообразие е изследвано чрез Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) анализ.

Метагеномен анализ – метагеномен анализ е извършен за изследване на разнообразието на почвените микробиални съобщества – чрез PCR амплификация на 16S (за бактерии) и ITS (за гъби) тотална ДНК и NGS секвениране на платформа Illumina.

Транскриптомен анализ – диференциално експресирани гени (DEGs) са идентифицирани чрез NGS секвениране на платформа Illumina на иРНК библиотеки, след което DEGs са анотирани чрез GO и KEGG алгоритми.

Ензимни активности – ензимни активности са изследвани или чрез спектрофотометрични методи, или чрез зимограмни методи след разделяне на семи-денатуриращи полиакриламидни гел електрофорези.

Blue Native/SDS PAGE – комбинация от синя нативна и денатурираща електрофорези са използвани за разделяне на тилакоидни комплекси след разтваряне с дигитонин.

Протеомен анализ – гел-базиран протеомен анализ е извършен чрез комбинация от изоелектрично фокусиране/ денатурираща електрофореза, софтуерен анализ на изображенията и последваща MALDI TOF/TOF MS/MS идентификация на диференциално представени белтъци.

Детекция с антитела – имуоблот (Western blot) анализ със специфични антитела е приложен след разделяне на SDS PAGE и полусух пренос на нитроцелулозна мембрана или след тъканен отпечатък върху нитроцелулозна мембрана. Специфични антигени са детектирани чрез DAS-ELISA метод.

Метаболомен анализ - пробите са анализирани с помощта на система за ултраефективна точна хроматография (UPLC) и тандемна масспектрометрия.

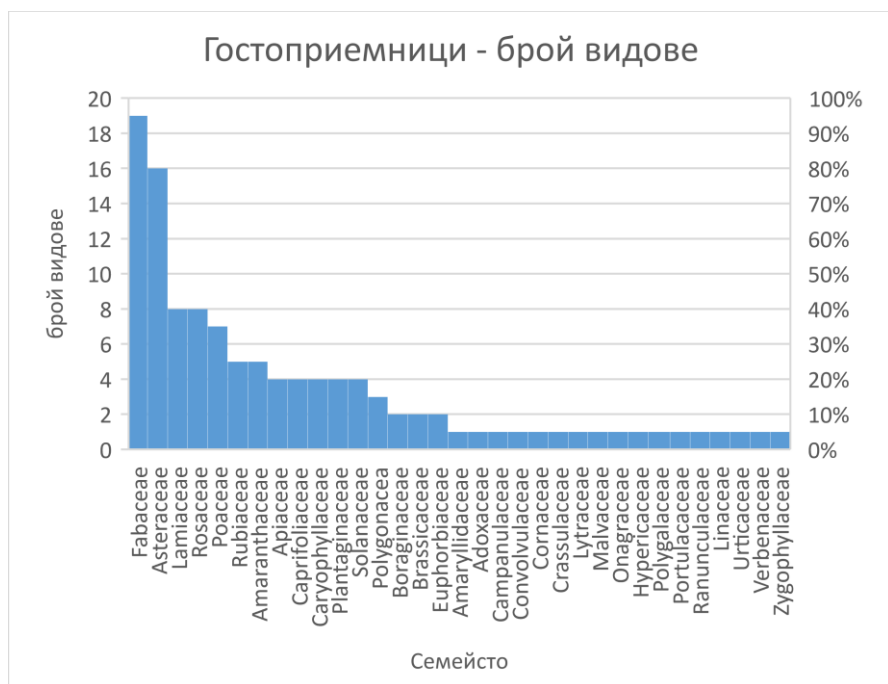
Фотосинтетични измервания - относителното съдържание на хлорофил е измерено с апарат CCM-200 или спектрофотометрично. Фотосинтетичните параметри са измерени с апарат Li-6400. Бързата флуоресценция (PF) на Chl a е измерена с флуорометър MPEA.

4. Резултати

4.1 Разпространение, спектър от гостоприемници и генетично разнообразие на *Cuscuta* spp. в България

4.1.1 Разпространение и спектър от гостоприемници на *Cuscuta* spp.

В периода 2017-2021 година е събран растителен материал от общо 54 находища на четири от разпространените в България видове: *Cuscuta approximata* – 6 бр., *C. campestris* – 35 бр., *C. epithymum* – 9 бр. и *C. europaea* – 4 бр. (допълнителна Таблица s4.1.1.1, разпределение по флористични райони Фиг. 11). Всички находки са определени морфологично и са потвърдени чрез ДНК анализ. Всички секвенции са качени в базата данни GenBank на NCBI (Таблица s4.1.1.2). При настоящето проучване е характеризиран подробно спектърът на гостоприемниците, върху които паразитират *Cuscuta approximata*, *C. campestris*, *C. epithymum*, *C. europaea* (Фиг. 13). На този етап общо за проучените видове са установени 114 вида гостоприемници, отнесени към 87 рода и 33 семейства, всички от отдел покритосеменни растения (Magnoliophyta). Най-голямо разнообразие от видове-гостоприемници има сред представителите на семейство Бобови (Fabaceae) – 19 вида, следвани от сем. Сложноцветни (Asteraceae) – 16 вида, сем. Устноцветни (Lamiaceae) и сем. Розоцветни (Rosaceae) – по 8 вида. Сред гостоприемниците са установени 5 инвазивни вида (*Amaranthus albus*, *A. retroflexus*, *Datura stramonium*, *Erigeron canadensis*, *Xanthium orientale* subsp. *italicum*), но също така и ендемични видове – българският ендемит *Campanula trojanensis*.



Фигура 13. Разпределение на установените видове-гостоприемници по семейства, върху които паразитират *Cuscuta approximata*, *C. campestris*, *C. epithymum*, *C. europaea*

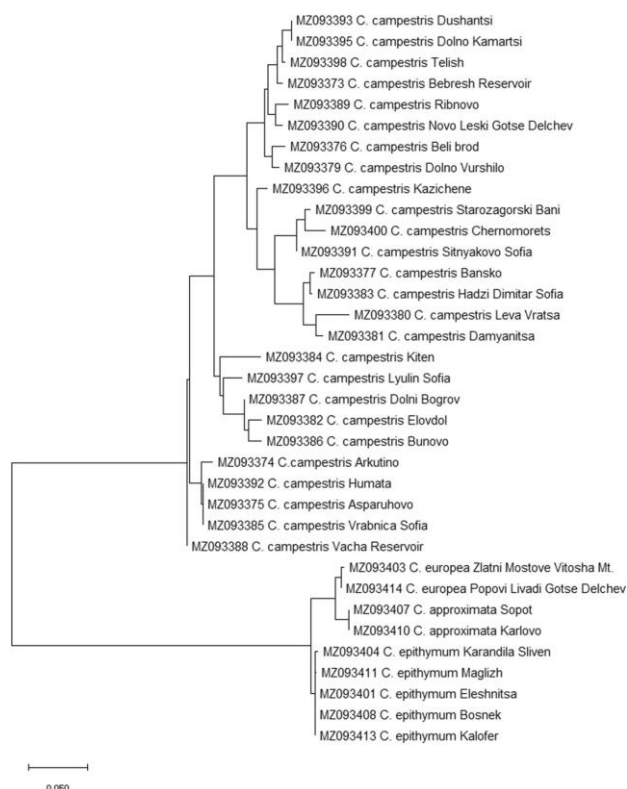
Разпределението на гостоприемниците на четирите вида *Cuscuta* по семейства е дадено на Фиг. 14-17. При *Cuscuta campestris* са проучени най-голям брой находища (35 бр.) и са установени най-голям брой гостоприемници - 52 вида от 19 семейства. По отношение на естественото разпространение и припокриването на ниши е установено, че има известно припокриване между четирите вида в определени флористични райони (Фиг. 11). Анализът

на припокриване на гостоприемниците е представен като екологична мрежа (**Фиг. 18**). Макар че най-честите гостоприемници са ясно очертани и се различават при четирите вида *Cuscuta*, прави впечатление припокриване в гостоприемниците на ниво семейство, при което представители на Fabaceae, Lamiaceae и Apiaceae са предпочитани гостоприемници и от четирите вида паразити.

Всички установени и събрани видове от р. *Cuscuta* се срещат в низинния, пред- и среднопланинския растителни пояси. *Cuscuta europaea* е установена на най-голяма надморска височина, на 1440 m в местността Попови ливади в Пирин. На по-голяма надморска височина се среща и *C. epythimum*, във връзка с по-големия височинен диапазон в разпространението на нейните гостоприемници. *Cuscuta campestris* също показва разпространение в много широк височинен диапазон, подобно на *C. europaea*. За сметка на това разпространението на *C. approximata* е в сравнително тесни граници (**Фиг. 19**).

4.1.3 Генетично разнообразие

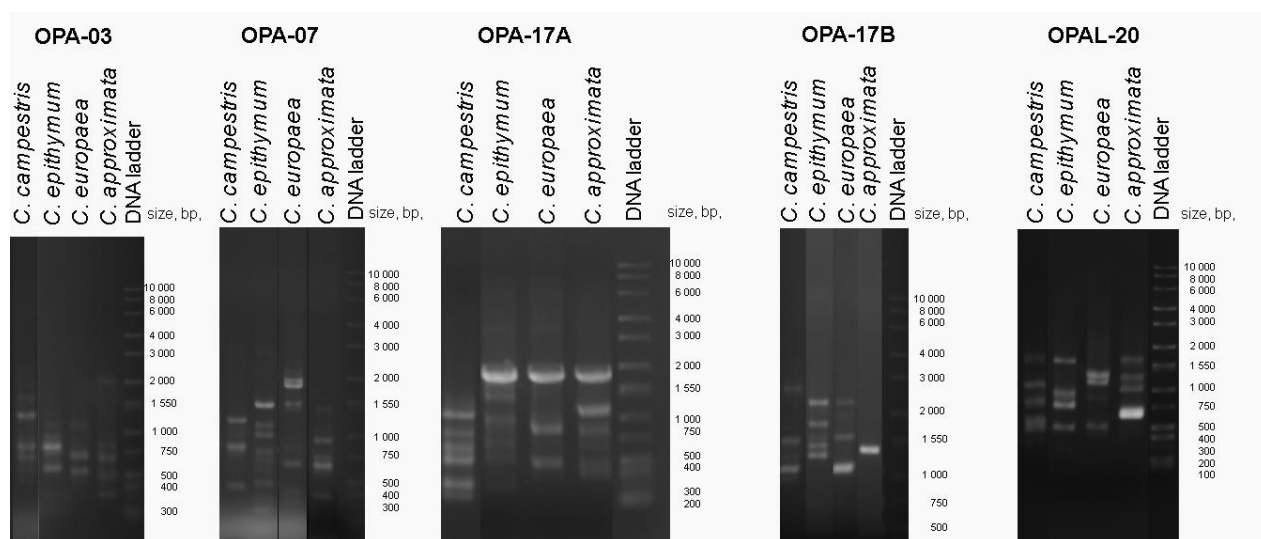
Генетичното разнообразие е оценено на първо място по ITS секвенциите. Списък с използваните секвенции, депозирани в GenBank е даден в допълнителна **Таблица s4.1.1.2**. Построено е филогенетично дърво по метода на maximum likelihood, използвайки наличните секвенции от рДНК региона (**Фиг. 20**). Установено е ясно разграничаване на *C. campestris* от останалите три вида, които също се събират в ясно дефинирани клъстери. Прави впечатление, че *C. europaea* е сравнително близка до *C. approximata*.



Фигура 20. Филогенетично дърво на изследваните популации *Cuscuta* по метода на maximum likelihood на база на секвенираните ITS фрагменти.

С цел установяване на междупопулационни разлики е приложен RAPD анализ с 5 праймерни двойки. Получените фрагменти, разделени на агарозна електрофореза са приложени като допълнителни **Фигури (s4.1.3.1-15)**. В **Таблица s4.1.3.1** са приложени кодовете, използвани при изолиране на пробите. Резултатите показват, че се наблюдават значителни междувидови разлики в RAPD профилите (**Фиг. 21**) и комбинация от праймери

може да бъде използвана за успешна видова идентификация. Същевременно се наблюдава сравнително униформен профил при всички праймерни двойки при *Cuscuta campestris*, докато останалите видове демонстрират значителен полиморфизъм по отношение на RAPD амплификационните продукти. На база на получените профили е построено UPGMA филогенетично дърво на избрани популации *Cuscuta campestris* (Фиг. 22).



Фигура 21. RAPD профили на четири вида *Cuscuta* с пет различни праймерни двойки.

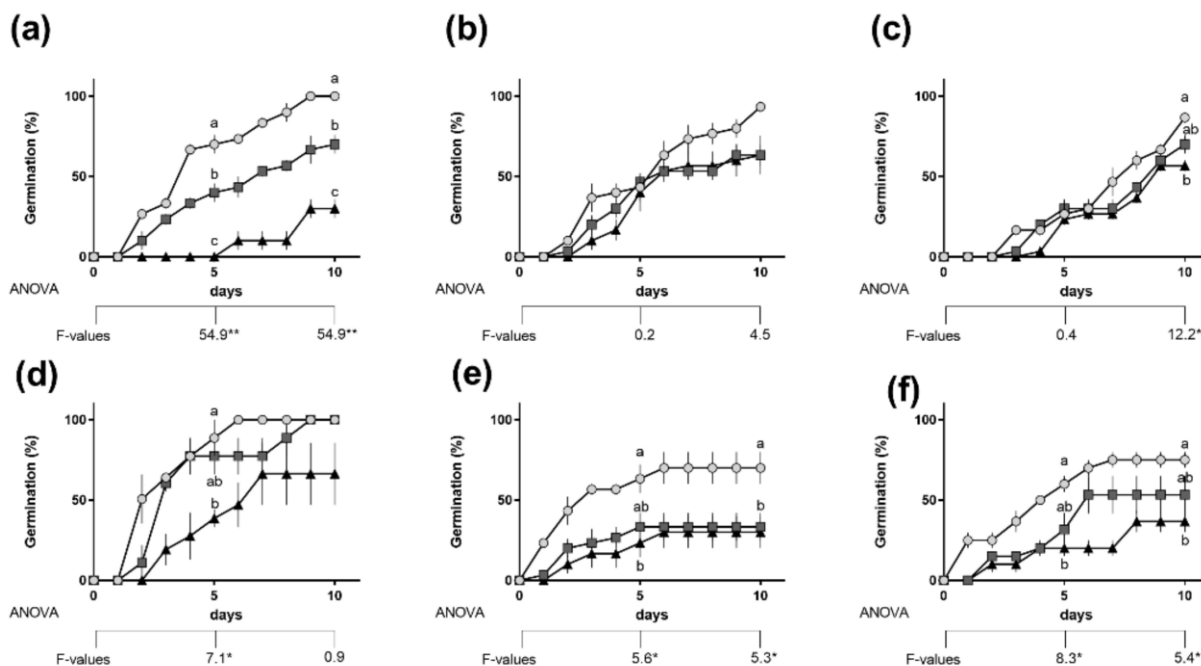
4.2 Влияние на абиотични и биотични фактори върху покълването и етапите на развитие преди заразяване на гостоприемник

4.2.1 Влияние на различни фактори върху покълване и последващо развитие

Влиянието на възрастта на семената и генотипа върху покълването е изследвано върху семена от 26 популации, събирани в Република Сърбия в периода 2005-2019-та година. Данните за отделните популации, ITS секвенции и филогенетично дърво са дадени в допълнителна Таблица s4.2.1.1. и Фиг. 23. Резултатите от RAPD анализ са обобщени в Таблица 4. На база на RAPD е конструирано UPGMA дърво (Фиг. 24), според което ясно се различават два клъстера.

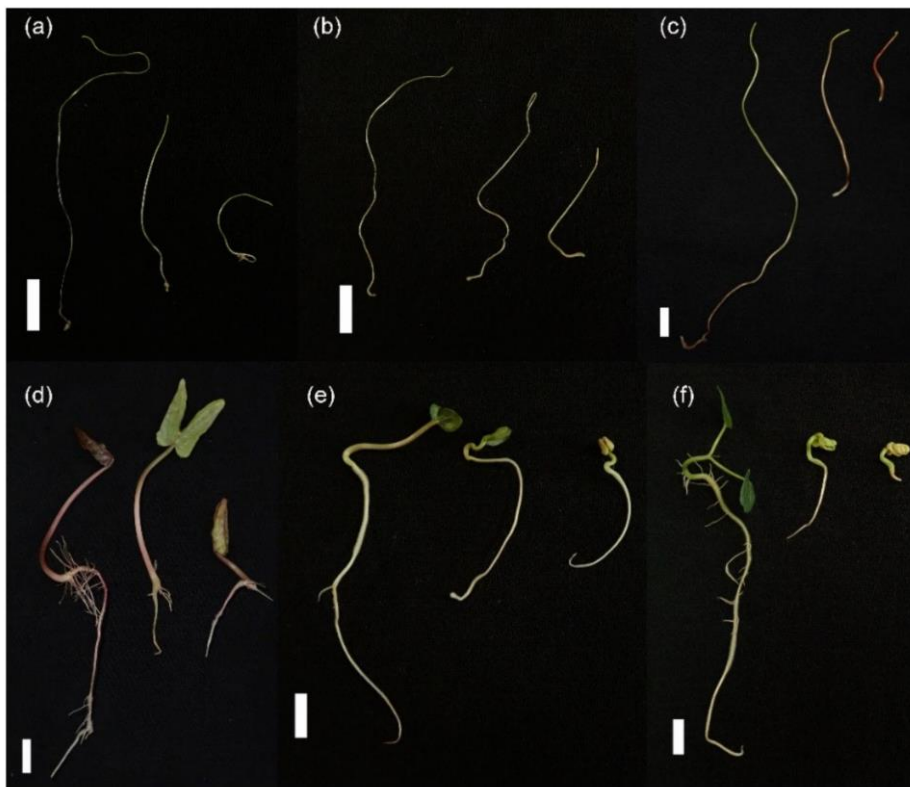
Температурата оказва значителен ефект върху кълняемостта на семената на различни популации *C. campestris*. Най-високият процент на кълняемост при всички популации, вариращ от 64% (Cus62) до 9,3 % (Cus59), се наблюдава при 28°C (Таблица 5). Установена е корелация между кълняемостта и възрастта на семената - тенденция към намаляване на кълняемостта с напредването на възрастта на семената. Тестването на различни биоклиматични вариабилни чрез MaxEnt моделиране (Ren et al. 2020) за разпространението на *Cuscuta chinensis* показва, че именно температурата, наред с влажността имат най-голямо влияние (допълнителна Фигура s4.2.1.2).

Влиянието на различни концентрации NaCl върху процента покълване е изследвано върху три вида *Cuscuta* и три непаразитни вида от сем. Convolvulaceae. Намаляването на кълняемостта е различно при изследваните видове (Фиг. 25). Статистическата значимост на ефекта на вида растения и солевата концентрация върху крайния процент на кълняемост (10ти ден) е показана на Таблица 6. Въпреки, че ефектът на солевата концентрация е значим при $p \leq 0,01$, ефектите на вида растения или комбинацията от вид и засоляване не дават статистически значими разлики.



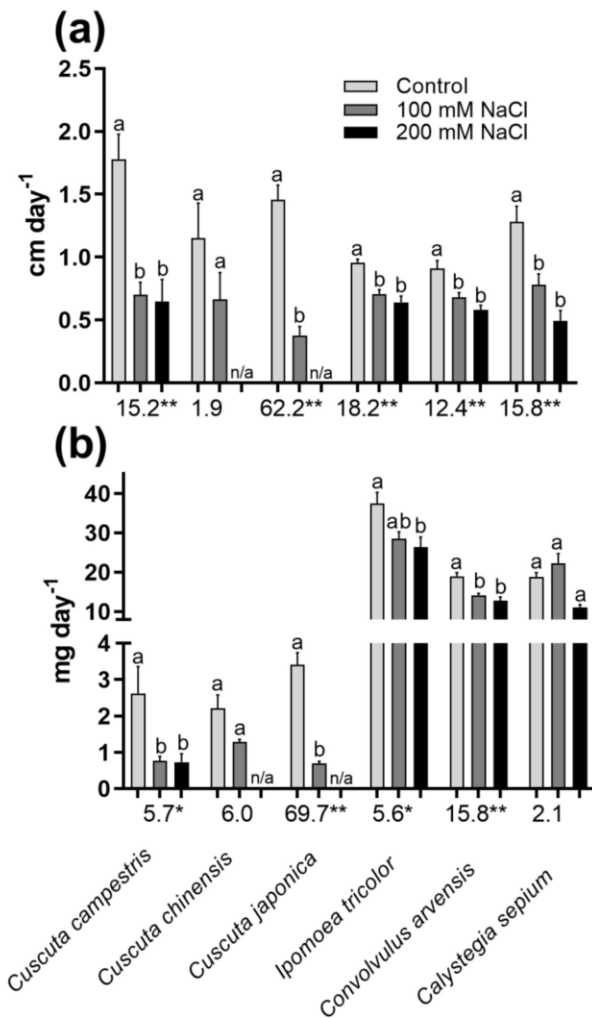
Фигура 25. Кълняемост на *Cuscuta campestris* (a), *Cuscuta chinensis* (b), *Cuscuta japonica* (c), *Ipomoea tricolor* (d), *Convolvulus arvensis* (e) и *Calystegia sepium* (f) при 0 (кръгчета), 100 mM (квадратчета) и 200 mM (триъгълници) NaCl. Различните букви показват статистическа значимост при $p \leq 0,05$ (Tukey's post hoc test), еднофакторен ANOVA анализ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$), $n = 3$. Тест за хомогенност на Levene: $p > 0,05$. Представените стойности са средни \pm SEM. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2021) Plants, 10, 438)

По-нататъшният растеж е проследен до 7-ия ден след покълването и показва, подобен инхибиращ ефект (Фиг. 26, 27).



Фигура 26. Седем-дневни растения *Cuscuta campestris* (a), *Cuscuta chinensis* (b), *Cuscuta japonica* (c), *Ipomoea tricolor* (d), *Convolvulus arvensis* (e) и *Calystegia sepium* (f) при 0, 100 mM и 200 mM NaCl (от ляво надясно). Мащаб = 1 cm. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2021) *Plants*, 10, 438)

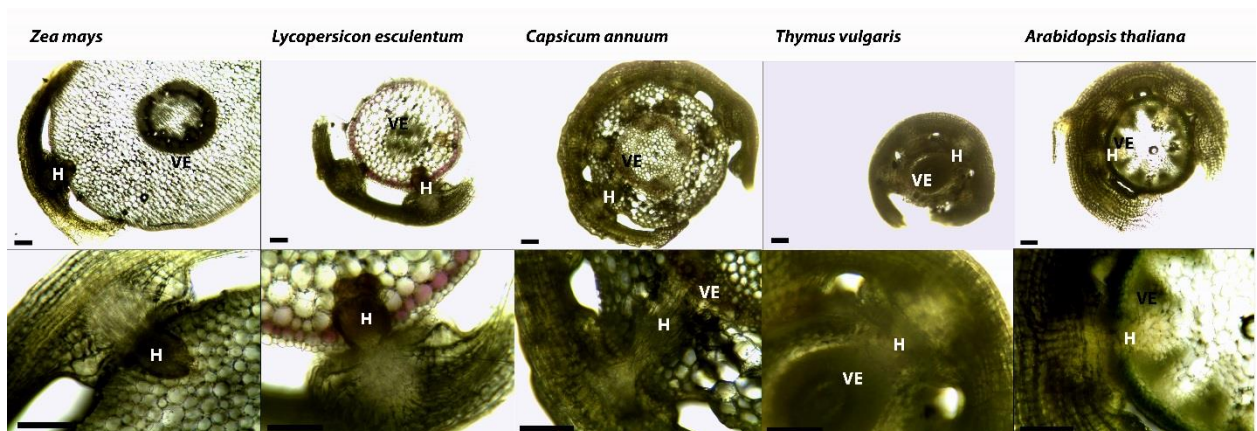
На 24-тия и 48-ия час от покълването са изследвани чрез зимограмни анализи два основни класа хидролитични ензими – амилази и протеази, с възможна роля в мобилизирането на резервни вещества в семената (Фиг. 28 и 29). Отчетен е растеж и преживяемост на покълналите паразитни и непаразитни растения. Предварителното засоляване има известен отрицателен ефект върху способността на *Cuscuta* да инфектира растенията-гостоприемници и периодите на инфектиране и образуване на вторични стъбла. Предварителното покълване при солени условия се отразява в по-дълго време за прикрепване към гостоприемника (закъснение с 3-4 дни) и по-дълго време за образуване на вторично стъбло (закъснение с 2-3 дни). Едновременно с това около 15 % от *C. campestris*, покълнали при 100 mM NaCl и почти 50 % от тези при 200 mM NaCl не успяват да заразят успешно растенията-гостоприемници. Ефектът при 100 mM NaCl е сходен при *C. chinensis* и *C. japonica*, докато при 200 mM NaCl и двата вида не успяват да се прикрепят към гостоприемника. Това обаче се оказва критичният етап от развитието на паразита, тъй като по-нататъшното развитие, определено като брой растения способни да образуват вторично стъбло, не се повлиява от предварителната обработка със сол. При всички видове се наблюдавано сходно инхибиране на скоростта на растеж при 100 и 200 mM NaCl (Фиг. 30). Докато намалението при непаразитните видове беше в рамките на 20-30 %, ефектът от покълването при солени условия при *Cuscuta* е по-висок, като води до над 70% намаляване на скоростта на растеж в сравнение с контролите (Фиг. 30).



Фигура 30. Скорост на растеж в cm ден⁻¹ (a) и mg ден⁻¹ (b) на растения, покълнали при различни концентрации на NaCl върху гостоприемник *Arabidopsis thaliana* (*Cuscuta* spp.) или директно в почва (останалите видове). Данните представят средни стойности ± SEM. Различни букви показват статистическа значимост при $p < 0.05$, Tukey's post hoc test. Еднофакторна ANOVA: F-стойностите са дадени отдолу, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Levene's homogeneity test: $p > 0.05$. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2021) Plants, 10, 438)

4.2.2 Влияние на гостоприемника и засоляването върху формирането на хаустория

Формирането на хаустория до голяма степен зависи от вида на гостоприемника (Фиг. 31). При *Lycopersicon esculentum* (домат) се наблюдава характерно покафеняване в областта на хаусторията, вероятно причинено от активен защитен отговор на гостоприемника, докато при *Zea mays* (царевица) хаусториите не проникват през паренхимната тъкан на гостоприемника.



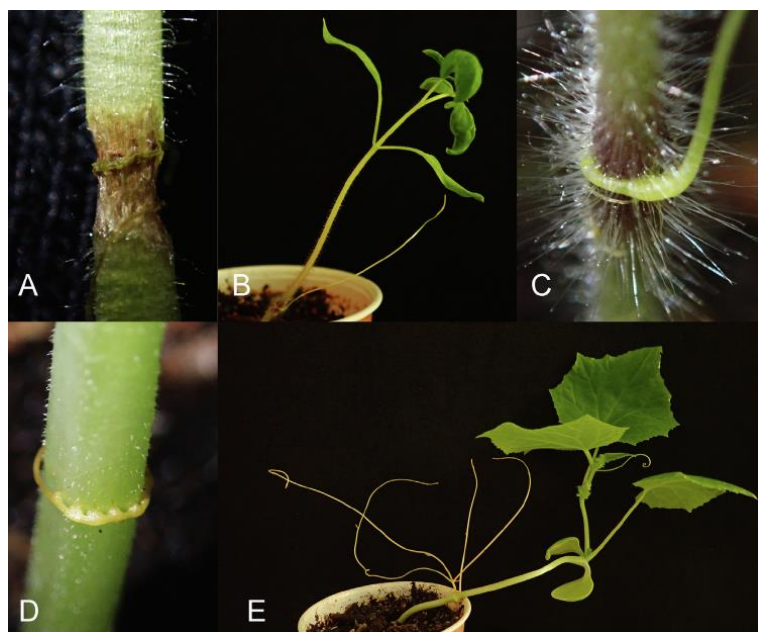
Фигура 31. Формиране на хаустории на *Cuscuta campestris* върху различни видове гостоприемници. H – хаустория; VE – проводящи тъкани на гостоприемника. Мащаб = 200 μ m.

Ензими с вероятно участие във формирането на хаустория са изследвани чрез зимограмни анализи на белтъци от клетъчна стена (Фиг. 32-35). Анализът показва, че най-ясно изразени изоформи, асоциирани с взаимодействието между паразит и гостоприемник се наблюдават в етапа на макроскопски видими хаустории. Имуноблот анализи на въглехидратни епитопи от хидроксипролин богати протеоглици в мястото на инфекция на съвместим (*Arabidopsis*), резистентен (домат) и невъзместим (царевица) гостоприемник при 0 и 150 mM NaCl. Използвани са анти-арабиногалактанови антитела LM2, JIM8 и MAC207 и анти-екстензиново антитяло JIM12 (Фиг. 36). От резултатите следва, че трите гостоприемника имат различен профил на арабиногалактанови белтъци, като поне част от тях имат отношение към отговора на солеви стрес, към инфекцията с *Cuscuta campestris*, или и към двете.

4.3 Влияние на абиотични и биотични фактори върху развитието на паразита след успешно заразяване

4.3.1 Влияние на засоляването в зависимост от вида гостоприемник

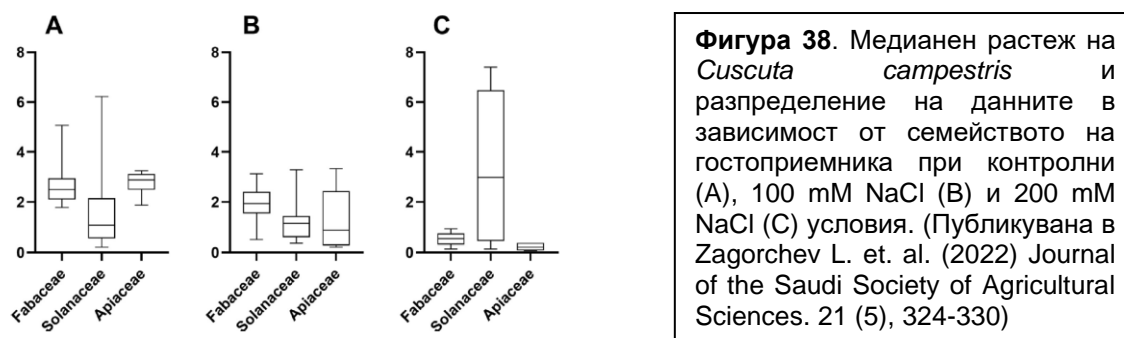
Критичният етап от развитието на *Cuscuta* spp. е формирането на вторичното стъбло, което определя дали паразитът ще оцелее или не. Влиянието на комбинация от биотични (вид гостоприемник) и абиотични (засоляване) фактори върху развитието на паразитното растение е проследена в гостоприемници, културни растения, от различни семейства. В проведените експерименти нито един от сортовете домати не се оказа подходящ гостоприемник за *C. campestris* нито в контролни, нито в условията на засоляване. Отмирането на паразита е съпроводено с характерно покафеняване на стъблото на гостоприемника, макар че тази резистентност не е пълна и се наблюдават и успешно развити паразити – в 0.57% от инфекциите (Фиг. 37). Представителите на семейство Cucurbitaceae също се оказват несъвместими гостоприемници в този конкретен случай, макар и без видима защитна реакция (Фиг. 37).



Фигура 37. Растеж на *Cuscuta campestris* върху различни гостоприемници. А – несъвместимо взаимодействие с *Solanum lycopersicum*; В – успешно развитие върху *Solanum lycopersicum*; С – преодоляване на защитната реакция на *Solanum lycopersicum*; D – несъвместимо взаимодействие с *Cucumis sativus*; успешно развитие върху *Cucumis sativus*. (Публикувана в Zagorchev L. et. al. (2022) Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 21 (5), 324-330)

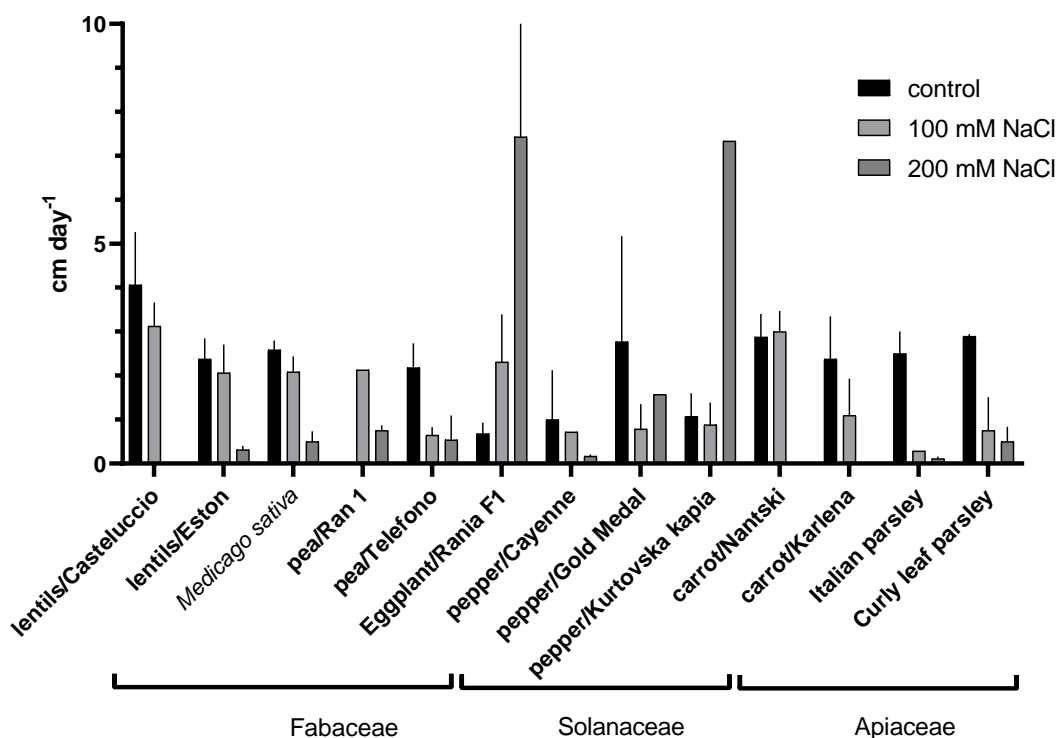
Процентът на преживяемост в зависимост от растението-гостоприемник има тенденция да намалява с увеличаване на концентрацията на солта (Таблица 7). Времевата рамка между образуването на хаусторите и появата на вторичните стъбла, или лаг-фазата (Koch et al. 2004), се различава съществено между отделните растителни семейства и в рамките на едно растение. При повечето от Fabaceae фазата на закъснение е не по-дълга

от 48 часа. При Ариасеае появата на вторичното стъбло отнема 6-7 дни, докато при Solanaceae тя се удължава до 10 ± 2 дни. Скоростта на растеж на *C. campestris* силно зависи от растението-гостоприемник, включително и при контролни условия. На ниво растително семейство медианните темпове на растеж са сравними, когато растенията-гостоприемници са членове на Fabaceae или Ариасеае и намаляват със засоляването (Фиг. 38).



Фигура 38. Медианен растеж на *Cuscuta campestris* и разпределение на данните в зависимост от семейството на гостоприемника при контролни (A), 100 mM NaCl (B) и 200 mM NaCl (C) условия. (Публикувана в Zagorchev L. et. al. (2022) Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 21 (5), 324-330)

Данните обаче не са нормално разпределени (Фиг. 38), а са свързани главно с големите разлики в скоростта на растеж на *C. campestris* в зависимост от вида и сорта (Фиг. 39).



Фигура 39. Среден растеж в cm ден^{-1} на *Cuscuta campestris* върху различни гостоприемници при различни солеви концентрации. Средни стойности \pm SEM. (Публикувана в Zagorchev L. et. al. (2022) Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 21 (5), 324-330)

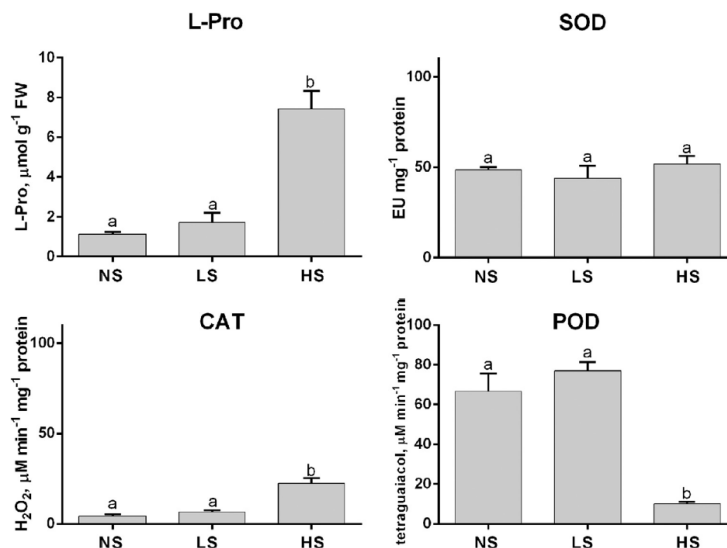
Статистическият анализ показва, че семейството на растенията-гостоприемници не е особено определящо за растежа на *C. campestris*, но има силна връзка със засоляването (Таблица 8). Например ефектът на абиотичния стрес е значимо различен между членовете на различните семейства. В рамките на отделните семейства ефектът от повишената соленост повлиява значително растежа на *C. campestris* със слаба зависимост от вида на растението-гостоприемник (Таблица 8). Въпреки това в рамките на отделните видове

растения-гостоприемници сортът също оказва значително влияние върху растежа на паразита.

Таблица 9. Двухфакторен ANOVA анализ на растежа на *Cuscuta campestris* в cm ден⁻¹ върху различни гостоприемници при различни солеви концентрации. (Публикувана в Zagorchev L. et. al. (2022) Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 21 (5), 324-330)

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Family	7.483	2	3.742	2.140	0.123
salinity	21.354	2	10.677	6.108	0.003
Family * salinity	79.977	4	19.994	11.437	<0.001
On species level					
within Fabaceae					
species	3.356	2	1.678	3.773	0.033
salinity	30.877	2	15.439	34.722	<0.001
species * salinity	4.006	4	1.002	2.253	0.085
within Solanaceae					
species	9.648	1	9.648	2.923	0.098
salinity	50.820	2	25.410	7.699	0.002
species * salinity	23.691	2	11.846	3.589	0.040
within Apiaceae					
species	3.909	1	3.909	7.640	0.012
salinity	13.265	1	13.265	25.925	<0.001
salinity * species	2.896	1	2.896	5.661	0.027
On cultivar level					
within Lens culinaris					
cultivar	7.521	1	7.521	30.723	<0.001
salinity	4.533	1	4.533	18.516	0.003
cultivar * salinity	0.574	1	0.574	2.346	0.164
within Pisum sativum					
cultivar	1.548	1	1.548	17.292	0.001
salinity	7.239	2	3.619	40.441	<0.001
cultivar * salinity	1.752	2	0.876	9.786	0.003
within Capsicum annum					
cultivar	19.577	2	9.788	9.403	0.002
salinity	14.020	2	7.010	6.734	0.007
cultivar * salinity	52.550	4	13.138	12.620	<0.001
within Daucus carota					
cultivar	3.688	1	3.688	12.107	0.008
salinity	1.882	1	1.882	6.179	0.038
cultivar * salinity	2.644	1	2.644	8.679	0.019
within Petroselinum crispum					
variety	0.637	1	0.637	8.936	0.011
salinity	22.243	2	11.122	156.064	<0.001
variety * salinity	0.055	2	0.027	0.383	0.690

Също така е измерена и концентрацията на L-пролин в *Cuscuta campestris* при различни гостоприемници и солеви концентрации (**Фиг. 40**). Наблюдава се обща тенденция на увеличаване на концентрацията пропорционално на приложения солеви стрес, което обаче не е свързано с темповете на растеж. В експериментална система с гостоприемник, *Arabidopsis thaliana*, третиран с 0 (NS – без сол), 50 (LS – ниска сол) и 150 (HS – висока сол) mM NaCl са изследвани антиоксидантните ензими пероксидаза (POD), супероксиддисмутаза (SOD) и каталаза (CAT), както и концентрация на L-пролин в паразита *Cuscuta campestris*. Резултатите са представени на **Фигура 41**.



Фигура 41. Концентрация на L-пролин (L-Pro) и активности на супероксидисмутази (SOD), каталази (CAT) и гваякол пероксидази (POD) в *Cuscuta campestris*, паразитираща *Arabidopsis* при нарастващи солеви концентрации. Колоните показват средни стойности +/- SEM (n = 5). Различните букви показват значими разлики (P < 0.05), Tukey's post-hoc test. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2018) Plant Physiology and Biochemistry. 132: 408-414.)

Въпреки че не е в пряк контакт с почвата, излагането на растението гостоприемник на засоляване също води до значителни промени в концентрациите на L-Pro и активността на CAT и POD в паразитното растение (**Фиг. 41**). Всички промени, предизвикани от солевата концентрация, с изключение на SOD, са статистически значими според еднофакторна ANOVA (**Таблица 10**). Допълнително е изследвано натрупването на L-пролин (**Фиг 42**) в *Cuscuta campestris* и *Cuscuta europaea* върху толерантен (*Thellungiella salsuginea*) и чувствителен (*Arabidopsis thaliana*) на сол гостоприемници. Приложена е концентрация от 300 mM NaCl, която е суб-летална за *Arabidopsis* и инхибира почти напълно растежа, но не повлиява значително *Thellungiella* (Ghars et al. 2008).

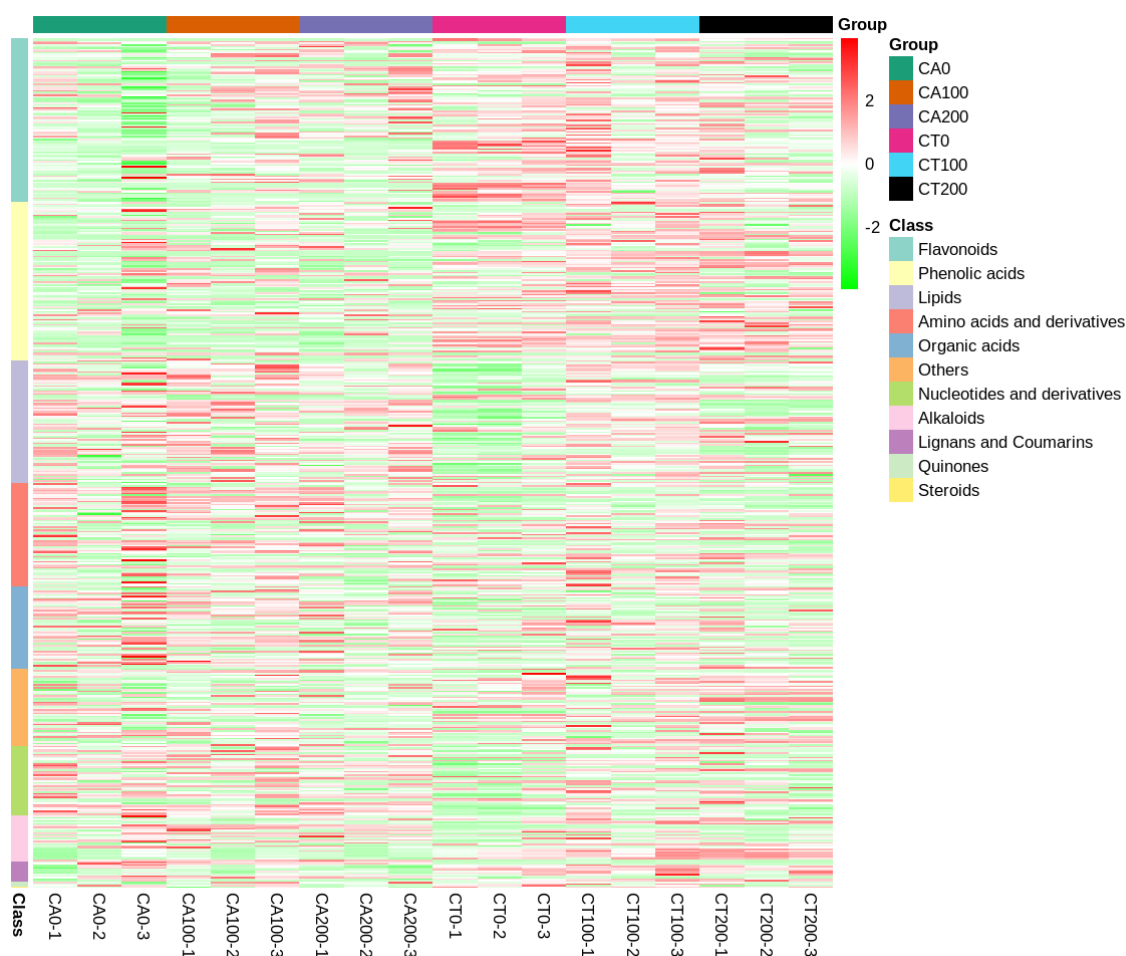
4.3.2 Влияние на засоляването върху метаболома

Изследванията са проведени върху моделната двойка растения *Arabidopsis thaliana* (гликофит) и *Eutrema salsugineum* (халофит = *Thellungiella salsuginea*), третирани с 0, 100 и 200 mM NaCl и заразени с *Cuscuta chinensis*. Проведен е насочен метаболитен анализ на паразитното растение посредством UPLC-MS/MS анализ. Детектирани са общо 538 метаболита които са разпределени както следва: 1) флавоноиди - 104; алкалоиди – 29; лигнани и кумарини – 13; фенолни киселини – 100; липиди – 78; аминокиселини и техни деривати – 65; хинони – 3; органични киселини – 104; нуклеотиди и техни деривати – 88; стероиди – 1; други – 64. Диференциално натрупаните метаболити между отделните третираня са сравнително малко на брой (**Таблица 11**). Наблюдават се две основни тенденции – сравнително малко диференциални метаболити между солевите третираня при един и същи гостоприемник, от порядъка на 10-20 при *Arabidopsis* (CA) и между 20 и 60 при *Thellungiella* (CT), но значително по-голям брой, между 160 и 180 между различни гостоприемници при едно и също солево третиране.

Таблица 11 Диференциални метаболити (повишено или понижено количество) при *Cuscuta chinensis* върху гостоприемник *Arabidopsis* (CA) и *Thellungiella* (CT), третирани с 0, 100 и 200 mM NaCl.

group name	All sig diff	down regulated	up regulated
CA0_vs_CA100	21	12	9
CA0_vs_CA200	19	9	10
CA100_vs_CA200	13	8	5
CA0_vs_CT0	181	93	88
CA100_vs_CT100	168	68	100
CA200_vs_CT200	166	73	93
CT0_vs_CT100	55	20	35
CT0_vs_CT200	57	26	31
CT100_vs_CT200	24	17	7

От получените резултати може да се заключи, че влиянието на гостоприемника, дори при близко-родствени видове върху метаболитния профил на паразитното растение е значително. Метаболитният профил, обаче, може и в значителна степен да зависи от условията на околната среда (Ye et al. 2002), което е валидно в особена степен за флавоноидите при *C. chinensis* и се наблюдава чрез влиянието на засоляването върху този профил. Тази тенденция личи от PCA анализа (Фиг. 43) и клъстерния анализ (Фиг. 44).



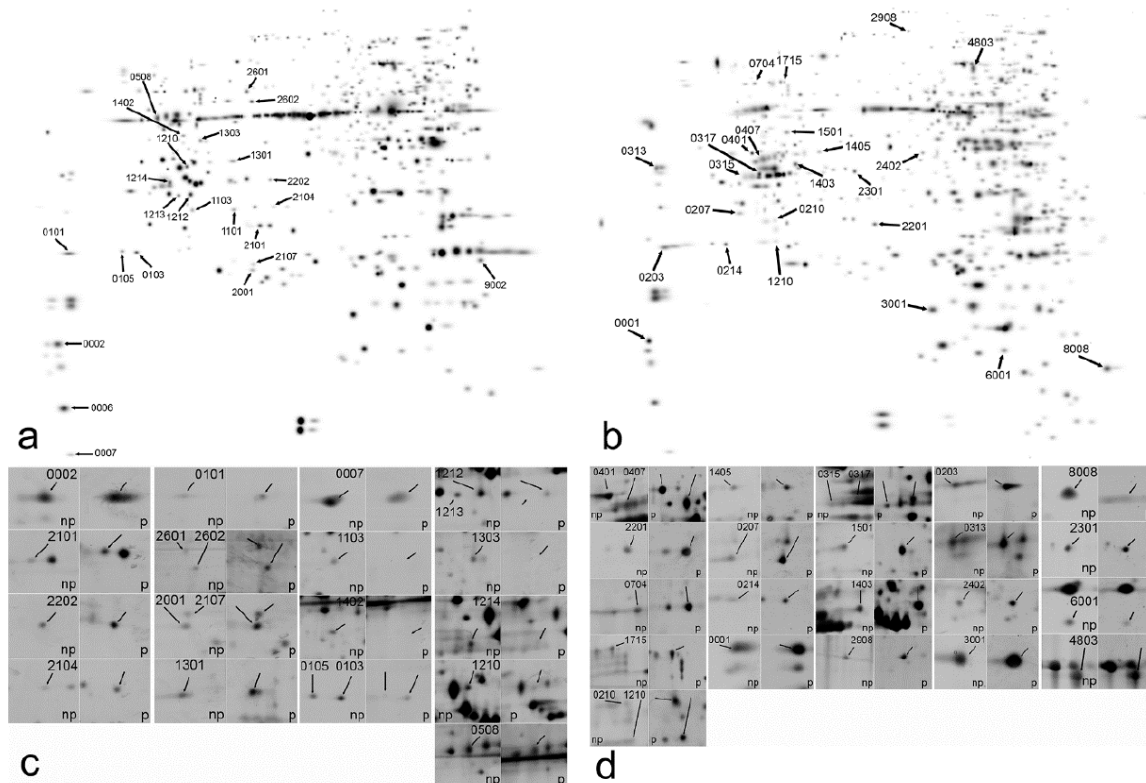
Фигура 44. Heat map на кластерен анализ на отделните групи метаболити с разпределение между пробите в *Cuscuta chinensis* върху гостоприемници *Arabidopsis* (CA) и *Thellungiella* (CT) при 0, 100 и 200 mM NaCl.

Диференциалните метаболити между отделните проби са приложени в допълнителни **Таблицы s4.3.2.1-9**. Сравнителен анализ между групите – брой диференциални метаболити между различни солеви концентрации при единия гостоприемник в сравнение с брой диференциални метаболити между различни солеви концентрации при другия гостоприемник са представени като Venn-диаграми (**Фиг. 45**).

4.4 Влияние на паразитизма на *Cuscuta* върху метаболизма на гостоприемника и почвените микробиосообщества

4.4.1 Влияние на паразитизма на *Cuscuta* върху протеома на гостоприемника

Промени в протеома на гостоприемника са изследвани в *Arabidopsis thaliana*, инфектиран с *Cuscuta australis*. Диференцираното количество белтъци е оценено чрез двумерна полиакриламидна гел-електрофореза, отделно в стъблото и листата на растенията-гостоприемници (**Фиг. 46 a,b** и допълнителни **Фигури s4.4.1.1-4**). Общо 21 белтъчни петна в листа и 24 белтъчни петна в стъбло показват увеличение или намаление ≥ 2.5 пъти (**Фиг. 47**).



Фигура 46. PDQuest master gel изображения 2D-електрофореграми на листа (a) и стъбло (b) на *Arabidopsis* и съответните диференциално регулирани белтъчни петна (c и d). *Arabidopsis* е заразен (p) или не-паразитиран (np) от *Cuscuta australis*. Номерата на белтъчните петна съответстват на автоматично зададените от PDQuest. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2022) Plants. 11, 2904).

Общо пет белтъчни петна в листата и две в стъблото не са идентифицирани. От идентифицираните белтъчни петна (**Таблицы s4.4.1.1** и **s4.4.1.2**), един белтък е открит в общо четири понижени петна в листата: глицералдеhid-3-фосфат дехидрогеназа (SSP 1210, 1212, 1213 и 1303). Един белтък е открит в две белтъчни петна с повишена експресия в стъблото: Atmp 24.1 глутатион S трансфераза (SSP 2201 и 3001), но също така две изоформи на аспартат аминотрансфераза са открити в две петна с повишена експресия

(SSP 0315 и 1403). Хлоропластната транскетолаза 1 е открита в петна с повишена регулация както в листата, така и в стъблото (SSP 2601 и 1715, съответно), а хлоропластната фосфорibuлокиназа е открита в петна с понижена регулация както в листата, така и в стъблото (SSP 0508 и 8008, съответно). Член на семейството на глицин сръзвач Т-протеин е открит в петно с понижена регулация в листата (SSP 0105) и петно с повишена регулация в стъблото (SSP 0407). Според анотацията към биологичен процес на генната онтология (GO) белтъците, свързани с различни видове стрес, включително биотичен (отговор на бактериални патогени) и абиотичен (засоляване, студ, тежки метали), са равномерно разпределени както между петната с повишена, така и с понижена регулация (**Таблицы s4.4.1.1 и s4.4.1.2**). Значителна част от тях обаче са свързани или с фотосинтезата, или с въглехидратния метаболизъм.

4.4.2. Влияние върху фотосинтетичната активност на гостоприемника

За установяване на този ефект са проведени два типа експерименти. В единият експеримент моделното растение *Arabidopsis thaliana* е подложено на паразитизъм от *Cuscuta australis*. След 72 часа от установяването на инфекция, документирано чрез формиране на хаустория макроскопски и микроскопски (**Фиг. 48**) се наблюдава значително намаляване на повечето фотосинтетични параметри в гостоприемника (**Таблица 12**). Забележително е близо двукратното намаляване в съдържанието на хлорофил, както и статистически значимо намаляване на P_n , g_s и T_r . Промените в C_i не са статистически значими, но следват тенденцията на намаление.

Таблица 12 Ефект на паразитизма върху съдържанието на хлорофил и фотосинтетичните характеристики на гостоприемника. Данните са показани като средни стойности \pm стандартна грешка ($n = 6$). Различни малки букви показват статистически значима (Student's T-test) разлика между заразени и не-паразитирани растения. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2022) *Plants*. 11, 2904)

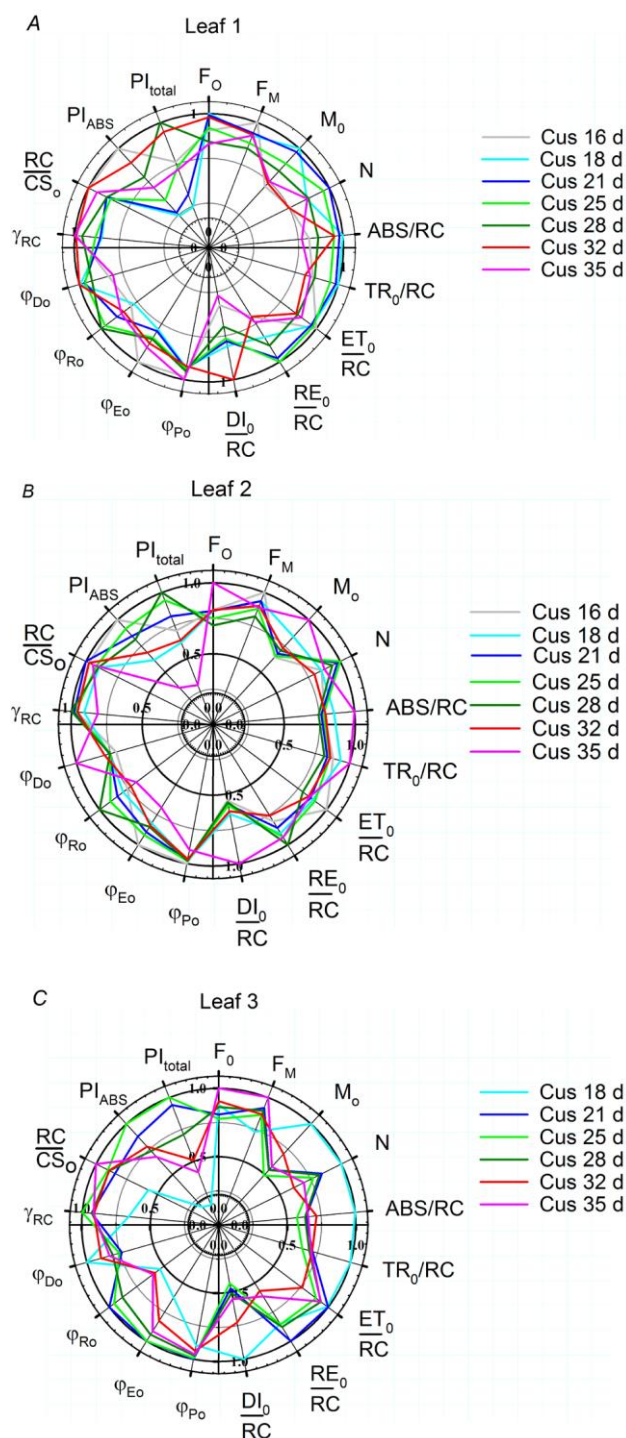
	Non-parasitized	Parasitized
Photosynthetic rate (P_n) / ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3.61 \pm 0.73a	2.71 \pm 0.33b
Stomatal conductance (g_s) / ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0.19 \pm 0.05a	0.12 \pm 0.01b
Concentration of intercellular CO ₂ (C_i) / ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	305.66 \pm 1.34a	301.58 \pm 6.23a
Transpiration rate (T_s) / ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3.30 \pm 0.74a	2.31 \pm 0.097b
Relative chlorophyll content	17.51 \pm 2.06a	8.79 \pm 1.96b

Във втората група експерименти като гостоприемник за *Cuscuta campestris* е използван несъвместимия гостоприемник *Ipomoea tricolor* Cav. (Solanales, Convolvulaceae). Въпреки че при този гостоприемник се получава успешна инфекция и формиране на хаустории (**Фиг. 49**), последващото развитие на паразитното растение е бавно.

Разликите във формата на индукционните криви на флуоресценция на хлорофил във характеристичните фази се проявяват като специфични пикове в диференциалните криви, показани на допълнителни **Фигури s4.2.2.1-4**. О, J, I и P характеристичните етапи на флуоресценцията на Chl a са използвани за изчисление на 17 параметъра на JIP-теста (**Фиг. 50**) и структурните и функционални промени във фотосинтетичния апарат. Параметрите на JIP-теста осигуряват по-добра визуализация на ефектите на инфекцията с *C. campestris* върху листата на *I. tricolor* от различна възраст (L1, L2 и L3).

И при трите вида листа параметрите индекс на производителност на PSII (PI_{ABS}) и индекс на производителност на двете фотосистеми (PI_{total}) са много чувствителни към

инфекцията с *C. campestris*. При най-възрастните листа L1 и L2 се наблюдава известна инактивация - стойностите на PI_{ABS} намаляват в сравнение с 16-ия ден. Реакциите на L3 към инфекцията са обратни, т.е. увеличават се стойностите в сравнение с първото измерване на 18-ия ден, което означава активиране на PSII в присъствието на паразита. PI_{total} показва известно активиране на PSI вследствие на инфекцията - на 28 и 32 ден за L1, на 21-28 ден за L2 и на 21 и 25 ден за L3.



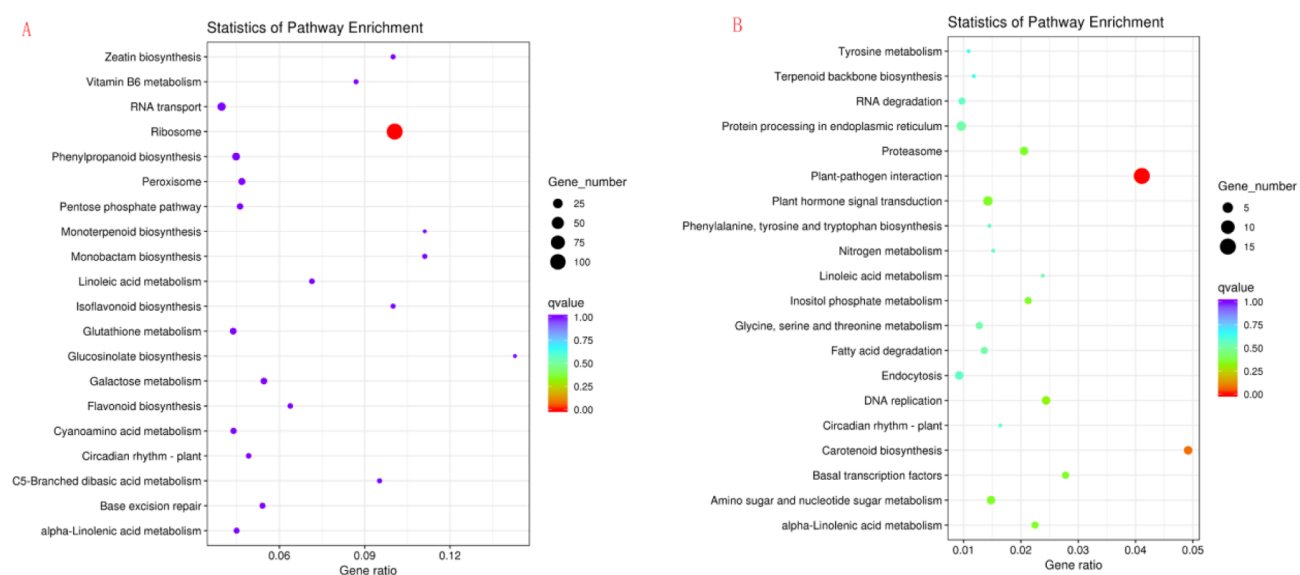
Фигура 50. Параметри на JIP-теста в листа на различна възраст (L1, L2 и L3), изчислени от кривите на индукция на бързата флуоресценция на Chl а като съотношение между стойността на параметъра за *Ipotoea tricolor*, заразени с *Cuscuta campestris*, и стойността на същия параметър в същия ден за контролните растения. Така получените съотношения за определен параметър са нормализирани към максималната стойност на този параметър. (Публикувана в Zagorchev L. et. al. (2020) Photosynthetica. 58 (SI): 237-247.

4.4.3. Влияние върху транскриптома на гостоприемника

Транскриптомният анализ първоначално е извършен на растения *Trifolium repens*, заразени с *Cuscuta australis*. Нормализираните стойности на унигени са използвани за

анализ на диференциална експресия с праг от \log_2 (пъти промяна) > 1 и $p < 0.05$ (Love et al. 2014). Идентифицирани са 1 601 диференциално експресирани гени (DEG) между заразен и контролен гостоприемник, от които 945 DEG с повишена експресия и 656 DEG с понижена експресия. За установяване на функцията са проведени GO и KEGG анализи на обогатяване (Фиг. 51 и 52).

DEG с повишена експресия от категория биологични процеси са такива за метаболитни процеси на азотни съединения (GO:0006807), клетъчни метаболитни процеси на азотни съединения (GO:0034641) и биосинтетични процеси (GO:0009058). Сред молекулните функции DEG с повишена експресия са свързани главно с активността на структурни молекули (GO:0005198), структурна част на рибозома (GO:0003735) и оксидоредуктазна активност (GO:0016491). Анализът на KEGG пътищата показва, че 105-те DEG с повишена експресия между заразен и контролен гостоприемник са значително обогатени за гени в пътя на рибозомите (ko03010; Фиг. 52А), докато 15-те DEG с понижена експресия са значително обогатени за гени от пътя на взаимодействието между растенията и патогените (ko04626; Фиг. 52В).



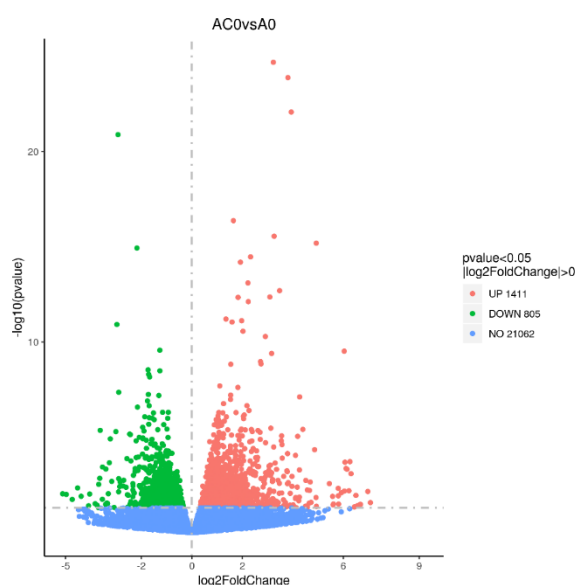
Фигура 52. Обогатени диференциално експресирани гени (DEG) между заразени (P) и непаразитирани (СК) гостоприемници на база на анализ на Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) пътища. (A) DEG с повишена експресия. (B) DEG с понижена експресия. (Публикувана в Zhou L. et al. (2021) *Scientia Horticulturae*. 289. 110458)

Функционалната анотация на гените показва, че 15 DEG с понижена експресия попадат в специфична категория на взаимодействие между растенията и патогените, включително CML, CALM, CNGF, RPM1 (RPS3), EDS1, FLS2 и PR1 (Таблица 13). Освен това 1224 от DEG са анотирани като транскрипционни фактори и съответстват на различни семейства транскрипционни фактори. Най-силно представените семейства транскрипционни фактори са MYB, WRKY и bHLH, съответно с 89, 61 и 58 гена (Фиг. 53).

Таблица 13. Диференциално експресирани гени (DEG), обогатени в пътища на взаимодействие между растенията и патогени в отговор на паразитизъм на *Cuscuta australis*. (Публикувана в Zhou L. et al. (2021) *Scientia Horticulturae*. 289. 110458)

Gene ID	KO ID	KO Name	Gene Annotation
Cluster-16854.14882	K13448	CML	calcium-binding protein CML
Cluster-16854.18259	K02183	CALM	calmodulin
Cluster-16854.7818	K05391	CNGF	cyclic nucleotide gated channel
Cluster-34712.0	K05391	CNGF	cyclic nucleotide gated channel
Cluster-16854.9195	K05391	CNGF	cyclic nucleotide gated channel
Cluster-35121.0	K13457	RPM1, RPS3	disease resistance protein RPM1
Cluster-16854.8014	K13457	RPM1, RPS3	disease resistance protein RPM1
Cluster-16854.8015	K13457	RPM1, RPS3	disease resistance protein RPM1
Cluster-16854.8017	K13457	RPM1, RPS3	disease resistance protein RPM1
Cluster-16854.8021	K13457	RPM1, RPS3	disease resistance protein RPM1
Cluster-16854.7230	K18875	EDS1	enhanced disease susceptibility 1 protein
Cluster-16854.7576	K13420	FLS2	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2
Cluster-16854.7583	K13420	FLS2	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2
Cluster-16854.6611	K13420	FLS2	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2
Cluster-16854.12166	K13449	PR1	pathogenesis-related protein 1

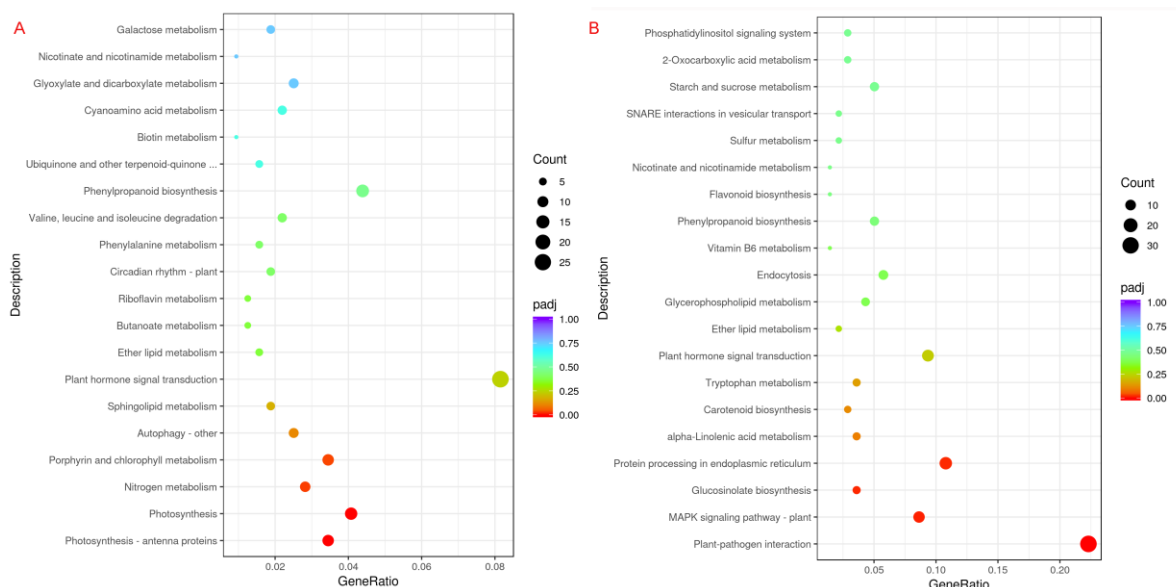
Подобен анализ е направен и в *Arabidopsis*, заразен с *Cuscuta chinensis*, като са установени 2 216 DEG, от които 1 411 с повишена експресия и 805 с понижена експресия (Фиг. 54).



Фигура 54. Диференциално експресирани гени в заразен (AC0) спрямо непаразитиран (A0) *Arabidopsis*.

GO (Фиг. 55) и KEGG (Фиг. 56) анализът показват значително различаващи се резултати от предишния случай. Най-големият брой DEG с повишена експресия между заразен и контролен гостоприемник са значително обогатени за гени, участващи в сигнална трансдукция на хормонални стимули, биосинтезата на хлорофил и светлинната фаза на фотосинтеза (Фиг. 56A), докато основните DEG с понижена експресия са значително

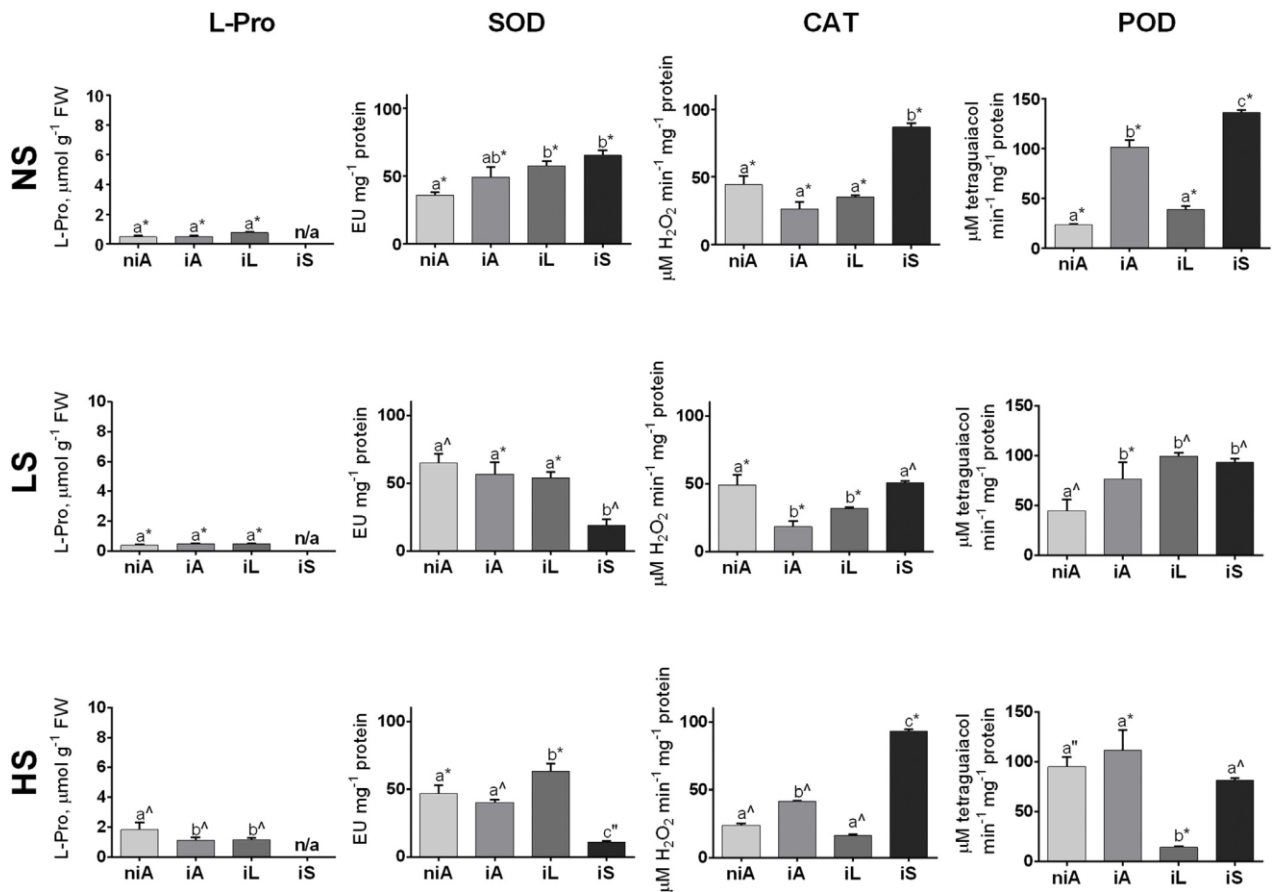
обогадени за гени от пътя на взаимодействието между растенията и патогените (ko04626; Фиг. 56B).



Фигура 56. KEGG анализ на диференциално експресирани гени в заразен (AC0) спрямо непаразитиран (A0) *Arabidopsis*.

4.4.4 Интерфериране с отговора на абиотичен стрес

Влиянието на инфекцията с *C. campestris* върху четирите изследвани биохимични параметри в надземните тъкани на гостоприемника е в зависимост от разстоянието до инфекцията (Фиг. 57). Концентрациите на L-пролин са измерени поотделно в незаразен *Arabidopsis* (niA), незаразени листа на заразени растения *Arabidopsis* (iA) и заразени листа (iL), докато активността на SOD, CAT и POD е допълнително измерена в зоната на образуване на хаусториите, тоест мястото на инфекция (iS). Наблюдава се леко увеличение в концентрацията на L-Pro в заразените *Arabidopsis* (Фиг. 57), което обаче е незначително (ANOVA, Таблица 14). За разлика от L-Pro, активността и на трите антиоксидантни ензими се увеличават значително към мястото на инфекцията (iS > iL > iA > niA). ANOVA анализът показва, че ензимните активности във връзка с инфекцията като цяло са по-значителни в iS, отколкото в iL и незначителни в неинфектираните листа на заразените *Arabidopsis* (Таблица 14).



Фигура 57. Концентрация на L-пролин (L-Pro), активност на супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и гваякол пероксидаза (POD) в листа на незаразени растения от *Arabidopsis* (niA), незаразени листа на инфекциран *Arabidopsis* (iA), инфекцирани листа (iL) и мястото на инфекцията (iS) при контролно (NS), ниско солено (LS) и високо солено (HS) третиране. Колоните представляват средни стойности \pm SEM (n=5). Различните букви означават значими разлики при $P < 0.05$ в рамките на панела, Tukey's post-hoc тест. Различни символи показват значими разлики при $P < 0.05$ между различните третираня със сол на един и същ тип проба, Tukey's post-hoc тест. (Публикувана в Zagorchev L. et. al. (2018) *Plant Physiology and Biochemistry*. 132: 408-414.)

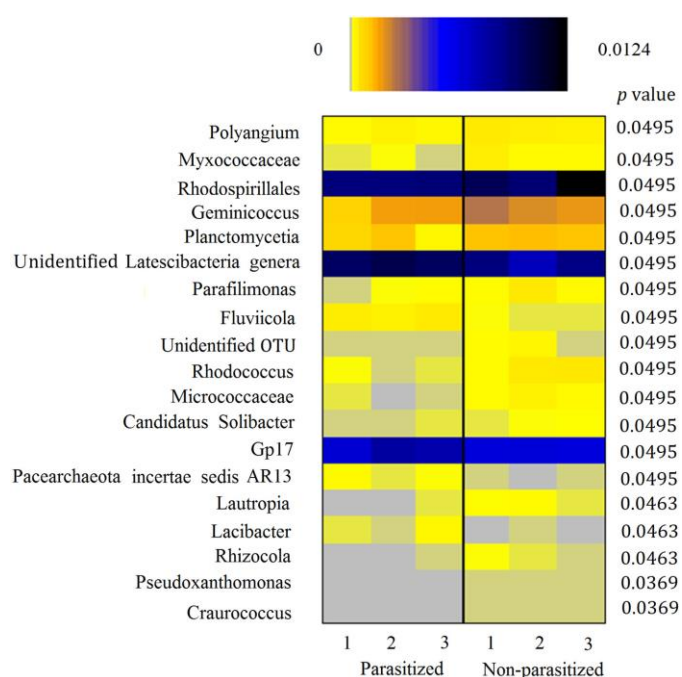
Ефектът от паразитизма на *C. campestris* върху натрупването на L-Pro и активността на антиоксидантните ензими в корените на заразени *Arabidopsis* е представен на **Фигура 58**. И четирите маркера за стрес се увеличават при NS при заразените растения. Тази тенденция се запазва за CAT и SOD при засоляване (**Фиг. 58**), докато концентрацията на L-Pro и активността на POD при заразените растения е по-ниска в сравнение с незаразените както при третиране с LS, така и при третиране с HS.

4.4.5. Влияние върху почвените съобщества

4.4.5.1 Метагеномен анализ на почвени съобщества

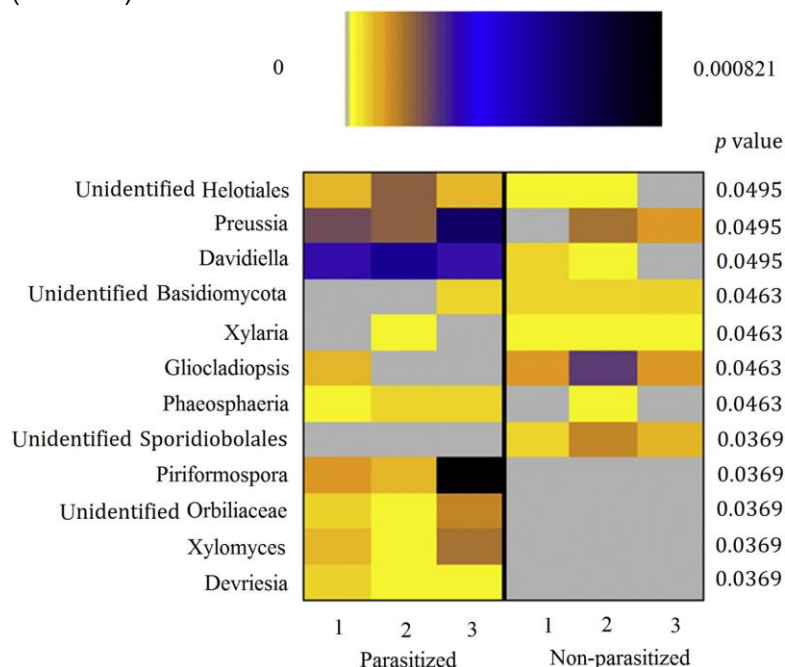
Ефективните оперативни таксономични единици OTU, оценката на Chao 1 и индекса на Shannon на почвените бактериални и гъбни съобщества на *Alternanthera philoxeroides*, инфекцирана или не с *C. australis* са представени в **Таблица 15**. Паразитизмът не повлиява значимо относителното количество на основните бактериални родове и класове в ризосферната почва на *A. philoxeroides* (**Фиг. 59**). Въпреки това паразитизмът значително увеличава относителната численост на Acidobacteria Gp4 и Acidobacteria Gp9 на ниво разред в ризосферната почва. Паразитизмът значително намалява относителното количество на OTU от бактериалните родове Rhizocola, Pseudoxanthomonas и Craugococcus,

докато увеличава броя на Rhodospirillales, Latescibacteria и неидентифицирани родове (Фиг. 60).



Фигура 60. Heatmap, показваща значимите разлики ($P < 0.05$) в количеството на бактериални таксони в ризосферната почва на *Alternanthera philoxeroides* между паразитирани и непаразитирани растения. Различните цветове показват относително количество на различните OTU (%). (Публикувана в Yang B. et al. (2019) Applied Soil Ecology. 143: 1-9.)

Подобно, паразитизмът не повлиява значимо относителното количество на основните гъбни родове и класове в ризосферната почва на *A. philoxeroides* (Фиг. 61), но значително увеличава относителното изобилие на Trichosphaeriales на ниво разред. Паразитизмът значително намалява количеството на гъбните родове Piriformospora, Orbiliaceae, Xylomyces и Devriesia, докато увеличава броя на Helotiales, Preussia и Davidiella (Фиг. 62).

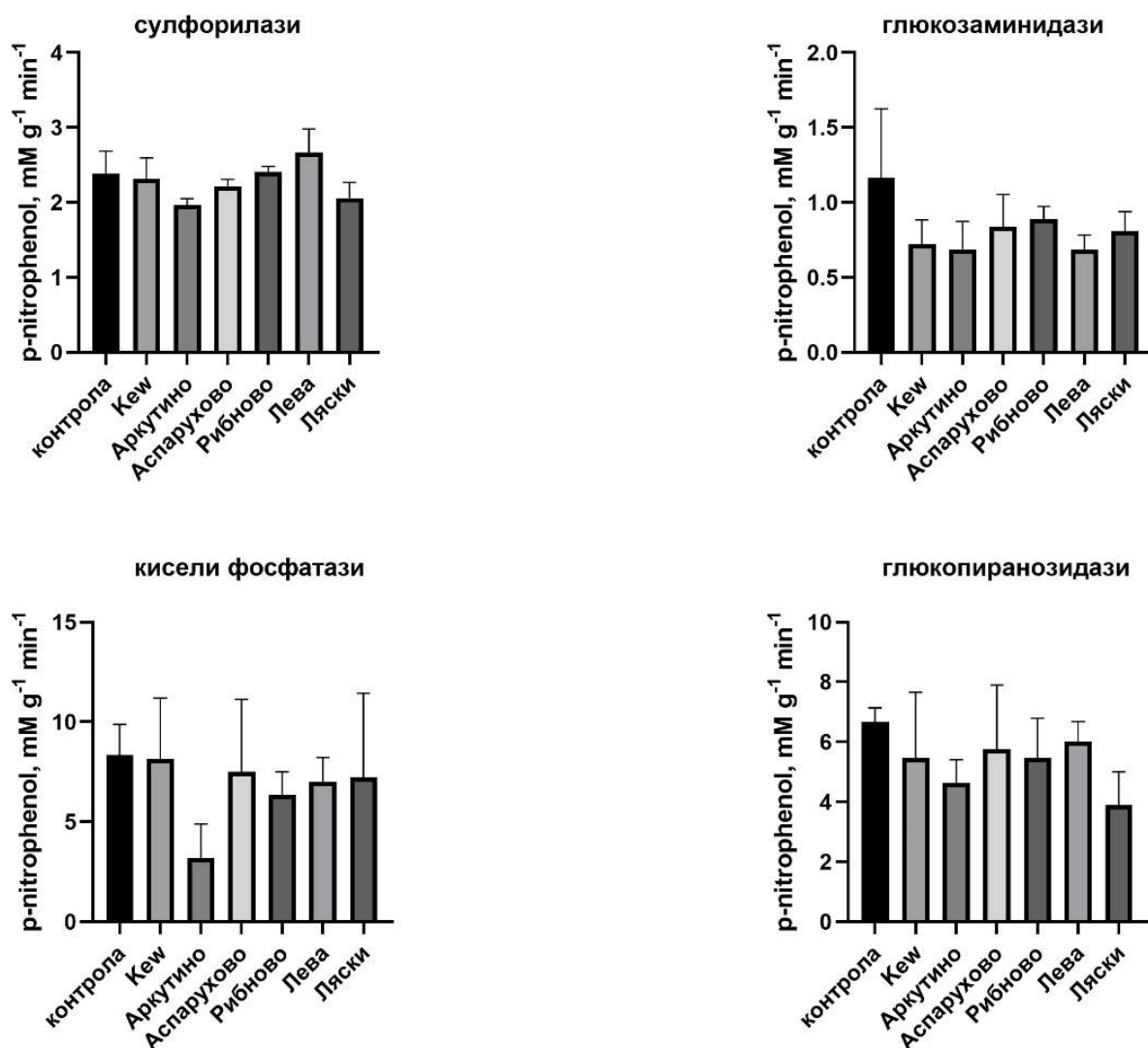


Фигура 62. Heatmap, показваща значимите разлики ($P < 0.05$) в количеството на гъбните таксони в ризосферната почва на *Alternanthera philoxeroides* между паразитирани и непаразитирани растения. Различните цветове показват относително количество на различните OTU (%). (Публикувана в Yang B. et al. (2019) Applied Soil Ecology. 143: 1-9.)

4.4.5.2 Анализ на почвените ензими

Изследвани са четири почвени ензима с цел оценка на влиянието на паразитното растение върху качествата на почвата - сулфорилази, глюкозаминидази, кисели фосфатази и бета-глюкозидази в почва, на която са отглеждани *C. campestris* от различни популации

върху гостоприемник *Medicago sativa* в лабораторни условия. Активностите на ензимите са представени на **Фигура 64**.



Фигура 64. Активности на почвени ензими в ризосферната област на *Medicago sativa*, заразен с *Cuscuta campestris* от различни популации. (Използвана в дипломна работа на Александра Атанасова, ОКС Магистър, 2022)

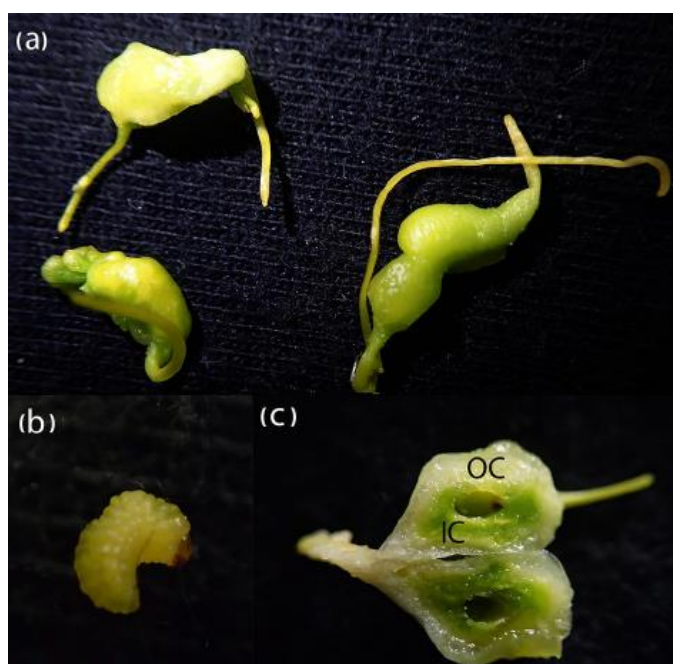
Наблюдава се тенденция към намаляване на активността и на четирите ензима, което води до по-слаб обмен на органична материя и минерали в почвата и оттам – до по-малка достъпност на фосфати, сулфати и азотни съединения, което безспорно е негативен ефект. Наблюдаваните разлики между популациите изглежда са свързани със свежата маса на паразитното растение (**Фиг. 63**). Корелацията е обратно-пропорционална – най-ниски активности се наблюдават при най-слабо развитие на паразита.

4.5 Взаимодействие на двойката паразит-гостоприемник с други биотични фактори

4.5.1 Епипаразитни галообразуващи твърдокрили от род *Smicronyx*

Ларвите на *Smicronyx* spp. предизвикват образуването на характерни сферични гали (Zhekova et al. 2014). Гали на *Smicronyx* sp. са установени в около 10% от популациите на *C. campestris* но не са установени при други видове от рода, нито върху растенията-

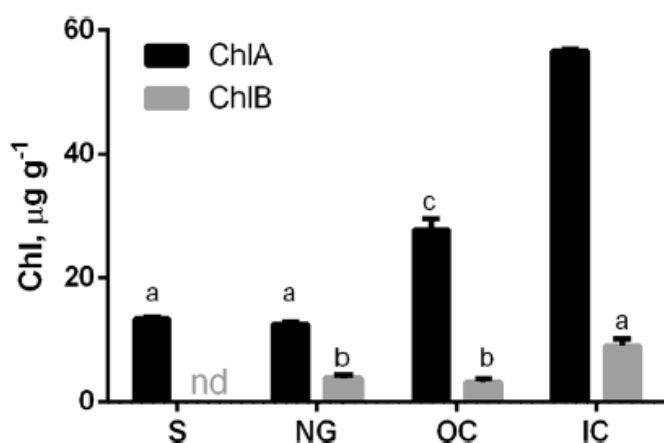
гостоприемници. Средният размер на галите е 1,5-2,5 cm дължина и 0,5-0,8 cm широчина, обикновено фузиформни според морфотипа, обобщен по Isaias et al. (Isaias et al. 2013) или с неправилна форма (Фиг. 65 a) с ларва вътре (Фиг. 65 b).



Фигура 65. Гали на *Smicronyx* (a) и ларва (b), установени върху *Cuscuta campestris*. Напречен пререз (c) разкрива два различни слоя около ларвата, зеленикав вътрешен кортекс (IC) и бледо-жълтеникав външен кортекс (OC). (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2018) *Planta*. 248 (3): 591-599)

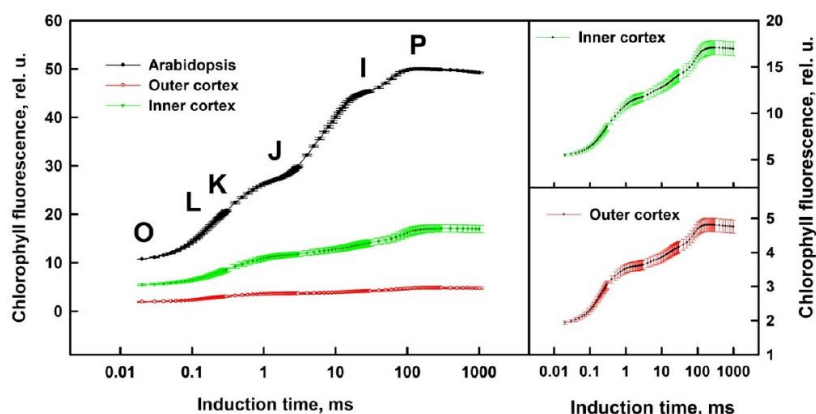
4.5.1.1 Фотосинтетична активност в галите

Напречен пререз на галите разкрива две отделни области - зеленикав вътрешен кортекс около ларвата и бледо-жълт външен кортекс (Фиг. 65). Концентрацията на хлорофил е значително по-висока в галите в сравнение със стъблото (Фиг. 66).



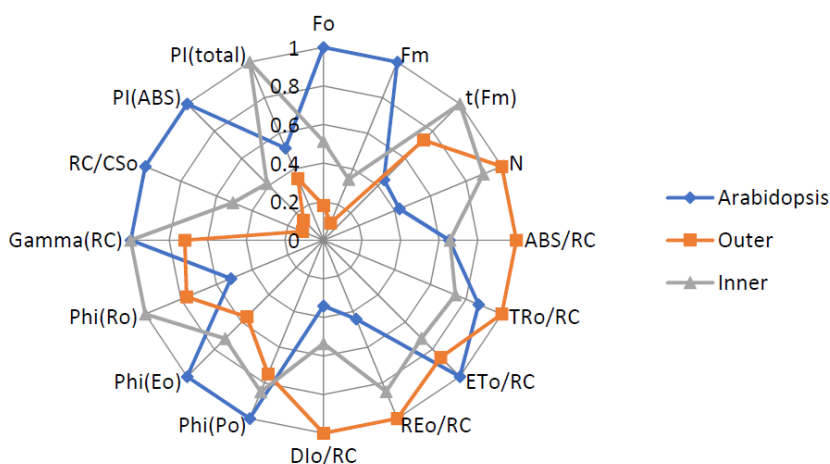
Фигура 66. Концентрация на хлорофил А и хлорофил В в неинфектирани стъбла на *Cuscuta campestris* (S), стъбла до 5 mm от галите (NG), външен кортекс (OC) и вътрешен кортекс (IC) на галите. Nd – не се детектира. Различните букви показват статистически значими разлики при $P < 0.05$, Student's t-test. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2018) *Planta*. 248 (3): 591-599)

Фотосинтетичната способност на галите е изследвана в сравнение с моделно растение – *Arabidopsis thaliana* чрез OJIP-тест. Индукционните криви показват значително по-ниска флуоресценция на галите, особено във външния кортекс (Фиг. 67). Диференциалните криви са представени на Фиг. 68.



Фигура 67. Индукционни криви, записани за вътрешен и външен кортекс на гали на *Smicronix* и в листата на референтно фотосинтетично растение *A. thaliana* (усреднени от седем повторения). Бързата флуоресценция на двата кортекса на галите е измерена на около 2 mm дебели срези. IC за вътрешния кортекс са представени горе вдясно и на външния кортекс долу вдясно. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2021), *Cells*, 10, 1399)

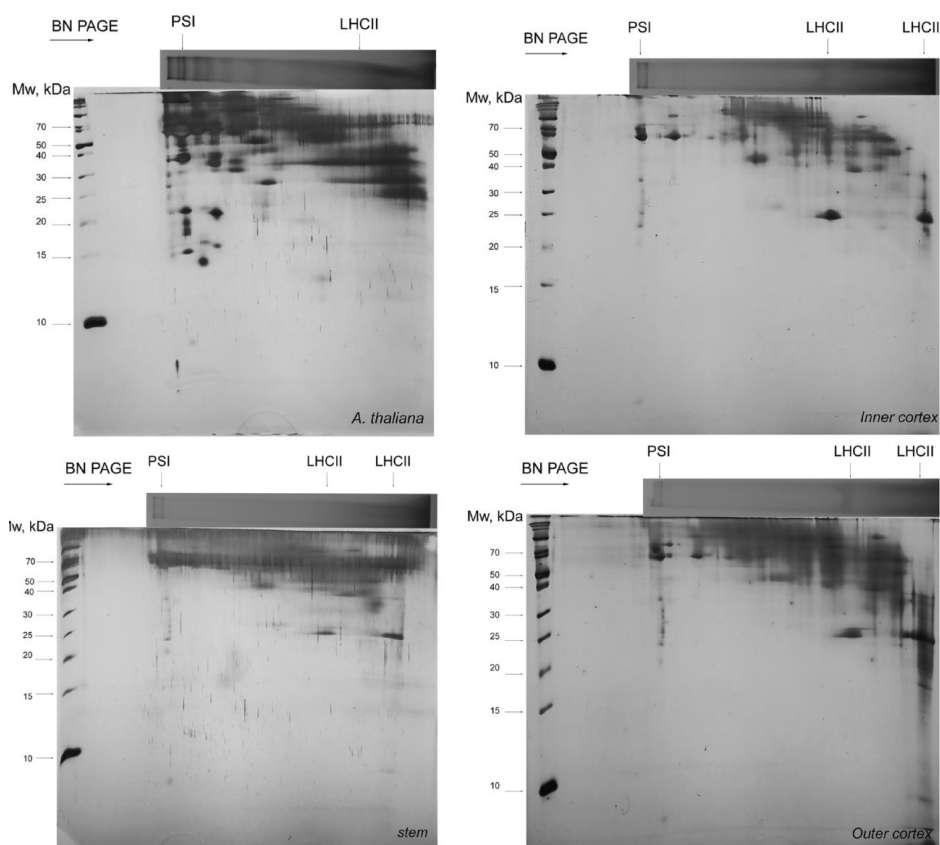
Параметрите на JIP-теста осигуряват по-добра визуализация на разликите между *Smicronix* и референтното растение *A. thaliana* (Фиг. 69).



Фигура 69. Паяжинена диаграма на 16 JIP-тест параметъра, изчислени от индукционните криви на бързата Chl A флуоресценция във външния и вътрешния кортекс на галите и в листа на *Arabidopsis*. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2021), *Cells*, 10, 1399)

По-ниските стойности на минималната и максималната флуоресценция (параметри F_o и F_m) във вътрешния и външния кортекс в сравнение с листата на *A. thaliana* са резултат от ниската плътност на фотосинтетичните структури (RC/CSo). За разлика от PSII, PSI функционира по-ефективно в галите (особено във външния кортекс), отколкото в *A. thaliana*. Като цяло преносът на енергия към RC в галите значително надвишава преноса на енергия в *A. thaliana*, т.е. PSA в нормално фотосинтезиращо растение работи оптимално, но не е оптимизиран в галите на *Smicronix*. Голяма част от енергията на възбуждане в галите се разсейва като топлина от реакционните центрове на PSII, особено във външната кора. За да се изясни допълнително фотосинтетичния механизъм на галите на *Smicronix* тилакоидните комплекси са разтворени с дигитонин и разделени с двумерна електрофореза BN-PAGE електрофореза (Фиг. 70). Очевидно е, че броят на комплексите е по-малък при *S.*

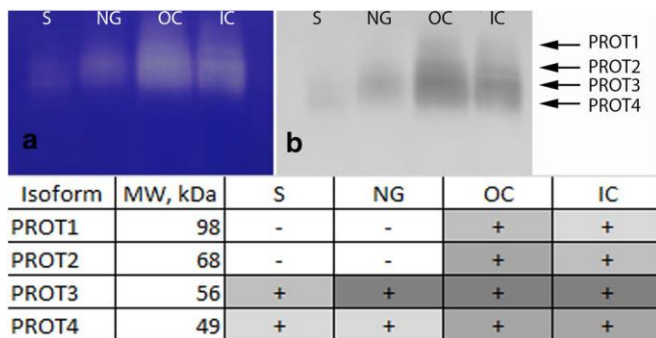
campestris, отколкото при *A. thaliana*. В *C. campestris* са установени поне PSI и LHCII, но повечето от другите комплекси, идентифицирани в *A. thaliana*, отсъстват.



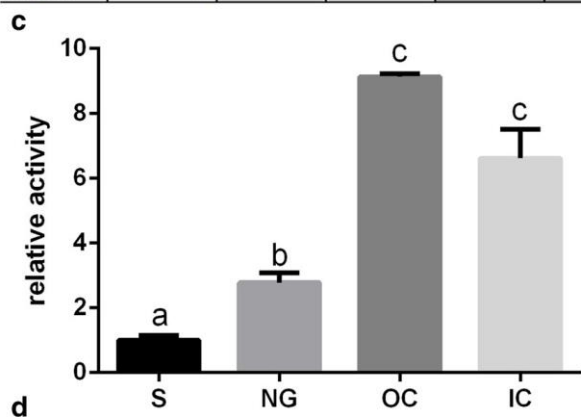
Фигура 70. 2D BN/SDS PAGE разделяне на тилакоидни комплекси на *Arabidopsis thaliana*, стъбло на *Cuscuta campestris* и гали на *Smicronyx* (вътрешен и външен кортекс). Разтваряне с 1% дигитонин. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2021), *Cells*, 10, 1399)

4.5.1.2 Зимограми на ензимни активности

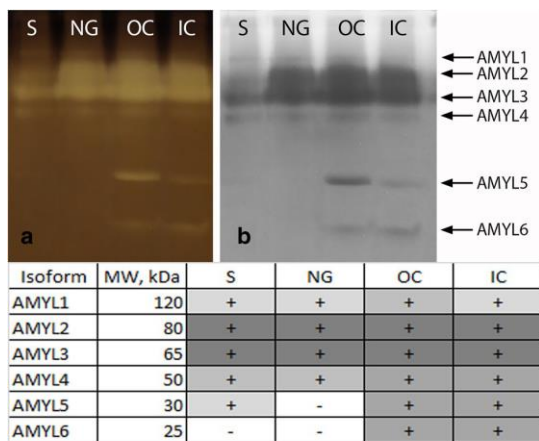
Зимограмите на протеазна и амилазна активност са представени на **Фиг. 71** и **72**. Комбинираната активност на протеази в галите спрямо незаразените стъбла на базата на комбинираната площ на пиковите на всички изоформи се увеличава постепенно с почти десетократно увеличение във външния кортекс, но малко по-ниска във вътрешния кортекс (**Фиг. 71 d**).



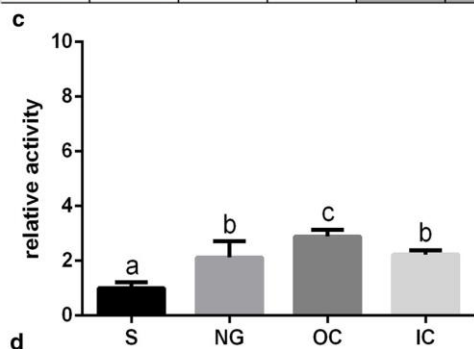
Фигура 71. Протеазни (PROT) изоформи и относителна активност при незаразени стъбла на *Cuscuta campestris* (S), в близост до галите (NG), външен кортекс (OC) и вътрешен кортекс (IC) на галата. a-оригинална зимограма; b-софтуерно обработена с-молекулно тегло в kDa и относителна активност на изоформите на PROT. Различните букви показват значимост при $P < 0,05$, Student's t-тест (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2018) *Planta*. 248 (3): 591-599)



Открити са шест изоформи на α -амилаза, от които четири, AMYL1-4 с молекулно тегло от 50 до 120 kDa са представени във всички изследвани проби и с подобна хидролитична активност спрямо скорбяла (Фиг. 72 а-с). Две α -амилазни изоформи с пониско молекулно тегло, AMYL5 и AMYL6 са представени само във вътрешния и външен кортекс (Фиг. 72 а, b). AMYL5 (Mw 30 kDa) е представена също в незаразените стъбла, но сяко изразена по-висока активност във външния кортекс (Фиг. 72 с).

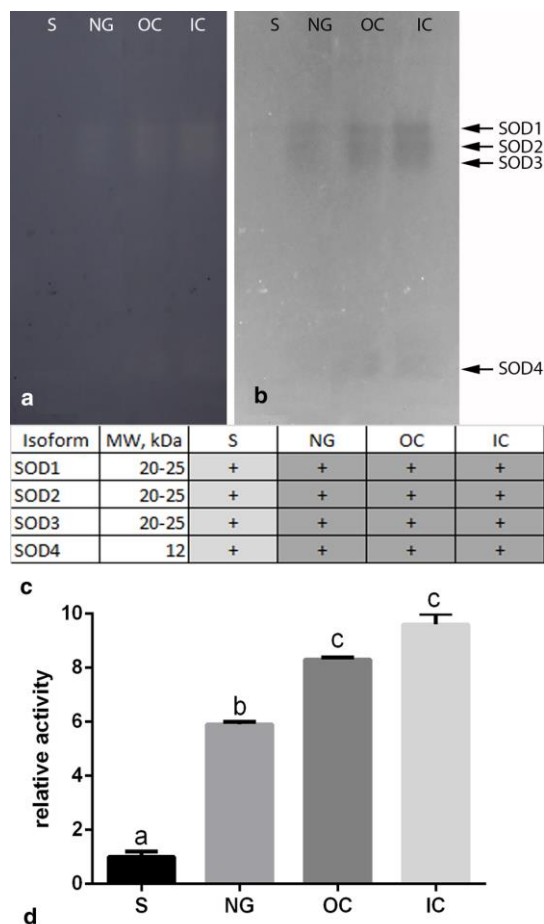


Фигура 72. Амилазни (AMYL) изоформи и относителна активност при незаразени стъбла на *Cuscuta campestris* (S), в близост до галите (NG), външен кортекс (OC) и вътрешен кортекс (IC) на галата. a-оригинална зимограма; b-софтуерно обработена с-молекулно тегло в kDa и относителна активност на изоформите на AMYL. Различните букви показват значимост при $P < 0,05$, Student's t-тест (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2018) *Planta*. 248 (3): 591-599)



Петте изследвани антиоксидантни ензими (Фиг. 73-77) могат да бъдат разделени на две групи в зависимост от това дали активността се увеличава или намалява в галите.

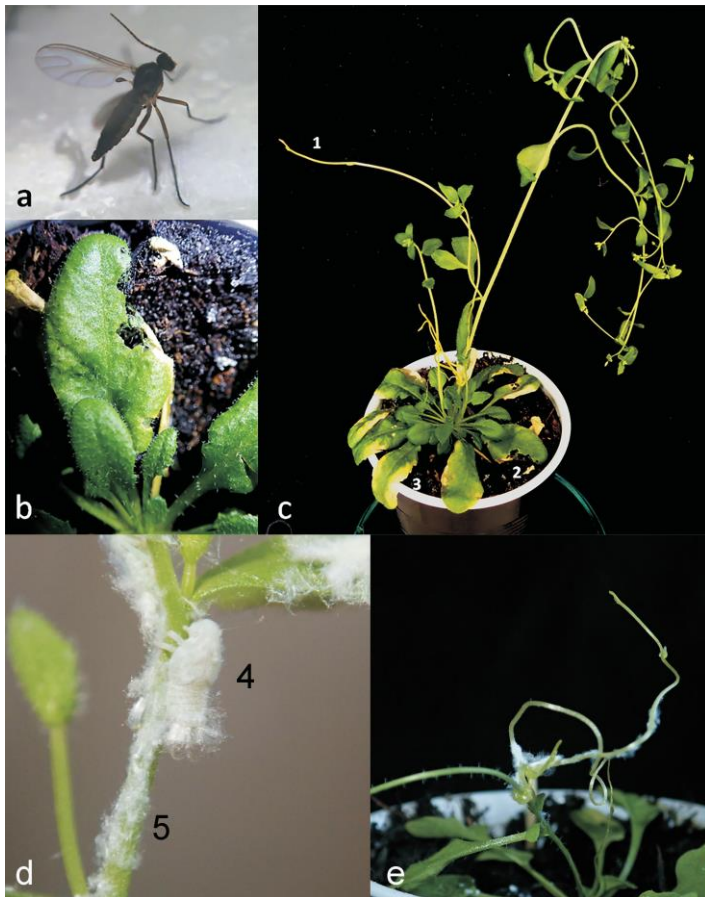
Ензимите с намалена активност в галите са аскорбат пероксидаза, каталаза и глутатион редуктаза. Относителната комбинирана активност на гваякол пероксидазите е най-висока във външния кортекс, но намалява във вътрешния кортекс на галите. И четирите изоформи на супероксиддисмутазата увеличават активността си от незаразеното стъбло към вътрешния кортекс (**Фиг. 77**). Комбинираната активност на SOD се повишава постепенно с почти десетократно увеличение във вътрешния кортекс.



Фигура 77. Супероксид дисмутази (SOD) изоформи и относителна активност при незаразени стъбла на *Cuscuta campestris* (S), в близост до галите (NG), външен кортекс (OC) и вътрешен кортекс (IC) на галата. a-оригинална зимограма; b-софтуерно обработена с-молекулно тегло в kDa и относителна активност на изоформите на SOD. Различните букви показват значимост при $P < 0,05$, Student's t-тест (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2018) *Planta*. 248 (3): 591-599)

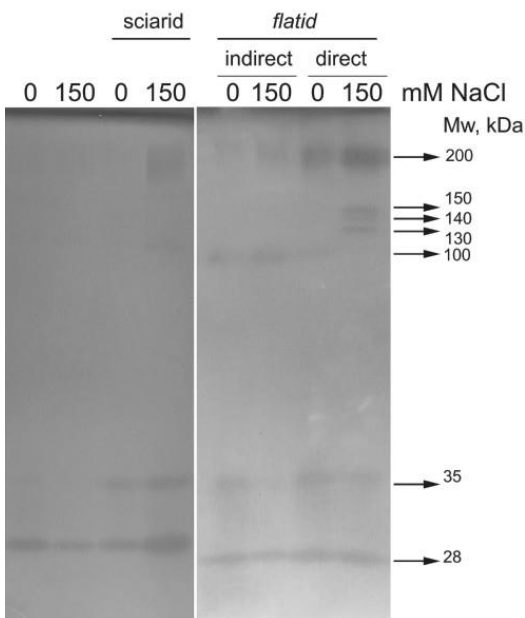
4.5.2 Хранене на гризачи и смучещи растителноядни насекоми

Растения *Arabidopsis* са заразени с *C. campestris*, след което са засолени с 0 или 150 mM NaCl за една седмица. След това към тях са прехвърлени ларви на *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (Diptera: Sciaridae) или *Metcalfa pruinosa*. В случая на експериментите със сциаридни мухи, ларвите на *Lycoriella ingenua* (**Фиг. 78 а**) нанасят видими повреди на листата на *Arabidopsis*, разположени в непосредствена близост до почвата (**Фиг. 78 b, c**). Третирането със сол не повлиява видимо ларвите и растителноядната активност не повлиява видимо развитието на паразитните растения. В случая с *M. pruinosa* растителноядни насекомите се хранят с листа или стъбла от *A. thaliana*. Интересно е, че в случая на заразените с *Cuscuta* растения нимфите на *M. pruinosa* се хранят с предимство с паразитното растение, като напълно игнорират растението-гостоприемник.



Фигура 78. *Lycoriella ingenua* (a), хранеща се с листата на *Arabidopsis* (b) върху трикратно стресирани растения (c). 1 - *Cuscuta campestris*; 2 - *Lycoriella ingenua* - повредени листа; 3 - пожълтяване на листа при 150 mM NaCl. *Metcalfa pruinosa*, хранеща се с *Arabidopsis* (d) и *Cuscuta campestris*, паразитираща върху *Arabidopsis* (e). 4 - нимфа на *Metcalfa pruinosa*; 5 - бял восък, отделян от насекомото. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2022) Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences. 75 (6), 835-844)

Чрез зимограмен анализ са изследвани хитинази, един от основните класове патогенеза-свързани белтъци в корените (Фиг. 79) и в листата (Фиг. 80) на *Arabidopsis*. В *Cuscuta campestris* броят и интензитета на хитиназните изоформи се увеличава при третиране с растителноядни насекоми (Фиг. 81).



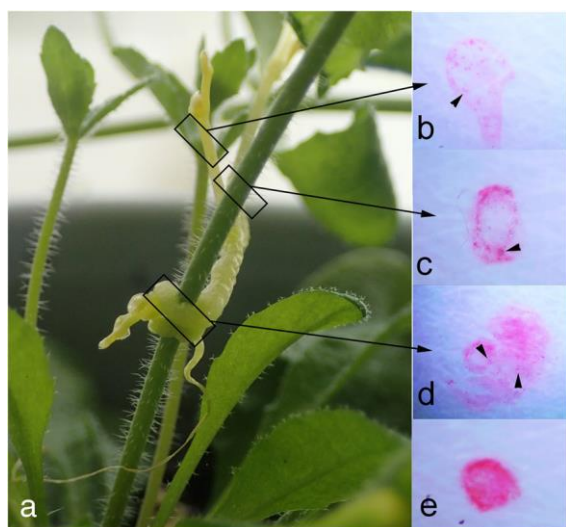
Фигура 81. Хитиназен профил на *Cuscuta campestris*, подложени на различни комбинации от стрес. 5-15% Т градиентен SDS PAGE с 0.1% гликол хитин в гелната матрица. sciarid = *Lycoriella ingenua*; flatid = *Metcalfa pruinosa*. (Публикувана в Zagorchev L. et al. (2022) Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences. 75 (6), 835-844)

4.5.3 Роля на *Cuscuta* spp. като вектор на растителни вируси

Изследвани са общо 36 популации на *Cuscuta* spp., събрани през лятото (юни-септември) на 2020 г. Основният вид *Cuscuta*, който е установен е *C. campestris* – общо 27

популации. Идентифицирани са общо две популации *Cuscuta europaea*, четири популации *Cuscuta epithymum* и две популации *Cuscuta approximata*. Локациите на всички популации са показани на **Фигура 82** и допълнителна **Таблица s4.5.3.1**. Установени са само два от изследваните вируси – TYLCuV и CMV (**Таблица s4.5.3.1**). Една единствена популация на *C. epithymum* (Мъглиж) е установена като двойно позитивна за TYLCuV и CMV. Всички останали популации принадлежат на *C. campestris*. Осем (30%) са позитивни за CMV, 5 (19%) са позитивни за TYLCuV и 3 (11%) са позитивни и за двата вируса (**Таблица s4.5.3.1**).

Тъканен отпечатък на *Arabidopsis*, инфектиран с *C. campestris* в лабораторни условия (**Фиг. 83 а**) показва характерно грануларно оцветяване на CMV вирусни частици в стъбло на *C. campestris* (**Фиг. 83 b**), стъбло на *Arabidopsis* над инфекция с *Cuscuta* (**Фиг. 83 c**) и в пререза на хаустория (**Фиг. 83 d**). Оцветяването е концентрирано в проводящите елементи (**Фиг. 83 c**). Не се наблюдава оцветяване в контролните растения (**Фиг. 83 e**). Резултатите допълнително са потвърдени с DAS-ELISA и Western blot анализи.



Фигура 83. Имунлокализация на CMV на тъкани отпечатъци на инфектиран с *C. campestris* *Arabidopsis* (a). Стрелките посочват локализация на имунооцветяване на прерези на стъбло на *C. campestris* (b), стъбло на инфектиран *Arabidopsis* (c), място на инфекция (d) и контролни растения *Arabidopsis* (e). (Публикувана в Teofanova D. et al. (2022) *Phytoparasitica*. 50 (3), 555-566)

5. Дискусия

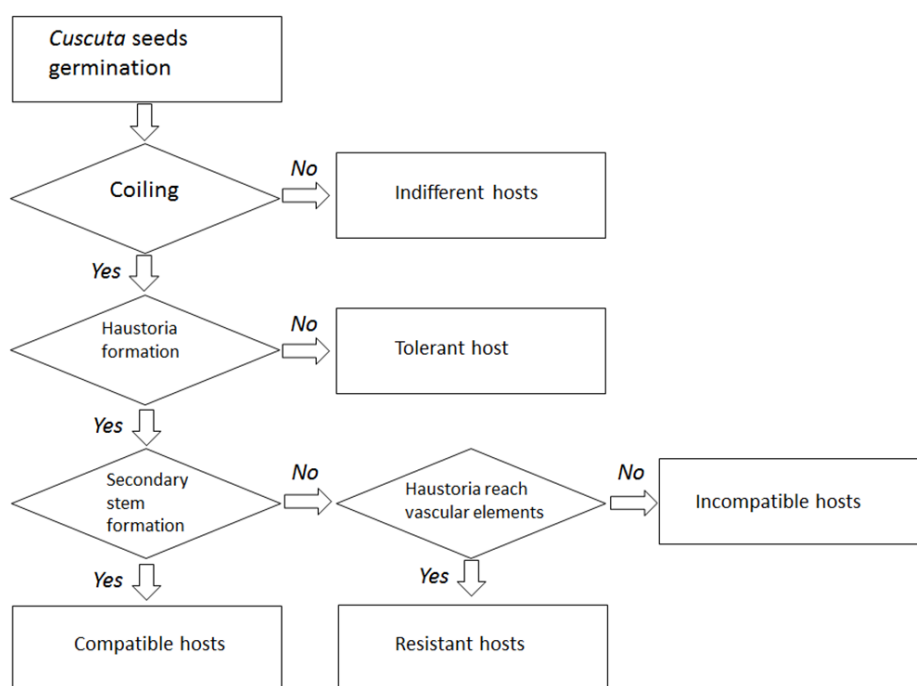
5.1 Разпространение, спектър от гостоприемници и влияние върху гостоприемника

Настоящите резултати (**Фиг. 13-17**, **Таблица s4.1.1.2**) демонстрират ясно, че всички представители на род *Cuscuta* са генералисти по отношение на гостоприемниците (Koch et al. 2004). В съгласие с подобни изследвания в сравнително близка държава – Унгария (Barath and Csiky 2012), резултатите също показват, че *Cuscuta campestris* има най-широк кръг от гостоприемници и е разпространена в сравнително по-разнообразни екологични условия (**Фиг. 11**, **19**). За разлика от горесцитираните изследвания, обаче, настоящите резултати показват слабо припокриване на спектъра от гостоприемници (**Фиг. 18**). Въпреки че се среща предимно в зони, засегнати от човека, като градини и покрай пътища, където обичайните гостоприемници включват широко-разпространени плевели като *Polygonum aviculare*, *Convolvulus arvensis*, и двата съобщени като предпочитани видове гостоприемници (Baráth 2021), и *Portulaca oleraceae*, беше установено, че паразитира и по балкански ендемични растения като *Achillea clypeolata*, както и в чувствителни местообитания като пясъчни дюни.

Cuscuta campestris, освен, че паразитира върху автохтонни растения и антропофити, е установена в най-голям брой местообитания, повечето от които изградени или колонизирани от рудерали и плевели. Тя паразитира на много места край пътища, синори,

изоставени ниви, кошари, в селски дворове и зеленчукови градини и др. територии, тясно свързани с различна антропогенна дейност, но в най-голяма степен торенето на земята, съхранението и разнасянето на оборския тор. Интересен факт е участието на *C. campestris* в някои крайбрежни морски хабитати като черноморските пясъчни дюни. Наблюдавана е също и в периферията на някои соленоводни езера и лонгози по Черноморското крайбрежие. В тези местообитания условията на средата са екстремни (висока слънчева радиация, засоляване на субстрата или др.).

По отношение на културните растения е установено, че нито царевицата като едноседелно растение, нито доматиите са подходящи първични гостоприемници за *C. campestris* (Фиг. 31). Тази констатация подкрепя предишни съобщения в научната литература (Dawson et al. 1994; Krause et al. 2018; Ntoukakis and Gimenez-Ibanez 2016; Singh and Singh 1997). В литературата, обаче, се наблюдават доста неточностите в използваната номенклатура по отношение на класифицирането на гостоприемниците. В опит да се систематизират тези различия предлагаме алгоритъм за оценка на качеството на гостоприемника (Фиг. 85).



Фигура 85. Алгоритъм за категоризиране на различни гостоприемници по отношение на чувствителността им към паразитизъм на *Cuscuta* spp.

Устойчивостта на видовете гостоприемници обикновено се определя от индуцирането на реакция, подобна на нараняване, водеща до смърт на определени клетки на гостоприемника и паразита (Kaiser et al. 2015; Runyon et al. 2010), която може да настъпи или на повърхността на стъблото, или по-късно по време на проникването на хаусториите. Тази реакция изглежда е характерна за доматиите, както се наблюдава и тук (Фиг. 31, 37). За разлика от устойчивите гостоприемници, несъвместимите гостоприемници (т.е., *Zea mays*) не проявяват активна визуална реакция. Съвместимите гостоприемници, които също могат да бъдат отбелязани като чувствителни, може допълнително да се различават по способността си да поддържат растежа на *C. campestris*. Избраните растения-гостоприемници в настоящото проучване, представители на семействата Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae и Ariaceae, са често срещани гостоприемници за *Cuscuta* spp. (Lanini and Kogan 2005; Marambe et al. 2002) и са сред важните културни растения в Европа и по-специално в България. Докато представителите на Fabaceae и Ariaceae са подходящи

гостоприемници (**Таблица 7, Фиг. 38, 39**), тези на Solanaceae показват различен успех за паразита. Всички тествани растения-гостоприемници от семейство Fabaceae осигуряват много бързо прикрепване и кратка лаг-фаза на паразита, вероятно поради предполагаемото по-високо съдържание на азот в това семейство и от голямата нужда от азот на членовете на *Cuscuta* (Marambe et al. 2002).

По отношение на генетичното разнообразие резултатите (**Фиг. 20-22**) не се различават съществено от публикувани за представители на рода в литературата (Fahad et al. 2011; Tajdoost et al. 2013; Kazemitabar et al. 2014). Потвърждава се и наблюдението, че RAPD маркерите са подходящи за видова идентификация (Lin and Lin 2003), но не са толкова успешни за характеризиране на вътревидовото разнообразие на *Cuscuta* spp. Не е установена зависимост между генотипа и спектъра от гостоприемници, географското разпространение, или кълняемостта на семената (**Фиг. 20, 22-24, Таблица 5, s4.1.1.1**).

Съществен резултат е установяването, предимно на *Cuscuta campestris*, като резервоар и вектор на растителни вируси. Тестваните четири вируса са избрани на базата на тяхната селскостопанска значимост (Scholthof et al. 2011). До този момент липсват свидетелства за установяване на тези вируси в кукувичи прежди, въпреки че тези паразитни растения са известни гостоприемници и вектори на други вируси като Potato virus Y (Birschwilks et al. 2006), Tobacco rattle virus (Dikova 2006) и Grapevine leafroll-associated virus-7 (Mikona and Jelkmann 2010). TYLCV и CMV са установени сред популациите на *C. campestris* (**Фиг. 82, Таблица s4.5.3.1**). Появата на CMV и TYLCV при *C. campestris* е тревожно явление, което предполага, че този вид може да представлява резервоар и вектор, в допълнение към техните обичайни насекомни вектори за разпространението на тези вируси както сред естествените, така и сред селскостопанските местообитания. Въпреки че предаването на вируса в посока паразит-гостоприемник не е изследвано в настоящия експеримент, предаването в посока паразит-гостоприемник е доказано поне за CMV (**Фиг. 83-84**). Това е в съгласие с предишни констатации за други вируси (Mikona and Jelkmann 2010; Birschwilks et al. 2006) и допълнително демонстрира потенциала на паразитните растения като вирусни вектори.

Влиянието на паразитизмът на *Cuscuta* spp. върху гостоприемниците е значително и това е демонстрирано чрез изследване на фотосинтезата и на транскриптома на гостоприемниците. В настоящото проучване са идентифицирани общо 1601 DEG между Р (паразитирани) и СК (контроли) на *T. repens* с и без паразитизъм от *C. australis*, съответно (**Фиг. 51-54, Таблица 13**). Функционалното аотиране разкрива, че 15 DEGs са обогатени в рамките на пътя на взаимодействие между растенията и патогените (**Фиг. 51-54, Таблица 13**). Подобни резултати са получени и за *Arabidopsis* при инфекция с *Cuscuta chinensis* (**Фиг. 54-56**). При *Arabidopsis* нивата на експресия на PR1, PR2 и PR5 се повишават в отговор на стрес от засушаване (Liu et al. 2013). Свърхекспресията на AtRPS2 и AtRPM1 придава широк спектър на устойчивост към гъбни патогени, бактериални патогени и вредители (Li et al. 2019). Въпреки това в това проучване Клъстер-16854.12166 (PR1), Клъстер-35121.0 (RPM1, RPS3), Клъстер-16854.8014 (RPM1, RPS3), Клъстер-16854.8015 (RPM1, RPS3), Клъстер-16854.8017 (RPM1, RPS3) и Клъстер-16854.8021 (RPM1, RPS3) са с понижена експресия в *T. repens* по време на паразитизма на *C. australis*. Това предполага, че паразитните растения активно потискат защитните механизми, за да предотвратяват активни защитни реакции.

Видовете от род *Cuscuta* проявяват също отчетлив ефект както върху светлинните (**Фиг. 50, Фиг. s4.2.2.1-4**), така и върху светлинно-независимите (**Таблица 12**) реакции на фотосинтезата на гостоприемника, дори когато този гостоприемник не осигурява оптимално развитие на паразита (**Фиг. 49**). Резултатите за светлинните реакции на фотосинтезата са

в съгласие с резултатите на Shen (Shen et al. 2007), който установяват, че промените във фотосинтетичния процес в листата на *Mikania micrantha*, заразени с *C. campestris*, зависят от възрастта на листата. Подобно на нашите резултати, наличието на паразита *C. reflexa* предизвиква стимулиране на нетната фотосинтеза в гостоприемника и предизвиква забавяне на стареенето на листата при *Ricinus communis* (Jeschke and Hilpert 1997) и в *Coleus blumei* (Jeschke et al. 1997). Анализи на транскриптома в *Arabidopsis* показват, че има значително повишена експресия на гени, свързани със светлинната фаза на фотосинтеза (Фиг. 55). Същевременно се наблюдава значително потискане на светлинно-независимите реакции (Таблица 12).

Намаляването на асимилацията на CO₂ може да се обясни допълнително с понижаване на регулацията поне на голямата субединица на RuBisCO (Таблица s4.4.1.2), но също така и с понижаване на регулацията на хлоропластната глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа и фосфорибулокиназа (Таблица s4.4.1.2), които участват в регенерацията на рибулоза-1,5-бисфосфат. Съответно понижаването им води до намаляване на асимилацията на CO₂, наричано още "забавяне на цикъла на Калвин-Бенсън" (Price et al. 1995; Elena López-Calcano et al. 2017). Освен това много от диференциално регулираните белтъци в настоящото изследване са свързани с модулиране на въглехидратния или аминокиселинния метаболизъм и според GO анотацията по биологични процеси са свързани с отговора на различен вид стрес.

Като цяло се смята, че отговорът на гостоприемника към инфекцията с *Cuscuta* задейства пътищата за защита, свързани с JA и SA (Runyon et al. 2010) и е докладвано повишаване на експресията на множество гени и протеини, свързани с отговора към патогени. Borsics и Lados (Borsics and Lados 2002) съобщават за повишаване на регулацията на PPRG2 от семейството на хомоложните на патогенезата протеини (PR-10) в резултат на паразитизъм на *Cuscuta*. При *Mikania micrantha*, заразена от *C. campestris*, е отчетено повишаване на регулацията на хомоложен на хитиназата ген, Mmchi1 (Li et al. 2010a). Транскриптомните анализи до голяма степен противоречат на тези данни (Фиг. 52 и 56).

С помощта на секвениране от следващо поколение установихме, че паразитизмът променя състава и разнообразието на микробната среда в ризосферата на инвазивния *Alternanthera philoxeroides*, заразен от *C. australis* (Фиг. 59-62). Това потвърждава предишни констатации, че краткотрайният паразитизъм от *C. campestris* значително променя индексите на функционалното разнообразие на почвените микробни съобщества с помощта на теста BIOLOG (Li et al. 2014). Подобно при *C. australis*, Bardgett et al. (Bardgett et al. 2006) установяват значителни промени в свойствата на подпочвения слой в естествена тревна екосистема, заразена от кореновия хемипаразит *Rhinanthus minor*. Косвеният или системният ефект от паразитизма на *C. campestris* върху корените на гостоприемника също е добре изразен по отношение на редица ензими (Фиг. 58, 79). Този ефект може да се обясни с нарушаването на преноса по ксилема/флоема, причинено от паразитния механизъм на *C. campestris* (Birschwilks et al. 2006), което пряко засяга комуникацията между мястото на инфекцията и корена. Преди е потвърден значителният подземен ефект на паразитизма на *Cuscuta* spp., което води до недостиг на асимилати (Jeschke and Hilpert 1997). В крайна сметка всички тези механизми водят до значителни промени в активностите на основните почвени ензими (Фиг. 64), което от своя страна води до влошаване на обмяната на органика в почвата (Acosta-Martinez et al. 2018).

5.2 Влияние на абиотичния стрес върху взаимодействието паразит-гостоприемник

Абиотичният стрес, изследван основно под формата на засоляване, влияе на всеки един етап от развитието на *Cuscuta* spp., от покълването на семената, през формирането на хаустория, до успешния паразитизъм и развитие. Сравнителен анализ на покълването на семена на паразитни и непаразитни представители на Convolvulaceae в условия на засоляване показва по-бавно покълване при паразитните растения, допълнително забавено от засоляването (Фиг. 25), което е в съответствие със съществуващата литература. Стратегията на непаразитните увивни растения включва бърз първоначален растеж и катерене по други растения, за да изпреварят околните видове (Shen et al. 2016). Сравнително големите семена на тези видове покълват толкова бързо, колкото е възможно (Фиг. 25), мобилизирайки скорбяла чрез активиране на амилази (Фиг. 28). За разлика от тях, дори когато физическият покой е бил изкуствено нарушен (чрез скарификация), покълването при *Cuscuta* spp. е значително по-бавно. Екологичната стратегия на паразитните видове включва дълбок физически и вероятно физиологичен покой (Jayasuriya et al. 2008), което осигурява дълго задържане на семената в почвата и непрекъснато покълване в продължение на няколко години. По-бавното покълване би позволило появата когато потенциалните гостоприемници вече са се установили, което е критично поради ниския фотосинтетичен капацитет (McNeal et al. 2007b) и нарушената способност за усвояване на минерали от почвата поради загуба на гени (Vogel et al. 2018), което не гарантира оцеляването в отсъствие на гостоприемник. Следователно първоначалният растеж при *Cuscuta* е насочен към незабавно прикрепване към потенциален гостоприемник.

Очевидно е, че паразитните *Cuscuta* са много по-чувствителни към засоляването, отколкото други непаразитни представители на сем. Convolvulaceae. Не само скоростта на покълване (Фиг. 25) и растежът в отсъствие на гостоприемник (Фиг. 26 и 27) са негативно повлияни, но също така и по-нататъшната способност за заразяване на потенциални гостоприемници и скоростта на растеж след установяването им (Фиг. 30). На ниво образуване на хаустория се наблюдават определени разлики в ензимните профили в мястото на контакт както в паразитното растение, така и в гостоприемниците (Фиг. 32-35), които разлики са продиктувани както от вида гостоприемник, така и от засоляването. Участието на протеази (Bleischwitz et al. 2010) и пектинметил естерази от страна на паразита (Yokoyama et al. 2020; Srivastava et al. 1994) е добре известно и потвърдено в настоящия експеримент. По отношение на AGP (Фиг. 36), поне по отношение на *Arabidopsis* и *Solanum lycopersicum* се наблюдава диференциално увеличаване на LM2 и JIM8 разпознаваните фракции в резултат на инфекцията, което съответства на предишни резултати, свидетелстващи за активно участие на AGP от гостоприемника в процеса на формиране на хаустория (Albert et al. 2006). Това първоначално е свързано с формиране на адхезивния диск, но в последствие е свързано и с търсещите хифи (Hozumi et al. 2017). Макар и в друг експериментален обект, но е установено, че AGP се влияят значително от солевия стрес и имат критично значение за морфогенезата на клетките (Фиг. 86).

Засоляването оказва значително влияние на развитието на паразита и след успешно заразяване. Повишената солева концентрация проявява отрицателен и дозозависим ефект върху растежа на паразита (Frost et al. 2003a). При някои растения-гостоприемници този ефект е значителен още при 100 mM NaCl и напълно опустошителен при 200 mM NaCl, докато при други по-ниската концентрация на солта не променя съществено растежа на паразита (Фиг. 39). Повишената солева концентрация обаче може да увеличи и чувствителността на гостоприемника (Frost et al. 2003a), както е показано при патладжан и при няколко сорта пипер (Фиг. 39). Очевидно е, че преживяемостта и скоростта на растеж

на паразита не са пряко свързани във всички случаи. Докато при *Petroselinum crispum* преживяемостта на паразита се увеличава със засоляването, а скоростта на растеж намалява, при *Capsicum annuum* сорт Куртовска капия се наблюдава обратното (**Фиг. 39**, **Таблица 7**). Преживяемостта силно зависи от образуването на хаустории, което от своя страна може да бъде потиснато от лигнификацията на клетъчната стена (Jhu et al. 2020), причинена от повишената солева концентрация. На второ място, растежът на паразитното растение може да бъде повлиян от няколко фактора. Негативни ефекти биха се очаквали от намалената наличност на биомаса на гостоприемника и натрупването на токсични йони, най-вече Na^+ (Wallace et al. 1978), докато се съобщава, че Cl^- йони не проникват в хаусториите в значителна степен (Förste et al. 2020a). При паразитът със засоляването също така се наблюдава общо увеличаване на концентрацията на L-пролин (**Фиг. 40**), което изглежда не е пряко свързано с темповете на нарастване.

Повечето от ефектите на абиотичен стрес върху *Cuscuta* spp. се предизвикват чрез непряк, опосредстван от гостоприемника ефект. Въпреки това, паразитът е способен и на собствен метаболитен отговор на стрес (Srivastava et al. 2004; Vurro et al. 2011). При засоляване се наблюдава значително повишаване на концентрацията на L-Pro в отговор на засоляването (**Фиг. 41**), много по-изразено, отколкото в растението-гостоприемник (**Фиг. 57**). Относителната нечувствителност на активността на SOD (**Фиг. 41**) може да се обясни с нефотосинтетичния характер на паразита. Като се има предвид, че фотосинтетичният механизъм е основният източник на свръхпроизводство на супероксидни радикали при солева концентрация (Pintó-Marijuan and Munné-Bosch 2014), може да се очаква, че при *Cuscuta* това не представлява значително предизвикателство. За разлика от SOD, обратното намаляване на активността на POD и увеличаване на активността на CAT (**Фиг. 41**) предполага значимостта на производството на H_2O_2 и възможното преместване на този реактивни кислородни видове от гостоприемника към паразита.

По отношение на метаболитния анализ на *Cuscuta chinensis*, паразитираща върху гликофитен и халофитен гостоприемник при солево третиране, основното очакване е да се установи дали отговора към солеви стрес на паразита зависи от солевата толерантност на гостоприемника. Противно на очакванията не са установени значителни разлики в типични стресови метаболити като пролин или глицинбетаин (**Таблицы s4.3.2.1-9**). Единствените значително повлияни метаболити, които могат да бъдат отнесени като стресови са от групата на флавоноидите. Съществуват редица сведения за участието им в отговора на солеви стрес (Chutipaijit et al. 2009; Sarker and Oba 2018). От получените резултати обаче изглежда, че флавоноидният профил в *Cuscuta* се променя основно под влияние на вида гостоприемник, а не толкова под влияние на солевия стрес (**Фиг. 44**).

Ефектът от паразитизма на *C. campestris* върху отговора на абиотичен стрес на гостоприемника е или пряк, или косвен. Прекият ефект се състои от метаболитни промени в и близо до мястото на например в iS (мястото на инфекция), където се образуват хаустории, и в iL (инфектирани листа), което е пряко въздействие от паразитизма. Косвеният ефект се отразява на гостоприемника тъканите, отдалечени от мястото на инфекцията, и може да се определи като системен - реакция на цялото растение. Не е изненадващо, че всички изследвани биохимични маркери са засегнати най-вече в мястото на заразяване и в заразените листа (**Фиг. 57**), а взаимодействието между инфекцията и засоляването също беше по-силно изразено там (**Таблица 14**). Значителният антиоксидантен отговор, осигурен от по-висока активност на CAT, SOD и POD предполага предизвикан от паразитизма оксидативен стрес (Demirbas et al. 2013; Saric-Krsmanovic et al. 2018).

5.3 Взаимодействие с гостоприемници в условия на биотичен стрес

Има сравнително малко литературни данни за патогени или епипаразити върху представители на род *Cuscuta*. Един такъв пример са галообразуващите бръмбарихоботници от род *Smicronyx*. Най-очевидното фенотипно различие между галите и незаразеното стъбло на *C. campestris* е натрупването на хлорофил, особено в зеленикавия вътрешен кортекс на галата (Фиг. 65). Напречният разрез на галите е много сходен с предишни публикации (Zhekova et al. 2014; Аникин et al. 2017), показващ ларвна камера, заобиколена от богат на хлорофил вътрешен кортекс и по-блед външен кортекс (Фиг 65). Повишената концентрация на хлорофил (Фиг. 66) във вътрешния кортекс потвърждава възможността галите на *Smicronyx* да са фотосинтетично активни (Аникин et al. 2017), което е съществена разлика във функционалността на галата, в сравнение с тъканите на *Cuscuta*.

Аникин и съавтори (Аникин et al. 2017) изследват някои параметри на флуоресценцията на PSII в галите на *Smicronyx smreczynskii* върху *C. campestris* и установяват увеличено количество активни PC на PSII и повишена ефективност на фотосинтезата в галите в сравнение със стъблата на *C. campestris*. В настоящите изследвания са получени подобни резултати, които са разширени с възможностите на JIP-теста (Фиг. 67-68). Нормалното съотношение Chl a/b при зелените растения е около 3. LHCII се състои от три части: сърцевинна антена, съдържаща само Chl a и най-тясно свързана с реакционния център; второстепенни белтъци, свързващи Chl a/b, които заемат междинно положение между сърцевинната антена и периферната антена; и най-външните белтъци, свързващи Chl a/b, LHCII. На тези три групи антени се падат съответно 14, 15 и 67 % от общото количество хлорофил в PSII (Ke 2001). LHCII е основният компонент на тилакоидната мембрана и главната светлосъбираща антена на PSII, като съотношението Chl a/b е близко до 1 (8:7 молекули). В допълнение към събирането на светлина, LHCII играе роля в подреждането на мембраните, което има последствия в регулирането на разпределението на енергията между двете фотосистеми. Нормалното съотношение Chl a/b в PSI е 5-6. Резултатите ни от електрофоретичното разделяне на тилакоидни комплекси показват много по-малко PSI и LHCII в галите в сравнение с *A. thaliana* (Фиг. 70). Липсата на LHCII води до по-неефективен пренос на енергия в PSII в галите, отколкото в *A. thaliana*. Други автори също са наблюдавали ниска ефективност на PSII (Van der Kooij et al. 2000;). Sherman (Sherman et al. 1999) установяват, че хлоропластите на *C. pentagona* съдържат редица белтъци, необходими за успешното фиксиране на CO₂, а белтъците в тилакоидите са организирани подобно на другите висши растения, с изключение на големия процент тилакоиди, организирани в грани. Изглежда *C. campestris* при определени обстоятелства е в състояние да организира правилно фотосинтетичния си апарат и да извършва значителна фотосинтеза.

Активността на хидролитичните ензими допълнително потвърждава функционалното разграничение между вътрешния и външния кортекс, както и в сравнение с незаразените стъбла. Както протеазите (Фиг. 71), така и α -амилазите (Фиг. 72) показват повишена активност, а няколко изоформи са установени само в галите, което съответства на предишни открития, че индуцираните от насекоми растителни гали са метаболитно активни, богати на скорбяла и протеини структури (Giron et al. 2016). Повишената метаболитна и фотосинтетична активност водят до значително повишаване на активността на SOD, особено във вътрешния кортекс на галите (Фиг. 77). Това е от съществено значение за отстраняването на супероксидните радикали, генерирани по време на фотосинтезата дори при оптимални условия, и за поддържането на редокс хомеостазата (Foyer and Noctor 2011). Повишената активност на тези ензими се очаква поради предполагаемия оксидативен стрес във вътрешния кортекс на зрелите гали (Santos Isaias et al. 2014).

Изследването на влиянието на храненето на растителноядни насекоми беше проведено с два различаващи се по начин на хранене видове – гризящите ларви на сциаридни мухи и смучещите ларви на цикадите *Metcalfa pruinosa*. В допълнение растенията бяха подложени и на солеви стрес, за да се провери взаимовръзката между абиотични и биотични стресови фактори. Докато липсата на пряко хранене на ларвите на сциаридите с *C. campestris* се очаква поради почвения им хабитат, предпочитаното хранене на цикадите върху паразитното растение (Фиг. 78) се счита за необичайно поведение. Сравнително ранни проучвания съобщават, че в случая с афиди някои видове са склонни да се хранят върху *Cuscuta*, дори ако растението-гостоприемник не е естествена храна за афидите и следователно се избягва (Harvey 1966).

Засоляването само по себе си не предизвиква видими промени в хитиназите в нито в корените, нито в листата на *Arabidopsis* (Фиг. 79, 80), въпреки че е съобщено за индуциране на протеини, свързани с патогенезата (PR), включително хитинази, в отговор на абиотични стрес (Grover 2012). Въпреки това засоляването модулира хитиназният профил в отговор на растителноядни насекоми в корените, както и при паразитното растение. Взаимодействията между биотичните и абиотичните стресори са добре документирани и е известно, че предизвикват подобни реакции и е известно, че засоляването може да увеличи защитната реакция срещу растителноядни насекоми (Renault et al. 2016). Предишно проучване също така съобщава за нарушена защита към растителноядни насекоми на растения-гостоприемници, заразени от *Cuscuta* (Runyon et al. 2008). По отношение на хитиназите това не е потвърдено в нашето проучване. По-ниската интензивност на хитинолитичните ивици в листата при третирането с *Cuscuta* + цикади трябва да се дължи на липсата на директни повреди от цикадите върху *Arabidopsis*. За сметка на това реакцията на *C. campestris* към растителноядни насекоми по отношение на броя и интензивността на хитинолитичните ивици (Фиг. 81) е по-изразена от тази на растението-гостоприемник. Тези резултати са в съответствие с докладваните данни за усещане чрез гостоприемника и пренасяне на сигнали, предизвикани от растителноядни насекоми, от *Cuscuta* (Zhuang et al. 2018).

6. Изводи

Въз основа на получените резултати могат да се обобщят следните по-важни изводи:

По **Хипотеза 1**: Интродуцираният вид *Cuscuta campestris* има по-висок инвазивен и паразитен потенциал от местните представители на рода.

1. Интродуцираният и инвазивен вид *Cuscuta campestris* има по-широко разпространение, в по-разнообразни климатични условия и по-широк кръг от гостоприемници, отколкото местните видове. Същевременно той е и с по-голямо значение като вектор и резервоар на растителни вируси.
2. Генетичното разнообразие на *Cuscuta campestris* е сравнително голямо, но не корелира с разпространението или спектъра от гостоприемници на паразита.

По **Хипотеза 2**: Взаимодействието паразит-гостоприемник се повлиява от абиотични и биотични стресови фактори.

3. Засоляването влияе негативно на всички етапи от развитие на *Cuscuta*, като отговорът към солеви стрес зависи от вида гостоприемник и засоляването може да доведе до промяна на „качеството“ на гостоприемника.
4. Метаболомът на *Cuscuta* зависи силно от вида на гостоприемника и в по-малка степен от абиотични стресови фактори.
5. Паразитизмът на *Cuscuta*, от своя страна, интерферира със способността на гостоприемниците да се адаптират както към засоляване, така и към растителноядни насекоми.
6. Паразитизмът на *Cuscuta* влияе негативно на фотосинтетичната активност на гостоприемника както в светлинно-зависимите, така и в реакциите на асимилация на CO₂ дори когато паразитът няма оптимално развитие.
7. Надземният паразитизъм на *Cuscuta* оказва значителен ефект върху взаимодействията между кореновата система и ризосферните микробиални съобщества, като променя метаболизма на корените, относителните дялове на микробиалните таксони и активността на почвени ензими, с което влошава обмяната на органична материя и минерални съединения.

По **Хипотеза 3**: Паразитите от род *Cuscuta* са обект на влиянието на биотични фактори, които значително променят метаболизма им.

8. Определени фактори могат да предизвикат активна светлинна фаза на фотосинтеза при иначе нефотосинтезиращия паразит *Cuscuta campestris*. Подобен биотичен фактор са галите на бръмбарите хоботници от род *Smicronyx*, които образуват два ясно разграничени функционално и метаболитно слоя (кортекси).
9. В галите на *Smicronyx* не се наблюдава активен антиоксидантен отговор и няма свидетелства, че те повлияват негативно растежа и развитието на *Cuscuta*.
10. Паразитните растения от род *Cuscuta* могат да бъдат активни вектори на вируси (Cucumber Mosaic Virus), които прехвърлят върху гостоприемника, без самите те да имат видими симптоми на вирусна инфекция.

В заключение може да се смята, че трите хипотези са потвърдени.

7. Приноси

Приноси с фундаментален характер:

1. За първи път е дефиниран проблемът с влиянието на абиотичен стрес върху паразитни растения и достъпната до момента литература е обобщена със задаване на ясни насоки за изследвания.
2. Установени са значителни ефекти на вида гостоприемник върху адаптацията на *Cuscuta* spp. към абиотичен стрес.
3. Потвърдени и установени са ензими и гликопротеини, които участват в процеса на формиране на хаустория.
4. Потвърдени и обогатени са данните за промените, които настъпват в резултат на епипаразитизма на галообразуващи насекоми от род *Smicronyx* във фотосинтетичния апарат на *Cuscuta campestris*.

Приноси с научни-приложен характер:

5. Значително е обогатена информацията за разпространението на род *Cuscuta* в България, спектъра от гостоприемници и е надградена сбирката с хербарийни материали в Хербария на СУ.
6. Потвърдено е негативното влияние на надземния паразит *Cuscuta* spp. върху ризосферните взаимодействия и почвеното здраве.
7. Потвърдена е ролята на *Cuscuta* spp. като резервоар и вектор на растителни вируси.

Приноси с методичен характер:

8. Оптимизирана е моделна система паразит/стрес-чувствителен гостоприемник и паразит/стрес-толерантен гостоприемник за сравнителни анализи на множество стресови фактори върху *Cuscuta* spp.

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. 章由陈露茜、李钧敏、柳本·扎戈尔 切夫 (Lyuben Zagorchev) 和杨蓓芬撰写 (Lucy Chen, Junmin Li, Lyuben Zagorchev and Beifen Yan) 第9章 环境因子对菟丝子属植物寄生效果的影响 (Chapter 9 The Effect of Environmental Factors on the Parasitism of Dodder Plants) (2022) In: 植物寄生生态学研究：以菟丝子属研究为例 (Research on the Ecology of Plant Parasitism: Taking *Cuscuta* as an Example) eds. Ma Jun, Hao Chenyang, Beijing: Science Press. ISBN 978-7-03-073382-5 – колективна монография
 2. **Zagorchev L.**, Du Z., Shi Y., Teofanova D., Li J. (2022) *Cuscuta australis* Parasitism-Induced Changes in the Proteome and Photosynthetic Parameters of *Arabidopsis thaliana*. *Plants*. 11, 2904. (IF = 4.658; SJR = 0.77; Q1) <https://doi.org/10.3390/plants11212904>
 3. Sarić-Krsmanović M., **Zagorchev L.**, Gajić Umiljendić J., Rajković M., Radivojević L., Teofanova D.R., Božić D., Vrbničanin S. (2022) Variability in early seed development of 26 populations of *Cuscuta campestris* Yunck.: The significance of host, seed age, morphological trait, light, temperature and genetic variance. *Agronomy*. 12 (3) 559. (IF = 3.949; SJR = 0.65; Q1) <https://doi.org/10.3390/agronomy12030559>
 4. **Zagorchev L.**, Albanova I., Lozanova Y., Odjakova M., Teofanova D. (2022) Chitinase profile of *Arabidopsis*, subjected to the combined stress of soil salinity, *Cuscuta campestris* parasitism and herbivores. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*. 75 (6), 835-844, (IF = 0.326; SJR = 0.19; Q3) DOI:10.7546/CRABS.2022.06.07
 5. Teofanova D., Lozanova Y., Lambovska K., Pachedjieva K., Tosheva A., Odjakova M., **Zagorchev L.** (2022) *Cuscuta* spp. populations as potential reservoirs and vectors of four plant viruses. *Phytoparasitica*. 50 (3), 555-566 (IF = 1.809; SJR = 0.41; Q2) <https://doi.org/10.1007/s12600-022-00981-9>
 6. **Zagorchev L.**, Petrova V., Albanova I., Georgieva K., Sarić-Krsmanović M., Muscolo A., Teofanova D. (2022) Salinity modulates crop plants suitability as hosts for *Cuscuta campestris* parasitism. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 21 (5), 324-330, <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.10.008> (SJR = 1.01; Q1)
 7. Zhou L., Lu Q., Yang B., **Zagorchev L.**, Li J. (2021) Integrated small RNA, mRNA, and degradome sequencing reveals the important role of miRNAs in the interactions between parasitic plant *Cuscuta australis* and its host *Trifolium repens*. *Scientia Horticulturae*. 289. 110458 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110458> (IF = 4.342; SJR = 0.84; Q1)
- Цитирана 1 път (по Scopus)
8. **Zagorchev L.**, Stoeggl W., Teofanova D., Li J., Kranner I. (2021) Plant parasites under pressure: effects of abiotic stress on the interactions between parasitic plants and their hosts. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (14) 7418 <https://doi.org/10.3390/ijms22147418> (IF = 6.208; SJR = 1.18; Q1)
- Цитирана 4 пъти (по Scopus)
9. **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, 1399. <https://doi.org/10.3390/cells10061399> (IF = 7.666; SJR = 1.45; Q1)
- Цитирана 5 пъти (по Scopus)

10. **Zagorchev L.**, Atanasova A., Pachedjieva K., Tosheva A., Li J., Teofanova D. (2021) Salinity Effect on Germination and Further Development of Parasitic *Cuscuta* spp. and Related Non-Parasitic Vines, *Plants*, 10, 438. <https://doi:10.3390/plants10030438> (IF = 4.658; SJR = 0.77; Q1)
11. Ren Z., **Zagorchev L.**, Ma J., Yan M., Li J. (2020) Predicting the potential distribution of the parasitic *Cuscuta chinensis* under global warming. *BMC Ecology*. 20:28. DOI: 10.1186/s12898-020-00295-6 (IF = 2.964; SJR = 0.867; Q1)
- Цитирана 9 пъти (по Scopus)
12. **Zagorchev L.**, Traianova A., Teofanova D., Li J., Kouzmanova M., Goltsev V. (2020) Influence of *Cuscuta campestris* Yunck. on the photosynthetic activity of *Ipomoea tricolor* Cav. – *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence assessment. *Photosynthetica*. 58 (SI): 237-247. DOI: 10.32615/ps.2020.004 (IF = 3.189; SJR=0.797; Q1)
- Цитирана 4 пъти (по Scopus)
13. Yang B., Zhang X., **Zagorchev L.**, Li J., Frey B., Li M. (2019) Parasitism changes rhizospheric soil microbial communities of invasive *Alternanthera philoxeroides*, benefitting the growth of neighboring plants. *Applied Soil Ecology*. 143: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.025> (IF = 3.187; SJR = 1.195; Q1)
- Цитирана 2 пъти (по Scopus)
14. Denitsa Teofanova, Mariela Odjakova, Nabil Abumhadi, **Lyuben Zagorchev**. Strigolactones. Mediators of abiotic stress response and weakness in parasite attraction. Chapter 8, pp. 115-128. In: Ed. Hasanuzzaman M., Fujita M., Oku H., Islam T. (2019). *Plant Tolerance to Environmental Stress: Role of Phytoprotectants*. CRC Press, Taylor & Francis Group ISBN 9781138559172
15. **Zagorchev L.**, Albanova I., Tosheva A., Li J., Teofanova D. (2018) Salinity effect on *Cuscuta campestris* Yunck. parasitism on *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Physiology and Biochemistry*. 132: 408-414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.037> (IF = 3.404, SJR = 1.125, Q1 in Plant Science)
- Цитирана 4 пъти (по Scopus)
16. **Zagorchev L.**, Albanova I., Tosheva A., Li J., Teofanova D. (2018) Metabolic and functional distinction of the *Smicronyx* sp. galls on *Cuscuta campestris*. *Planta*. 248 (3): 591-599. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2926-6> (IF = 3.06, SJR = 1.508; Q1 in Plant Science)
- Цитирана 1 път (по Scopus)
17. **Lyuben Zagorchev**, Denitsa Teofanova and Mariela Odjakova. Ascorbate – Glutathione Cycle – Controlling the Redox Environment for Drought Tolerance. Chapter 8, pp. 187-226. In: Ed. Hossain MA, Wani SH, Bhattacharjee S, Burritt DJ, Phan Tran L-S. (2016). *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry*. Springer International Publishing Switzerland. ISBN 978-3-319-28899-4 (e-book), 978-3-319-28897-0 (hardcover)
- Цитирана 7 пъти (по Scopus)
18. **Zagorchev, L.**, Kamenova, P., Odjakova, M. (2014) The role of plant cell wall proteins in response to salt stress. *The Scientific World Journal* Article ID 764089, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/764089>, (SJR = 0.44, Q2 in Biochemistry)
- Цитирана 36 пъти (по Scopus)
19. **Zagorchev L.**, Seal C.E., Kranner I., Odjakova M. (2013) A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (4), 7405-7432 DOI: 10.3390/ijms14047405, (IF = 2.464, SJR = 0.769, Q2 in Medicine)

Цитирана 276 пъти (по Scopus)

20. **Zagorchev L.**, Stoineva R., Odjakova M. (2013) Changes in arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis in suspension in vitro cultures of *Dactylis glomerata* L. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 19 (Suppl. 2), 35-37. (SJR = 0.162, Q3 in Agricultural and Biological Sciences)

Цитирана 2 пъти (по Scopus)

Обобщени данни:

Общ брой: 20; 4 от конкурса за доцент, 8 вписани в НАЦИД за доцент;

- С импакт фактор: 14 (11 Q1; 2 Q2; 1 Q3)
- С импакт ранг: 3 (1 Q1; 1 Q2; 1 Q3)
- Глави от книги: 3 (1 колективна монография на китайски език)
- Първи автор: 13
- Кореспондиращ автор: 11
- Първи или кореспондиращ автор: 15
- 4 обзорни публикации
- Общ импакт фактор: 51.88
- Цитати (само по Scopus на тези публикации): 351

Участия в научни форуми:

Международни:

1. Denitsa Teofanova, Anita Tosheva, Kalina Pachedjieva, **Lyuben Zagorchev**. Distribution, host range, and genetic variability of the holoparasitic genus *Cuscuta* in Bulgaria. 4th International Conference on Plant Biology (23rd SPPS Meeting), 6th-8th October, Belgrade, Serbia. Oral presentation. Book of Abstracts p. 137
2. **Lyuben Zagorchev**, Denitsa Teofanova, Margarita Kouzmanova, Vasiliij Goltsev. Photosynthetic activity of *Cuscuta campestris*, influenced by gall formation by *Smicronyx* spp., Oral presentation, 16th World Congress on Parasitic Plants, 3rd-8th July, 2022, Nairobi, Kenya. Book of abstracts pp 24-25.
3. **Lyuben Zagorchev**, Denitsa Teofanova, Kristiyana Georgieva, Alexandra Atanassova. Pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* in response to combination of abiotic (salinity) and biotic (fungus gnats and dodder) stresses. 16th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 4-8 April 2022, Limassol, Cyprus, Abstract published in *Phytopathologia Mediterranea* (IF = 2.037), Vol. 62, Issue 1, p. 213.
4. **Lyuben Zagorchev**, Anita Tosheva, Denitsa Teofanova. Response of field dodder (*Cuscuta campestris* Yunck.) to salinity in dependence of the host plants. 11th Weed Science Congress and Symposium on Herbicides and Growth Regulators, Oral presentation, 20-23.09.2021, Palic, Serbia, Book of abstracts p. 24.
5. A. Atanasova, D. Teofanova, I. Albanova, A. Tosheva, **L. Zagorchev**. Parasite-host interaction site-profiling of enzymes and proteoglycans, involved in *Cuscuta campestris* parasitism. 45th FEBS Congress (virtual), 3-8 July, Ljubljana, Slovenia, Abstract published in *FEBS Open Bio*

(IF = 2.231), Vol. 11, Issue S1, Supplement: 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia, July 3–8, 2021, p. 387.

6. **Lyuben Zagorchev**, Xue Zhang, Junmin Li. Haustoria formation and changes in photosynthetic structures in parasitic dodders (*Cuscuta* spp.) are induced by blue light alone. 8th International Conference of Ecologists of Montenegro, 2-6 October 2019, Budva, Montenegro, Book of abstracts p. 152.
7. **Lyuben Zagorchev**, Denitsa Teofanova, Junmin Li. Effect of salinity on *Cuscuta campestris* parasitism. 15th World Congress on Parasitic Plants, 30th June–5th July 2019, Amsterdam, the Netherlands. Book of abstracts p. 123.
8. Denitsa Teofanova, Antonii Kaukov, **Lyuben Zagorchev**. Salinity effect on germination of parasitic (*Cuscuta campestris*) and nonparasitic (*Ipomoea purpurea*) members of Convolvulaceae family. 3rd International Conference on Plant Biology. 9-12 June, 2018, Belgrade, Serbia. Book of abstracts pp.60-61.
9. Denitsa Teofanova, Junmin Li, Ivanela Albanova, Anita Tosheva, Mariela Odjakova, **Lyuben Zagorchev**. Antioxidant response of *Arabidopsis thaliana*, subjected to simultaneous salinity stress and *Cuscuta* infection. 3rd International Symposium for Agriculture and Food – ISAF 2017, 18-20 October, 2017, Ohrid, Republic of Macedonia. Book of abstracts p. 354.

Национални

1. DENITSA TEOFANOVA, IVANELA ALBANOVA, GEORGI GEORGIEV, **LYUBEN ZAGORCHEV**. Salinity stress response of *Cuscuta campestris* is affected by the host. SCIENTIFIC CONFERENCE “KLIMENT’S DAYS” 5th November 2020 Sofia, Faculty of Biology, Book of Abstracts p. 110
2. IVANELA ALBANOVA, VIKTORIA PETROVA, MARIA STOYANOVA, DENITSA TEOFANOVA, **LYUBEN ZAGORCHEV**. SUSCEPTIBILITY OF MEMBERS OF SOLANACEAE TO CUSCUTA CAMPESTRIS INFECTION. SCIENTIFIC CONFERENCE “KLIMENT’S DAYS” 5th November 2020 Sofia, Faculty of Biology, Book of Abstracts p. 109
3. Alexandra Atanasova, Anelia Traianova, Kristiyana Georgieva, Denitsa Teofanova, Margarita Kouzmanova, Vasilij Goltsev, **Lyuben Zagorchev**. Induction of photosynthetic activity in the non-photosynthetic *Cuscuta campestris* by gall-forming insects *Smycronyx*. YOUTH SCIENTIFIC CONFERENCE “KLIMENT’S DAYS” 8th November, 2019 Faculty of Biology, Sofia University, Sofia, Book of Abstracts p. 54
4. **Lyuben Zagorchev**, Georgi K. Georgiev, Kristiyana Georgieva, Denitsa Teofanova. The host quality is decisive for the early developmental stages and success of the parasitic flowering plant *Cuscuta campestris*. International Scientific Conference “Kliment’s Days”, 8th-9th November, 2018, Sofia, Bulgaria. Book of Abstracts p. 89
5. Anelia Traianova, **Lyuben Zagorchev**, Denitsa Teofanova, Vasilij Goltsev. Changes in the photosynthetic activity of *Arabidopsis* leaves under different salinity levels as measured in vivo by chlorophyll fluorescence. International Scientific Conference “Kliment’s Days”, 8th-9th November, 2018, Sofia, Bulgaria. Book of Abstracts p. 118
6. Ivanela Albanova, **Lyuben Zagorchev**, Denitsa Teofanova. Top-down effect of stem parasitic plant *Cuscuta campestris* Yunck. on the roots of its host, *Arabidopsis thaliana* L. under different salinity levels. XXVIII International Scientific Conference “Bulgarian Presidency of the Council of the European Union – innovation and prosperity”. 31 May – 1 June. 2018. Starozagorski mineralni bani. Book of abstracts p. 60.

7. Kristiyana Georgieva, **Lyuben Zagorchev**, Denitsa Teofanova. Photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism dynamics at early growth stage in the non-photosynthetic parasitic plant *Cuscuta campestris* Yunck. XXVIII International Scientific Conference “Bulgarian Presidency of the Council of the European Union – innovation and prosperity”. 31 May – 1 June. 2018. Starozagorski mineralni bani. Book of abstracts p. 61
8. Antoniy Kaukov, Denitsa Teofanova, Ivanela Albanova, Anita Tosheva, Mariela Odjakova, **Lyuben Zagorchev**. *Smicronyx* galls on *Cuscuta campestris* show differential isoenzymes profile. Youth Scientific Conference “Kliment’s Days” 16-17 November 2017 Sofia Faculty of Biology Book of Abstracts p. 54
9. Beifen Yang, Xue Zhang, **Lyuben Zagorchev**, Junmin Li, Frank Hagedorn, Mai-He Li. Rhizosphere soil microbial communities of invasive *Alternanthera philoxeroides* changed by parasitism of *Cuscuta australis* benefit the growth of neighbouring plant. Youth Scientific Conference “Kliment’s Days” 16-17 November 2017 Sofia Faculty of Biology Book of Abstracts p. 70
10. Denitsa Teofanova, Ivanela Albanova, Kristiyana Marinova, Anita Tosheva, Junmin Li, Mariela Odjakova, **Lyuben Zagorchev** Arabidopsis – Eutrema pair as model host system to study salt stress response in parasitic plants. XXVII International Scientific Conference 65 Years Maritsa-Iztok. Starozagorski mineralni bani, 1st -2nd June, 2017, Book of abstracts p. 6

Защитени дипломни работи в ОКС Бакалавър и ОКС Магистър, на които дисертантът е научен ръководител (в получер шрифт) или ръководител на проект, по който е финансирана разработката

1. Александра Юлиянова Атанасова (2022) Популационно разнообразие и влияние върху гостоприемника на интродуцирания инвазивен вид *Cuscuta campestris* в България, ОКС Магистър
2. **Виктория Петрова Петрова (2021) Сравнителна оценка на паразитния потенциал на *Cuscuta campestris* и *Cuscuta europaea* върху икономически значими културни растения, ОКС Бакалавър**
3. **Яна Ивайлова Лозанова (2021) Взаимодействие между паразитно растение *Cuscuta campestris* и инвазивни растителноядни насекоми *Metcalfa pruinosa*, едновременно паразитиращи върху *Arabidopsis thaliana* в условия на солеви стрес, ОКС Бакалавър**
4. **Георги Кирчев Георгиев (2020) Отговор на солеви стрес на *Cuscuta campestris* в зависимост от гостоприемника, ОКС Магистър**
5. Анелия Траянова (2019) Влияние на заразяването от паразита *Cuscuta campestris* върху фотосинтетичния апарат в листа от *Ipotomea tricolor* изследвано *in vivo* с хлорофилна флуоресценция, ОКС Магистър
6. Александра Юлиянова Атанасова (2019) Функционално характеризиране на фотосинтетичния потенциал на гали на *Smicronyx* sp. върху *Cuscuta campestris*, ОКС Бакалавър
7. **Иванела Андреева Албанова (2019) Взаимоотношения между паразитното растение *Cuscuta campestris* Yunck. и различни видове гостоприемници в условия на солеви стрес, ОКС Магистър**
8. **Стефан Емилов Георгиев (2019) Патогенеза-свързани белтъци в *Arabidopsis thaliana* L., подложен на комбинация от абиотични и биотични стресови фактори, ОКС Бакалавър**

9. **Георги Кирчев Георгиев (2018) Метаболитни и функционални различия на гали от *Smicronyx* sp. върху паразитното растение *Cuscuta campestris*, ОКС Бакалавър**
10. **Антоний Величков Кауков (2018) Ефект на солевия стрес върху покълването при паразитния (*Cuscuta campestris*) и непаразитния (*Ipomoea purpurea*) представители на семейство Convolvulaceae, ОКС Бакалавър**
11. **Иванела Андреева Албанова (2017) Влияние на паразитното растение *Cuscuta campestris* Yunck. върху *Arabidopsis thaliana* L. в условия на солеви стрес, ОКС Бакалавър**

Литература

1. Acosta-Martinez V, Cano A, Johnson J (2018) Simultaneous determination of multiple soil enzyme activities for soil health-biogeochemical indices. *Applied soil ecology* 126:121-128
2. Albert M, Belastegui-Macadam X, Kaldenhoff R (2006) An attack of the plant parasite *Cuscuta reflexa* induces the expression of attAGP, an attachment protein of the host tomato. *The Plant Journal* 48 (4):548-556
3. Amini M, Saify Nabiabad H, Deljou A (2017) Host-synthesized cysteine protease-specific inhibitor disrupts *Cuscuta campestris* parasitism in tomato. *Plant Biotechnology Reports* 11 (5):289-298
4. Baráth K (2021) Effect of species environment on host preference of *Cuscuta campestris*. *Plant Ecology* 222 (9):1023-1032
5. Barath K, Csiky J (2012) Host range and host choice of *Cuscuta* species in Hungary. *Acta Botanica Croatica* 71 (2):215-227
6. Bardgett RD, Smith RS, Shiel RS, Peacock S, Simkin JM, Quirk H, Hobbs PJ (2006) Parasitic plants indirectly regulate below-ground properties in grassland ecosystems. *Nature* 439 (7079):969-972
7. Birschwilks M, Haupt S, Hofius D, Neumann S (2006) Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *Journal of Experimental Botany* 57 (4):911-921
8. Bleischwitz M, Albert M, Fuchsbauer H-L, Kaldenhoff R (2010) Significance of Cuscutain, a cysteine protease from *Cuscuta reflexa*, in host-parasite interactions. *BMC Plant Biology* 10 (1):1-8
9. Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2):93-99
10. Borsics T, Lados M (2002) Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family PR-10 in alfalfa. *Journal of Experimental Botany* 53 (375):1831-1832
11. Braukmann T, Kuzmina M, Stefanović S (2013) Plastid genome evolution across the genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): two clades within subgenus *Grammica* exhibit extensive gene loss. *Journal of experimental botany* 64 (4):977-989
12. Bungard RA (2004) Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. *BioEssays* 26 (3):235-247
13. Chutipaijit S, Cha-Um S, Sompornpailin K (2009) Differential accumulations of proline and flavonoids in indica rice varieties against salinity. *Pak J Bot* 41 (5):2497-2506
14. Dawson JH, Musselman L, Wolswinkel P, Dörr I (1994) Biology and control of *Cuscuta*. *Reviews of Weed Science* 6:265-317
15. Demirbas S, Vlachonassios K, Acar O, Kaldis A (2013) The effect of salt stress on *Arabidopsis thaliana* and *Phelipanche ramosa* interaction. *Weed Research* 53 (6):452-460
16. Dikova B (2006) Establishment of tobacco rattle virus (TRV) in weeds and *Cuscuta*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20 (3):42-48
17. Elena López-Calcagno P, Omar Abuzaid A, Lawson T, Anne Raines C (2017) *Arabidopsis* CP12 mutants have reduced levels of phosphoribulokinase and impaired function of the Calvin–Benson cycle. *Journal of Experimental Botany* 68 (9):2285-2298
18. Fahad MA-H, Fahad A-Q, Salim K (2011) Assessment of genetic diversity among Indian populations of *Cuscuta reflexa* based on ITS sequences of nrDNA. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (7):1217-1223
19. Förste F, Mantouvalou I, Kanngießler B, Stosnach H, Lachner LA-M, Fischer K, Krause K (2020) Selective mineral transport barriers at *Cuscuta*-host infection sites. *Physiologia Plantarum* 168 (4):934-947. doi:<https://doi.org/10.1111/ppl.13035>
20. Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology* 155 (1):2-18
21. Frost A, Lopez-Gutierrez JC, Purrington CB (2003) Fitness of *Cuscuta salina* (Convolvulaceae) parasitizing *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae) grown under different salinity regimes. *American journal of botany* 90 (7):1032-1037
22. Ghars MA, Parre E, Debez A, Bordenave M, Richard L, Lepout L, Bouchereau A, Savouré A, Abdelly C (2008) Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *Journal of plant physiology* 165 (6):588-599
23. Giron D, Huguet E, Stone GN, Body M (2016) Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *Journal of Insect Physiology* 84:70-89
24. Grover A (2012) Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31 (1):57-73
25. Harvey T (1966) Aphids, dodder (*Cuscuta campestris*), and dodder–host plant interrelations. *Annals of the Entomological Society of America* 59 (6):1276-1282

26. Hegener V, Körner M, Albert M (2017) Plants under stress by parasitic plants. *Current opinion in plant biology* 38:34-41
27. Hozumi A, Bera S, Fujiwara D, Obayashi T, Yokoyama R, Nishitani K, Aoki K (2017) Arabinogalactan proteins accumulate in the cell walls of searching hyphae of the stem parasitic plants, *Cuscuta campestris* and *Cuscuta japonica*. *Plant and Cell Physiology* 58 (11):1868-1877
28. Isaias RMdS, Carneiro R, Oliveira D, Santos JC (2013) Illustrated and annotated checklist of Brazilian gall morphotypes. *Neotropical Entomology* 42 (3):230-239
29. Jayasuriya KG, Baskin JM, Geneve RL, Baskin CC, Chien C-T (2008) Physical dormancy in seeds of the holoparasitic angiosperm *Cuscuta australis* (Convolvulaceae, Cuscutaceae): dormancy-breaking requirements, anatomy of the water gap and sensitivity cycling. *Annals of Botany* 102 (1):39-48
30. Jeschke W, Hilpert A (1997) Sink-stimulated photosynthesis and sink-dependent increase in nitrate uptake: nitrogen and carbon relations of the parasitic association *Cuscuta reflexa*–*Ricinus communis*. *Plant, Cell & Environment* 20 (1):47-56
31. Jeschke WD, Baig A, Hilpert A (1997) Sink-stimulated photosynthesis, increased transpiration and increased demand-dependent stimulation of nitrate uptake: nitrogen and carbon relations in the parasitic association *Cuscuta reflexa*–*Coleus blumei*. *Journal of Experimental Botany* 48 (4):915-925
32. Jhu M-Y, Farhi M, Wang L, Philbrook RN, Belcher MS, Nakayama H, Zumstein KS, Rowland SD, Ron M, Shih PM (2020) Lignin-based resistance to *Cuscuta campestris* parasitism in Heinz resistant tomato cultivars. [bioRxiv:706861](https://doi.org/10.1101/2020.07.06.706861)
33. Kaiser B, Vogt G, Fürst UB, Albert M (2015) Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. *Frontiers in plant science* 6:45
34. Kazemitabar S, Azoush S, Alikelayeh A (2014) Comparison of RAPD and ISSR molecular markers to determine of genetic diversity in weed dodder (*Cuscuta epithymum* L.). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)* 4 (4):19-26
35. Koch AM, Binder C, Sanders IR (2004) Does the generalist parasitic plant *Cuscuta campestris* selectively forage in heterogeneous plant communities? *New Phytologist* 162 (1):147-155
36. Krause K, Johnsen HR, Pielach A, Lund L, Fischer K, Rose JK (2018) Identification of tomato introgression lines with enhanced susceptibility or resistance to infection by parasitic giant dodder (*Cuscuta reflexa*). *Physiologia plantarum* 162 (2):205-218
37. Lanini W, Kogan M (2005) Biology and management of *Cuscuta* in crops. *International Journal of Agriculture and Natural Resources* 32 (3):127-141
38. Le QV, Tennakoon KU, Metali F, Lim LB, Bolin JF (2015) Impact of *Cuscuta australis* infection on the photosynthesis of the invasive host, *Mikania micrantha*, under drought condition. *Weed Biology and Management* 15 (4):138-146
39. Li D-M, Staehelin C, Wang W-T, Peng S-L (2010a) Molecular cloning and characterization of a chitinase-homologous gene from *Mikania micrantha* infected by *Cuscuta campestris*. *Plant molecular biology reporter* 28 (1):90-101
40. Li J-M, Jin Z-X, Hagedorn F, Li M-H (2014) Short-term parasite-infection alters already the biomass, activity and functional diversity of soil microbial communities. *Scientific reports* 4 (1):1-8
41. Li Z, Huang J, Wang Z, Meng F, Zhang S, Wu X, Zhang Z, Gao Z (2019) Overexpression of *Arabidopsis* nucleotide-binding and leucine-rich repeat genes RPS2 and RPM1 (D505V) confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Frontiers in Plant Science* 10:417
42. Lin H, Lin J (2003) RAPD analysis of four species of *Cuscuta* in Shandong Province. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese Medicinal Materials* 26 (1):8-10
43. Liu W-X, Zhang F-C, Zhang W-Z, Song L-F, Wu W-H, Chen Y-F (2013) *Arabidopsis* Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress. *Molecular plant* 6 (5):1487-1502
44. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15 (12):1-21
45. Marambe B, Wijesundara S, Tennakoon K, Pindenya D, Jayasinghe C (2002) Growth and development of *Cuscuta chinensis* Lam. and its impact on selected crops. *Weed Biology and Management* 2 (2):79-83
46. McNeal JR, Arumugunathan K, Kuehl JV, Boore JL, Depamphilis CW (2007a) Systematics and plastid genome evolution of the cryptically photosynthetic parasitic plant genus *Cuscuta* (Convolvulaceae). *BMC biology* 5 (1):1-19
47. McNeal JR, Kuehl JV, Boore JL, De Pamphilis CW (2007b) Complete plastid genome sequences suggest strong selection for retention of photosynthetic genes in the parasitic plant genus *Cuscuta*. *BMC Plant Biology* 7 (1):57
48. Mikona C, Jelkmann W (2010) Replication of Grapevine leafroll-associated virus-7 (GLRaV-7) by *Cuscuta* species and its transmission to herbaceous plants. *Plant disease* 94 (4):471-476

49. Nickrent DL, Musselman LJ (2004) Introduction to parasitic flowering plants. *The Plant health instructor* 13 (6):300-315
50. Ntoukakis V, Gimenez-Ibanez S (2016) Parasitic plants—A CuRe for what ails thee. *Science* 353 (6298):442-443
51. Parker C (2012) Parasitic weeds: a world challenge. *Weed science* 60 (2):269-276
52. Pintó-Marijuan M, Munné-Bosch S (2014) Photo-oxidative stress markers as a measure of abiotic stress-induced leaf senescence: advantages and limitations. *Journal of Experimental Botany* 65 (14):3845-3857
53. Price GD, Evans JR, von Caemmerer S, Yu J-W, Badger MR (1995) Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂ assimilation via a reduction in ribulose biphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta* 195 (3):369-378
54. Renault S, Wolfe S, Markham J, Avila-Sakar G (2016) Increased resistance to a generalist herbivore in a salinity-stressed non-halophytic plant. *AoB Plants* 8
55. Runyon JB, Mescher MC, De Moraes CM (2008) Parasitism by *Cuscuta pentagona* attenuates host plant defenses against insect herbivores. *Plant Physiology* 146 (3):987-995
56. Runyon JB, Mescher MC, Felton GW, De Moraes CM (2010) Parasitism by *Cuscuta pentagona* sequentially induces JA and SA defence pathways in tomato. *Plant, cell & environment* 33 (2):290-303
57. Sahm A, Pfanz H, Grünsfelder M, Czygan FC, Proksch P (1995) Anatomy and phenylpropanoid metabolism in the incompatible interaction of *Lycopersicon esculentum* and *Cuscuta reflexa*. *Botanica Acta* 108 (4):358-364
58. Santos Isaias RMd, Oliveira DCd, Silva Carneiro RGd, Kraus JE (2014) Developmental anatomy of galls in the Neotropics: arthropods stimuli versus host plant constraints. In: *Neotropical insect galls*. Springer, pp 15-34
59. Saric-Krsmanovic M, Bozic D, Radivojevic L, Gajic Umiljendic J, Vrbnicanin S (2018) Impact of field dodder (*Cuscuta campestris* Yunk.) on chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of alfalfa and sugar beet plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 65 (5):726-731
60. Sarker U, Oba S (2018) Augmentation of leaf color parameters, pigments, vitamins, phenolic acids, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus tricolor* under salinity stress. *Scientific reports* 8 (1):1-9
61. Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 12 (9):938-954
62. Shen H, Hong L, Ye W, Cao H, Wang Z (2007) The influence of the holoparasitic plant *Cuscuta campestris* on the growth and photosynthesis of its host *Mikania micrantha*. *Journal of Experimental Botany* 58 (11):2929-2937
63. Shen S, Xu G, Clements DR, Jin G, Liu S, Yang Y, Chen A, Zhang F, Kato-Noguchi H (2016) Suppression of reproductive characteristics of the invasive plant *Mikania micrantha* by sweet potato competition. *BMC ecology* 16 (1):1-9
64. Sherman TD, Pettigrew WT, Vaughn KC (1999) Structural and immunological characterization of the *Cuscuta pentagona* L. chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 40 (6):592-603
65. Singh A, Singh M (1997) Incompatibility of *Cuscuta* haustoria with the resistant hosts—*Ipomoea batatas* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. *Journal of plant physiology* 150 (5):592-596
66. Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP, Prasad SM (2016) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in plant science* 6:1143
67. Srivastava S, Nighojkar A, Kumar A (1994) Multiple forms of pectin methylesterase from *Cuscuta reflexa* filaments. *Phytochemistry* 37 (5):1233-1236
68. Srivastava S, Tripathi RD, Dwivedi UN (2004) Synthesis of phytochelatin and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*—an angiospermic parasite. *Journal of plant physiology* 161 (6):665-674
69. Tajdoost S, Khavari-Nejad RA, Meighani F, Zand E, Noormohammadi Z (2013) Evaluation of genetic diversity and differentiation of *Cuscuta campestris* (field dodder) ecotypes using ISSR markers. *Food Agric Environ* 11 (1):1072-1075
70. Van der Kooij T, Krause K, Dörr I, Krupinska K (2000) Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta* 210 (5):701-707
71. Vogel A, Schwacke R, Denton AK, Usadel B, Hollmann J, Fischer K, Bolger A, Schmidt MH-W, Bolger ME, Gundlach H (2018) Footprints of parasitism in the genome of the parasitic flowering plant *Cuscuta campestris*. *Nature communications* 9 (1):1-11

72. Vurro E, Ruotolo R, Ottonello S, Elviri L, Maffini M, Falasca G, Zanella L, Altamura MM, di Toppi LS (2011) Phytochelatins govern zinc/copper homeostasis and cadmium detoxification in *Cuscuta campestris* parasitizing *Daucus carota*. *Environmental and Experimental Botany* 72 (1):26-33
73. Wallace A, Romney E, Alexander G (1978) Mineral composition of *Cuscuta nevadensis* Johnston (dodder) in relationship to its hosts. *Plant and Soil* 50 (1):227-231
74. Westwood JH, Yoder JI, Timko MP, Depamphilis CW (2010) The evolution of parasitism in plants. *Trends in plant science* 15 (4):227-235
75. Ye M, Li Y, Yan Y, Liu H, Ji X (2002) Determination of flavonoids in Semen *Cuscutae* by RP-HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 28 (3-4):621-628
76. Yokoyama R, Yokoyama T, Kaga Y, Oono Y, Nishitani K (2020) Characterization of *Cuscuta campestris* cell wall genes responsible for the haustorial invasion of host plants. *Sci J Kanagawa Univ* 32:21-26
77. Zhekova E, Petkova D, Ivanova I (2014) *Smicronyx smreczynskii* F. Solari, 1952 (Insecta: Curculionidae): Possibilities for biological control of two *Cuscuta* species (Cuscutaceae) in district of Ruse. *Acta Zool Bulg* 66 (3):431-432
78. Zhuang H, Li J, Song J, Hettenhausen C, Schuman MC, Sun G, Zhang C, Li J, Song D, Wu J (2018) Aphid (*Myzus persicae*) feeding on the parasitic plant dodder (*Cuscuta australis*) activates defense responses in both the parasite and soybean host. *New Phytologist* 218 (4):1586-1596
79. Аникин В, Никельшпарг М, Никельшпарг Э, Конюхов И (2017) Фотосинтетическая активность у повилики *Cuscuta campestris* (Convolvulaceae) при заселении растения галлообразователем-долгоносиком *Smicronyx smreczynskii* (Coleoptera, Curculionidae). *Известия Саратовского университета Новая серия Серия Химия Биология Экология* 17 (1):4

