

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

BIOSTIMULANȚI PENTRU PLANTE PE BAZĂ DE (BIO)MIMETICI DE STRIGOLACTONE

Doctorand: **BALA S. Ioana-Alexandra**

Conducător științific: **CS I Dr. OANCEA Florin**

CUVINTE-CHEIE: mimici de strigolactone, fungi fitopatogeni, *Trichoderma*

Strigolactonele (SLs) sunt derivați naturali ai carotenoizilor, eliberați de plante în sol ca semnale de comunicare. SL-urile acționează ca molecule de semnalizare pentru germinarea semințelor de plante parazite, și pentru ramificarea hifelor fungilor arbusculari de micoriză (AM). Acestea sunt fitohormoni activi în controlul arhitecturii diferitelor organe ale plantelor, jucând astfel rol important în ceea ce privește răspunsurile plantelor la stresuri biotice și abiotice.

Strigolactonele (SL-urile) au potențialul de a fi utilizate în agricultura durabilă pentru a atenua diferitele stresuri cu care se confruntă plantele. SL-urile naturale, precum și analogii sintetici, sunt dificil de obținut în cantități suficiente pentru aplicații practice. În același timp, strigolactonele fluorescente ar fi utile pentru înțelegerea mecanismului efectelor lor, pe baza tehnicilor de bio-imagistică sau spectroscopie.

Capitolul I, cu titlul "Strigolactonele – factor semnal cu functii multiple" curpinde o analiză bibliografică referitoare la strigolactonele care sunt fitohormoni esențiali în reglarea dezvoltării plantelor și a interacțiunilor cu mediul înconjurător. Aceste molecule funcționează ca semnale chimice care controlează diverse procese, inclusiv ramificarea tulpinilor, creșterea rădăcinilor și răspunsurile la stres. Strigolactonele joacă un rol crucial în simbioza micoriziană, facilitând colonizarea rădăcinilor de către fungi benefici. În plus, aceste compuși sunt implicați în apărarea plantelor împotriva agenților patogeni și în adaptarea la condițiile de mediu adverse. Astfel, strigolactonele sunt factori cheie cu funcții multiple, care contribuie la optimizarea creșterii și sănătății plantelor.

Capitolul II, **"Utilizările strigolactonelor sintetice în agricultură"** urmărește înțelegerea faptului că strigolactonele sintetice reprezintă o inovație semnificativă în agricultură, oferind soluții pentru îmbunătățirea creșterii și productivității culturilor. Aceste molecule sunt utilizate pentru a stimula ramificarea și dezvoltarea sistemului radicular, ducând la o absorbție mult mai eficientă a apei și a nutrienților. De asemenea, strigolactonele sintetice pot îmbunătăți rezistența plantelor la stresuri biotice și abiotice, precum seceta și atacurile patogene. De asemenea, ele sprijină simbioza

micorizială, favorizând o interacțiune avantajoasă între rădăcinile plantelor și funghi. Prin utilizarea strigolactonelor sintetice, fermierii pot obține culturi mai robuste și mai rezistente, contribuind la o agricultură sustenabilă și eficientă.

În **capitolul III** intitulat "**Testarea efectelor biologice a unor noi mimici de strigolactone**" s-a investigat efectul unor mimici de strigolactonă, asupra ramificării hifelor și creșterii radiale a mai multor funghi patogeni pentru plante. Nu par să existe informații disponibile despre impactul mimicilor asupra creșterii și morfologiei coloniilor, conform cunoștințelor noastre. Primele tulpini testate au fost reprezentate de *Colletotrichum acutatum* și *Sclerotinia minor*. Rezultatele noastre au demonstrat că, compusul mimetic testat (SL6), care este mai ușor de sintetizat comparativ cu analogii de strigolactonă, are același efect ca analogul sintetic GR24, inducând un răspuns de stres prin ramificarea hifelor și inhibând creșterea fitopatogenilor. Rezultatele sunt discutate având în vedere importanța lor atât pentru studiile fundamentale (rolul și receptorul inelului D al SL-urilor în funghi patogeni pentru plante), cât și pentru aplicațiile practice - modelarea rizomicrobiomului plantelor.

Într-un alt studiu, au fost preparați noi mimici de SL fluorescente (SL20, SL21, SL26 și SL27). Activitatea structurală, spectroscopică și biologică a noilor mimici de SL asupra fitopatogenilor a fost investigată și comparată cu mimicii de SL fluorescente sintetizați anterior. Toți mimicii de SL au prezentat efecte similare cu GR24 asupra fitopatogenilor *C. acutatum*, *F. graminearum*, *R. solani* și *S. sclerotium*, indicând adecvarea lor pentru aplicații practice. Modelul activității biologice a depins de specia de fung, de mimicul de SL și de concentrație, și de ordinea hifelor. Această dependență este probabil legată de specificitatea fiecărei interacțiuni receptor-fungic - mimic de SL, care va trebui analizată în profunzime. Pe baza proprietăților biologice și particularităților spectroscopice, un mimic de SL ar putea fi un candidat bun pentru investigații microscopice și spectroscopice.

Într-un alt experiment, strigolactonele biomimetice sintetice au fost preparate în cantități de mai multe grame din produse disponibile comercial. Noii mimetici de strigolactonă au fost testați pe tulpinile fitopatogene reprezentate de *Fusarium graminearum* și *C. acutatum*. Majoritatea tratamentelor cu mimicii de strigolactonă FG-30, FG-31, FG-33, FG-42 au demonstrat un efect inhibitor semnificativ asupra creșterii celor doi funghi fitopatogeni testați, *F. graminearum* și *C. acutatum*. Analiza calitativă a indicat că GR24 și mimicii SL au avut un efect asupra ramificării hifale a *F. graminearum* și *C. acutatum*. Rezultatele sugerează că mimicii SL, în special FG-33 și FG-31, ar putea fi utilizați ca agenți de control pentru fitopatogeni datorită efectelor lor inhibitorii asupra creșterii și ramificării hifale. Studiile viitoare se vor concentra pe elucidarea mecanismelor prin care aceste compuși influențează creșterea și dezvoltarea fungică, precum și pe optimizarea concentrațiilor pentru aplicarea practică în agricultura sustenabilă.

Un altu studiu s-a bazat pe testarea proprietăților biologice ale altui mimetic de strigolactonă SL4. Acest compus prezintă proprietăți fluorescente, dar nu are efecte interesante asupra creșterii și ramificării fungice a *Aspergillus alliaceus*.

S-a mai testat de asemenea și efectul SL6 asupra tulpinii *Trametes versicolor*, dar nu a avut un impact semnificativ asupra ramificării hifelor, iar efectele asupra

diametrului coloniilor au fost minime, cu o ușoară inhibiție observată în principal la concentrații mai scăzute.

În contextul agriculturii moderne, unde bolile cauzate de fungi fitopatogeni reprezintă o problemă majoră, dezvoltarea de noi mimici de strigolactone și evaluarea efectelor acestora asupra fungilor fitopatogeni sunt de o importanță deosebită precum și atenuarea diverselor stresuri cu care se confruntă plantele.

Capitolul IV "Efectul luminii laser și a mimicilor de strigolactone asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor de *Trichoderma*" a fost împărțit în mai multe subcapitole pentru a putea determina efectul tratamentelor atât separat cât și împreună. Studiul efectului mimicilor de strigolactone și al luminii laser asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor de *Trichoderma* poate oferi perspective noi asupra modului în care aceste semnale moleculare și factorii de mediu pot influența comportamentul și eficiența acestui important gen de fungi. Scopul a constat în investigarea efectelor mimicilor de strigolactone și ale luminii laser asupra creșterii și dezvoltării tulpinilor de *Trichoderma*. Prin acest studiu, am dorit să înțelegem mai bine modul în care acești factori influențează fiziologia și comportamentul *Trichoderma*, cu potențiale implicații în aplicarea lor în agricultură și biocontrol. Astfel, primul **subcapitol 4.1** a evidențiat **efectele iradierii cu lumină laser-albastră asupra activităților enzimatică și sporularii *Trichoderma atroviride* cultivată în prezență de pleavă de orez la cantitate redusă**. Lumina este cunoscută pentru impactul său asupra diferitelor aspecte ale *Trichoderma*, cu posibile implicații pentru aplicațiile industriale și agricole. În acest studiu, am investigat iradierea *Trichoderma atroviride* cu lumină albastră folosind un sistem de sursă laser. Am determinat activitățile celulelor și proteazelor și efectele absorbției UV-Vis a culturii filtrate asupra formării, dimensiunii și comportamentului conidiilor și asupra abundenței aparente a clamidosporilor, în funcție de durata iradierii, doza de iradiere și momentul iradierii. Arătăm că efectele asupra activităților enzimatică variază de la pozitive la neutre sau negative. Comparativ cu studiile anterioare, stimularea noastră cu lumină nu prezintă un efect negativ drastic asupra activității celulei (CMC-aze), dar pare să întârzie activitatea maximă în timp. Efectele asupra proteazelor sunt parțial în acord cu singurul studiu anterior raportat privind efectele luminii asupra activității proteazelor. Numărul de conidii crește în urma iradierii, reprezentând un comportament așteptat, și arătăm pentru prima dată, după cunoștințele noastre, că dimensiunile conidiilor și numărul de clamidospori cresc de asemenea. Datele noastre sugerează, de asemenea, că cea mai mare doză a rezultat în aglomerarea conidiilor în jurul interfeței lichid-aer, sugerând un caracter hidrofob crescut.

Al doilea **subcapitol 4.2**, intitulat "**Producția de enzime de către *T. atroviride* în prezența luminii laser albastre: o abordare la scară largă**" a avut ca scop investigarea impactului iradierii asupra miceliului matur crescut pe pleavă de orez și de a ridica procesul la scară mai largă, prin urmare, am incubat mai întâi *Trichoderma* cu pleava de orez timp de 15 zile în recipiente mai mari, urmate de trei iradiere la intervale de timp mai scurte decât în studiul nostru anterior.

În acest studiu, expunerea agentului de bio-control *Trichoderma atroviride* la laser cu lumină albastră a fost realizată de mai multe ori și analizată după diferite intervale de timp în ceea ce privește producția de enzime, conținutul de silicon solubil,

conținutul de fenoli, precum și activitatea antioxidantă. Unghiul de contact precum și tensiunea interfacială au fost, de asemenea, evaluate. Structurile morfologice au fost examinate prin microscopie optică. Am studiat, de asemenea, metabolismul speciilor reactive de oxigen (ROS). Am investigat degradarea matricei lignocelulozice prin spectroscopie în infraroșu transformată Fourier (FTIR), microscopie electronică de scanare cu analiză de dispersie de energie (SEM-EDX) și difracție de raze X (XRD). S-a constatat că expunerea *Trichoderma atroviride* la un laser moderat cu lumină albastră timp de trei runde de 60 de secunde fiecare, la intervale de timp diferite, determină creșterea activității enzimatică. Cel mai înalt nivel al producției de celulază și protează a fost observat după trei runde de iradiere. Unele efecte par să urmeze un comportament de hormeză pentru producția de α -amilază. După determinarea activității LPMO, cele mai bune rezultate au fost obținute într-o cantitate mică înainte de a treia iradiere, dar valorile au fost sub control. În plus, creșterea conținutului de Si solubil în cultura de *Trichoderma* după iradiere a evidențiat o îmbunătățire a descompunerii matricei lignocelulozice a plevei de orez, evidențiată și de analiza FTIR prin reducerea vibrațiilor legăturilor amidice și de hidrogen, precum și de analiza XRD prin creșterea cristalinității plevei de orez incubată cu *T. atroviride* iradiată. De asemenea, iradierea îmbunătățește sporularea *Trichoderma* și modifică forțele de coeziune și aderență ale mediului de creștere.

Subcapitolul 4.3 a urmărit **efectele iradierii cu lumină laser-albastră a cocktail-ului enzimatic de *Trichoderma atroviride* și *Trichoderma harzianum* cultivate în prezență de pleavă de orez la cantitate redusă asupra semințelor de fasole Mung.** După aplicarea tratamentelor, nu s-au observat diferențe semnificative statistic în lungimea radiculelor plantulelor de fasole Mung comparativ cu grupul martor, fie că a fost vorba de absența sau prezența stresului salin. În absența stresului salin, martorul neiradiat a determinat o reducere semnificativă a lungimii hipocotilului. În condiții de stres salin, mediul de cultură a dus la scăderea semnificativă a lungimii hipocotilului, mai ales în cazul tratamentului cu mediul de cultură al tulpinii *T. harzianum* iradiată. Înălțimea plantulelor a fost redusă semnificativ în prezența stresului salin, mai ales în cazul tratamentului cu mediul de cultură al tulpinii *T. harzianum* iradiată. Tratamentele cu mediul de cultură al tulpinilor de *Trichoderma* au influențat semnificativ activitatea α -amilazei în plantulele de fasole Mung. În absența stresului salin, mediul de cultură al tulpinii *T. harzianum* iradiată a crescut semnificativ activitatea α -amilazei. În prezența stresului salin, atât martorul iradiat cât și tratamentele cu mediul de cultură al tulpinilor *T. harzianum* și *T. atroviride* au determinat creșteri semnificative ale activității α -amilazei, cu valori maxime observate la *T. harzianum* iradiată. Activitatea pompei de protoni (PPP): Tratamentele cu mediul de cultură al tulpinilor de *Trichoderma* influențează semnificativ activitatea pompei de protoni în plantulele de fasole Mung. În absența stresului salin, s-a observat un nivel mai crescut de H^+ extracelular în cazul tratamentului cu martor iradiat și mediul de cultură al *T. atroviride* neiradiată, *T. atroviride* iradiată și *T. harzianum* neiradiată. În prezența stresului salin, cele mai mari niveluri de H^+ extracelular s-au înregistrat în cazul tratamentelor cu mediul de cultură al *T. atroviride* și *T. harzianum* iradiate. În absența stresului salin, tratamentele cu mediul de cultură al tulpinilor de *Trichoderma* au crescut

semnificativ conținutul de L-prolină în plantule. În prezența stresului salin, majoritatea variantelor experimentale au menținut niveluri similare de L-prolină comparativ cu absența stresului. Stresul oxidativ, măsurat prin nivelurile de MDA, a crescut în urma tratamentelor cu mediul de cultură al *Trichoderma*, iar iradierea a redus semnificativ MDA în cazul *T. harzianum* iradiată, indicând o potențială adaptare la stresul salin. Analiza intensității fluorescenței ROS cu H₂DCFDA a arătat că, în absența stresului salin, tratamentele cu martor iradiat și neiradiat au crescut cantitatea de ROS intracelulare. În prezența stresului salin, iradierea tulpinilor a avut un efect biostimulant, reducând semnificativ ROS, în special în cazul *T. atroviride* iradiată și *T. harzianum* iradiată. Analiza rădăcinilor de fasole Mung tratate cu sare și medii de cultură conținând tulpinile de interes a indicat o reducere a formării speciilor reactive de oxigen ($\cdot\text{O}_2^-$), evidențiată prin intensitatea scăzută a culorii formate de NBT. Tratamentele cu fungii de interes au avut un efect biostimulant, diminuând impactul negativ al stresului salin, sugerând potențialul benefic al acestor tratamente în gestionarea stresului oxidativ indus de sare.

Subcapitolul 4.4 a urmărit **efectele mimicilor de strigolactone fluorescente asupra tulpinilor de *Trichoderma***. Au fost testate 6 tulpini de *Trichoderma*. Toate SL-urile testate au avut efect asupra abundenței ramificării hifelor, mai puțin SL 21 asupra *T. harzianum*, și *T. atroviride* la concentrații mai mari. Referitor la diametrul coloniilor, s-a văzut că anumite strigolactone în special mimicul SL 21 a stimulat ușor creșterea acestuia pentru tulpinile *T. asperellum* T36 și *T. harzianum* Td50b. Din păcate nu s-a putut efectua o măsurătoare pentru diametrul celor 4 tulpini rămase *Trichoderma atroviride* P1 ATCC 74058, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma harzianum* T22 (ATCC 2084), *Trichoderma harzianum* T95 (ATCC 6085) deoarece hifele acopereau aproape întreaga placă în a 3-a zi de la incubare. Testarea fungilor s-a realizat în 2 etape, iar pentru tulpinile din urmă (*T. asperellum* T36 și *T. harzianum* Td50b), creșterea radială a fost măsurată în a doua zi de la incubare.

Ultimul **subcapitol 4.5, "Efectele luminii laser albastre și a mimicilor de strigolactone fluorescente asupra tulpinilor de *Trichoderma*"**, descrie modul în care culturile sub o diferită lungime de undă a luminii, dar și în prezența strigolactonelor afectează comportamentul tulpinilor de *Trichoderma* oferind date despre creșterea radială dependentă de lumină ± strigolactone, comportamentul de conidiere și activitățile micoparazitice. De asemenea, a fost evaluată și umectabilitatea sporilor. Acest studiu a arătat că atât *T. asperellum* T36 cât și *T. harzianum* Td50b sunt capabile să simtă și să răspundă la diferiți stimuli cum ar fi mimicii de strigolactone sau tratamentele cu lumină laser albastră. Acești stimuli au avut un impact asupra diferențierii, a activității micoparazitare, dar și a caracterului de umectabilitate al sporilor. Dacă în urma testului cu toluen cele două tratamente au amplificat caracterul hidrofob al sporilor, se pare că analizele ce au avut la bază determinarea unghiurilor de contact și a tensiunii intrafaciale au condus la ideea că sporii ar avea mai degrabă un caracter amfifil.

Capitolul V intitulat **"Efectele de biostimulant ale clamidosporilor de *Trichoderma*, aplicați singuri sau împreună cu mimici de strigolactone"** este dedicat în vederea investigării efectelor biostimulante ale clamidosporilor de *Trichoderma* asupra plantelor, atunci când sunt aplicați singuri sau în combinație cu mimici de

strigolactone. Studiul își propune să determine modul în care acești factori pot influența creșterea și dezvoltarea plantelor, precum și interacțiunile dintre plante și microorganismele din sol.

Mai multe strategii promovează colonizarea filosferei de către tulpinile de *Trichoderma* benefice pentru plante, origine din sol. Una dintre aceste strategii este pulverizarea foliară cu suspensii care conțin cantități mari de clamidospori—spori cu structuri de perete celular gros care îi fac foarte rezistenți la condiții de mediu dure. Biomasa de *Trichoderma* a fost produsă prin cultivare pe un mediu pe bază de mălai și comparată cu biomasa produsă pe Potato Dextrose Broth (PDB) prin analize microscopice și termogravimetrice. Analizele au relevat un conținut crescut de clamidospori și o termostabilitate mai mare în biomasa fungică produsă pe mediu cu mălai. Suspensia de *Trichoderma* bogată în clamidospori a fost pulverizată pe frunzele de castravete amar (*Momordica charantia*) la două concentrații de inoculant. Efectul acestor tratamente asupra parametrilor fiziologici ai plantei, pigmentilor fotosintetici din frunze, conținutului de polifenoli și flavonoide, activităților antioxidante ale frunzelor și fructelor și a producției a fost comparat cu martorul (plante pulverizate cu apă) și cu tratamentul experimental care a implicat pulverizarea cu propagule produse în PDB. Efectul suspensiilor bogate în clamidospori asupra parametrilor fiziologici ai plantei a fost mai pronunțat și de lungă durată în comparație cu celelalte tratamente. Tratamentul cu suspensie bogată în clamidospori a sporit acumularea de polifenoli și flavonoide în frunze (cu 17% și 50%) și în fructe (cu 18% și 31%) și a crescut activitatea antioxidantă. Tratamentul cu *Trichoderma* a crescut producția cu +25,33–53,07%. Aplicarea tratamentului foliar cu suspensii de *Trichoderma* nu a modificat citocompatibilitatea extractelor din fructe determinată pe celulele L929.

În acest capitol s-a mai urmărit de asemenea și impactului soluțiilor cu mimici de strigolactone asupra creșterii și dezvoltării plantelor de *Arabidopsis thaliana*. În urma experimentului realizat, am putut spune că cele două SL-uri fluorescente (SL20 și 21) au avut un efect stimulator asupra creșterii plantelor mai mare decât GR24.

În **capitolul VI** sunt expuse concluziile principale, inovațiile identificate și posibilele direcții pentru aplicarea rezultatelor obținute în cadrul acestei teze. Ca aspecte inovatoare, sunt evidențiate următoarele: investigarea activității a mai multor mimici de strigolactonă, pentru care nu sunt date disponibile cu vedere la efectul acestora asupra creșterii și morfologiei coloniilor de fungi fitopatogeni, precum și *Trichoderma*, din cunoștințele noastre.

Acesta a fost primul studiu care a raportat efectele induse de laserul albastru asupra activităților celulei și proteazei și asupra dimensiunilor conidiilor la *Trichoderma*. De asemenea, iradierea îmbunătățește formarea de clamidospori de *Trichoderma* și modifică forțele de coeziune și aderență ale mediului de creștere.

Un alt aspect inovator a fost utilizarea foliară a unei preparate pe bază de clamidospori de consorțiu *Trichoderma* pe *M. charantia* care promovează colonizarea filosferei și determină un efect biostimulant de lungă durată, fiind mai pronunțat atunci când se aplică biomasa de *Trichoderma* cu o abundență mai mare de clamidospori.