

ASPECTE PRIVIND MECANISMELE DE REZISTENȚĂ A FLORII-SOARELUI LA LUPOAIE

DOI: 10.5281/zenodo.3631297
CZU:[575.16+632.5]:633.854.78

Academician **Maria DUCA**,
laureat al Premiului AȘM 2018 „Alexandru Ciubotaru”
E-mail: mduca2000@yahoo.com
Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”

ASPECTS RELATED THE RESISTANCE MECHANISMS OF THE SUNFLOWER AGAINST BROOMRAPE

Summary. The holoparasitic angiosperm broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) is one of the main limiting factors of sunflower production, causing a significant decrease in oil yield and quality. Research and knowledge about the assessment of the broomrape populations, evaluation of sunflower germplasm and genetic control of host-parasite interactions remains crucial point for organizing effective programs to improve plant resistance. From this prospect, the present study highlights a series of particularities of the mechanisms of resistance to biotic factors, as well as of general biological phenomena, based on the pathosystem *H. annuus* L. – *O. cumana* Wallr., using a multidisciplinary and integrative approach, focused on the detection of different aspects related to the complex study of genes, their expression at the level of RNA and proteins, as well as the elucidation of the genetic-molecular and physiological-biochemical basis for phenotypic realization of hereditary factors.

Keywords: sunflower, broomrape, specific resistance, non-specific resistance, hypersensitive response.

Rezumat. Fanerogama parazită – lupoaia (*Orobanche cumana* Wallr.) –, este unul dintre principalii factori limitativi ai producției de floarea-soarelui, cauzând scăderea semnificativă a randamentului și calității uleiului, care variază în funcție de gradul de atac, virulența și agresivitatea raselor. Cercetarea și cunoașterea evoluției din cadrul populațiilor de lupoaie, evaluarea germoplasmei de floarea-soarelui și elucidarea controlului genetic al interacțiunilor gazdă-parazit rămân a fi cruciale pentru organizarea unor programe eficiente de ameliorare a plantelor la rezistență. În acest context, prezentul studiu pune în evidență un șir de particularități ale mecanismelor de rezistență la factorii biotici, precum și ale unor fenomene biologice generale, pe baza patosistemului *H. annuus* L. – *O. cumana* Wallr., valorificând o abordare multidisciplinară și integrativă, axată pe relevarea diferitor aspecte ce țin de studiul complex al genelor, de expresia acestora la nivel de ARN și proteine, precum și de elucidarea bazelor genetico-moleculare și fiziologo-biochimice de realizare fenotipică a factorilor ereditari.

Cuvinte-cheie: floarea-soarelui, lupoaie, rezistență specifică, rezistență nespecifică, răspuns hipersensitiv.

INTRODUCERE

Datorită apariției și dezvoltării noilor tehnologii, succeselor în ameliorarea asistată de marcheri, extinderii semnificative a suprafețelor cultivate, irigații și utilizării altor resurse naturale, în ultimele decenii producția agricolă la nivel mondial a crescut semnificativ, practic dublându-se în perioada 1960–2018. Cu toate acestea, sectorul agricol, inclusiv ramura de creștere și cultivare a florei-soarelui, se confruntă cu multiple riscuri naturale, în special, cu expansiunea unor boli și dăunători care cauzează anual pierderi de până la 40 % din producție.

În condițiile tehnologiilor actuale, agroecosistemul florei-soarelui cuprinde un complex de agenți fitopatogeni, în mare măsură, comuni pentru țările ce cultivă această plantă oleaginoasă. Cele mai devastatoare boli sunt provocate de atacul ciupercilor fitopatogene:

Plasmopara halstedii (mana), *Sclerotinia sclerotiorum* (putregaiul alb), *Botrytis cinerea* (putregaiul cenușiu) și de fanerogama parazită - lupoaia (*Orobanche cumana* Wallr.) [1]. Pe lângă acestea, o serie de boli, ca pătarea neagră (*Phoma* sp.), rugina (*Puccinia helianthi*), vestejirea (*Verticillium dahliae*), putrezirea rădăcinilor și tulpinilor (*Macrophomina phaseoli*), pot constitui un pericol potențial, fiind semnalate tot mai des în culturile de floarea-soarelui [2].

O situație similară se atestă la nivelul Republicii Moldova, unde floarea-soarelui, fiind principala sursă de ulei utilizat în alimentare, se plasează pe locul trei după porumb și grâu. Datorită profitabilității culturii în ultimii ani s-au extins considerabil suprafețele ocupate de floarea-soarelui (cca 370 mii ha), acestea depășind esențial cota limită admisă în asolamente. Exploatarea irațională a terenurilor, nerespectarea termenilor de rotație a culturilor în asolamente, în jonc-

țiune cu influența factorilor extremi de mediu determinați de actualele schimbări climatice, au contribuit la răspândirea și sporirea agresivității diferitor agenți patogeni [3].

Principalul factor limitativ al producției de floarea-soarelui este lupoaia, care în ultimii 10-15 ani se remarcă prin apariția noilor rase cu agresivitate sporită și extinderea spre noi areale geografice. Astfel, dacă anterior patogenul era răspândit, în special, în zonele centrale și de Sud-Est ale Republicii Moldova [4], actualmente, lupoaia este semnalată inclusiv în partea de nord a țării [5]. Această plantă parazit cauzează pierderi de productivitate, conducând la scăderi semnificative ale randamentului și calității uleiului, care variază în funcție de gradul de atac, virulența și agresivitatea raselor.

La floarea-soarelui se disting opt rase fiziologice (A - H) de lupoaie și opt gene dominante (*Or1* - *Or8*), care asigură rezistența monogenică (verticală, oligogenică) a culturii bazată pe principiul genă-pentru-genă [6]. De remarcat însă că acest tip de rezistență și mecanismele specifice determinate de interacțiunea între genele *Or* ale plantei gazdă și genele *Avr* (*Avirulence*) ale lupoaiei [7], care declanșează activarea unor cascade de semnalizare și asigură răspunsul de apărare este caracteristică, în special, pentru primele cinci rase ale patogenului [8]. Odată cu apariția unor rase mai agresive (F-H) se manifestă un caracter poligenic de rezistență, determinat de efectul cumulativ al unui șir de gene de rezistență, atât dominante, cât și recesive [9]. Astfel, interacțiunea *Helianthus annuus* L. - *Orobancha cumana* Wallr. constituie o formă de interrelații apărută pe parcursul co-evoluției acestor două specii, reprezentând un important model de studiu al rezistenței.

Deși existența factorilor genetici în cadrul formelor de cultură și al speciilor sălbatice (*Helianthus maximiliani* Schrader, *H. tuberosum* L., *H. grosseserratus* Martens, *H. divaricatus* L. etc. [10]) a facilitat eforturile amelioratorilor, obținerea unei rezistențe absolute este extrem de dificilă. Această problemă este determinată, pe de o parte, de evoluția rapidă a raselor de lupoaie, iar pe de altă parte - de cunoașterea insuficientă a rolului funcțional al genelor *Or*, astfel încât se impune analiza complexă a interacțiunii dintre agentul patogen și gazdă, relație aflată într-o strânsă dependență de particularitățile fiziologice ale parazitului (afinitate, agresivitate și virulență), de caracteristicile plantei gazdă (rezistență nespecifică, specifică și indusă), precum și de acțiunea factorilor de mediu.

O atenție deosebită în programele de ameliorare se acordă inclusiv obținerii hibridilor ce posedă rezistență nespecifică, numită și generală sau comună, care se manifestă în mod egal față de toate rasele sau bio-

tipurile agentului patogen, fiind considerată cea mai durabilă și stabilă [11; 12]. Rezistența nespecifică a florii-soarelui la lupoaia este determinată de activarea a două tipuri de mecanisme *pre-haustoriale* și *post-haustoriale* [13], primul acționând la nivelul cortexului sau endodermei plantei gazdă prin fortificarea pereților celulari și blocarea patogenului [14], iar cel de-al doilea inițiindu-se după pătrunderea haustorului în cilindrul central [15-17].

Complexitatea mecanismelor de apărare impune adoptarea unor abordări multidisciplinare și integrative axate pe relevarea diferitor aspecte ce țin de studiul complex al genelor, de expresia acestora la nivel de ARN și proteine, precum și de elucidarea bazelor genetico-moleculare și fiziologo-biochimice de realizare fenotipică a factorilor ereditari. Din aceste considerente, o prioritate strategică și metodologică a cercetărilor prezentate constituie identificarea mecanismelor genetico-moleculare și fiziologice ale rezistenței și elucidarea unor noi aspecte ale fenomenelor biologice generale pe baza patosistemului *H. annuus* L. - *O. cumana* Wallr.

METODOLOGIA CERCETĂRILOR

Interacțiunea gazdă-parazit a fost studiată pe modelul patosistemului *H. annuus* L. - *O. cumana* Wallr. atât sub aspectul particularităților fiziologice ale parazitului, care se reflectă prin afinitate, agresivitate și virulență, cât și cele ale plantei gazdă, determinate de mecanismele de rezistență specifică, nespecifică și indusă. Răspunsul defensiv al florii-soarelui a fost analizat multilateral, implicând metode complexe și specifice (bioinformatică, morfologice, fiziologice, biochimice și moleculare) de evaluare la fiecare nivel de organizare (genă, celulă, organ, țesut, organism).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Complexitatea mecanismelor de apărare impune adoptarea unor abordări integrative axate pe cuantificarea la nivel genic și proteic a principalelor enzime implicate în biosinteza fenilpropanoizilor și menținerea statutului redox. Astfel, în scopul relevării unor aspecte ale rezistenței nespecifice a fost realizat un studiu integrativ care a debutat cu analize bioinformatică, urmat de evaluarea profilelor transcriptomice ale genelor, asociate interconexiunii dintre planta gazdă și patogen în sistemul *H. annuus* L. - *O. cumana* Wallr., la diferite faze ontogenetice ale parazitului, corelate cu investigații biochimice (activitatea enzimelor implicate în mecanismele defensive) și histochimice ale țesutului radicular și foliar, la genotipuri rezistente și sensibile de floarea-soarelui.

Rezultatele selectării secvențelor implicate în rezistența la lupoaie [18]

Codul de acces	Descrierea	Sursa
Secvențe de ADN		
GM719388	Sequence 10 from Patent WO2008083198	construct sintetic
Secvențe de ARNm		
DQ837214	glucan synthase-like 4	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
DQ837213	glucan synthase-like 3	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
DQ837212	glucan synthase-like 2	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
DQ837211	glucan synthase-like 1	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
AY899921	methionine synthase	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
AY899920	glutathione S-transferase (gst)	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
AY899919	quinone-oxidoreductase	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
AY094064	elongation factor 1 alpha	<i>Helianthus annuus x Helianthus debilis</i>
AF071887	chalcone synthase (CHS)	<i>Helianthus annuus</i> L.
AF074401	chalcone synthase (CHS)	<i>Orobancha cumana</i> Wallr.

Studii bioinformatică. Aplicarea instrumentelor bioinformatică de cercetare a permis identificarea unor secvențe nucleare și a proteinelor, potențial implicate în mecanisme nespecifice de rezistență a floării-soarelui față de lupoaie.

Astfel, prin valorificarea cuvintelor-cheie **Orobancha Resistance** în bazele de date biologice, au fost identificate 20 de secvențe nucleotidice (10 secvențe ADN și 10 secvențe ARNm), asociate răspunsului defensiv a floării-soarelui față de *Orobancha cumana* Wallr. (tabelul 1).

Secvențele ADN detectate au demonstrat similitudine pentru gena EF575487, care codifică precursorul D- α -fosfolipazei, formată din 2653 de nucleotide, pe când secvențele ARNm reprezintă genele pentru un șir de enzime cu rol în răspunsul de apărare (glucan sintaza, metionin sintaza, glutatation S-transferaza, quinon oxidoreductaza, calcon sintaza).

Același studiu, realizat după cuvintele-cheie **Sunflower Defensin**, a permis să identificăm șase sec-

vențe complete sau parțiale de ARNm, cinci dintre care (AF364865, AF178635, AF178634, AF141132, AF141131) se referă la floarea-soarelui (tabelul 2). Cea mai specifică a fost secvența polipeptidică AAM27914 (ARNm AF364865), identificată ca *HaDef1*, pentru care a fost demonstrată expresia abundentă la nivel de rădăcini [19; 20].

Pentru înțelegerea succesiunii de evenimente care se produc pe parcursul expresiei diferențiate și realizării fenotipice a genelor a fost realizat un studiu, ce ține de caracterizarea structurală și analiza dinamicii rețelelor reglatoare care se pot stabili între gene, factori de transcripție, proteine structurale și funcționale.

În scopul creării rețelelor de gene și rețelelor proteice întru identificarea interacțiunilor dintre acestea și căile de semnalizare la invazia patogenului, ca model a fost utilizat genomul secvențiat al plantei *Arabidopsis thaliana*, în Cytoscape. Genele de interes au fost analizate privind următoarele aspecte: interacțiunea fizică directă, co-expresia, co-localizarea la nivel celular

Rezultatele selectării secvențelor de defensine la floarea-soarelui [18]

Codul de acces	Descrierea	Sursa	Secvența polipeptidică	Funcția
NC_003070	chromosome 1, complete sequence	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
AF364865	defensin mRNA,	<i>Helianthus annuus</i>	AAM27914	HaDef1
AF178635	defensin CUA1 mRNA	<i>Helianthus annuus</i>	AAF72043	SD2 γ -tionină florală specifică
AF178634	defensin SD2 mRNA	<i>Helianthus annuus</i>	AAF72042	
AF141132	defensin mRNA	<i>Helianthus annuus cultivar</i>	AAF66592	
AF141131	defensin mRNA	<i>Helianthus annuus cultivar Line HA 401B</i>	AAF66591	

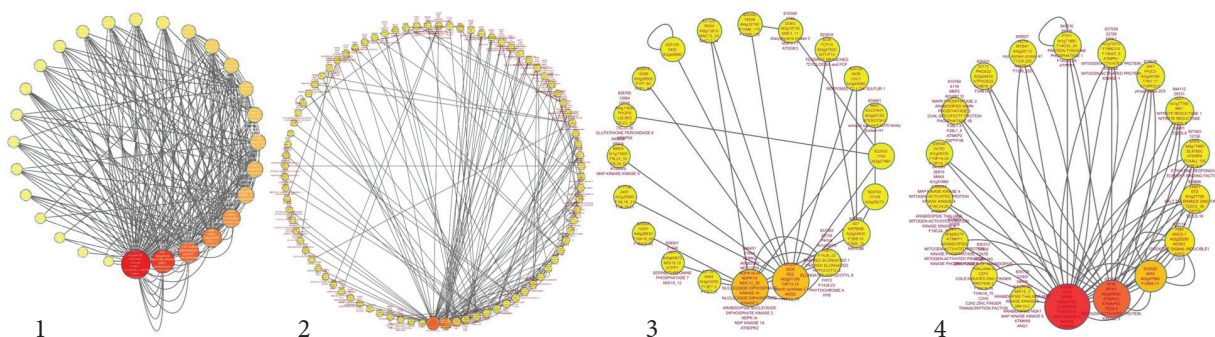


Figura 1. Rețeaua de interacțiune a genelor implicate în răspunsul defensiv al florii-soarelui la lupoaie [21].

sau tisular, domenele proteice comune, predicțiile pe bază de ortologie. În consecință, s-a stabilit o rețea de interacțiune funcțională între 81 de gene implicate în răspunsul defensiv al florii-soarelui la lupoaie, fiind evidențiate patru clustere importante (figura 1):

- **clusterelor 1 și 4**, care includ preponderent gene implicate în calea de semnalizare a proteinchinazei ce declanșează procese celulare fundamentale, cum ar fi creșterea, diferențierea celulară, răspunsul la stres, apoptoza și **mediază**, în special, detectează stimulul biotic și declanșează cascada de semnalizare a chinazei care, la rândul său, reglează proteinele implicate în răspunsul la apărare;

- **clusterelor 2 și 3** includ, în special, gene implicate în metabolismul speciilor reactive de oxigen (SRO), care din cauza toxicității influențează mecanismele de apărare a plantelor față de agenții patogenici **genele cu rol în biosinteza unor carbohidrați** – părți componente ale peretelui celular, precum celuloza, lignina, glucații etc. și care, în cadrul patosistemului *H. annuus* – *O. cumana*, ar putea fi folosite pentru a dezvolta o barieră mecanică împotriva patogenului și a preveni invazia.

Dintre acestea, pentru studiile transcriptomice ulterioare au fost selectate 43 de gene din diferite căi metabolice, precum sistemul antioxidant, căi de semnalizare a acidului jasmonic și salicilic, fortificarea peretelui celular, care posibil prezintă un impact major asupra procesului fiziologic de rezistență cu perspectivă de a fi folosiți în calitate de markeri moleculari pentru programele de ameliorare a florii-soarelui.

Pentru a determina rolul funcțional al genei *Or5*, care conferă rezistență la rasa E de lupoaie, cu utilizarea markerului SCAR RTS05, cartat la distanța de 5,6 cM proximal de gena rezistenței, am evidențiat și am secvențiat produsul de amplificare de 650 pb asociat cu această gena. Analiza structurală a succesiunii nucleotidice a relevat o similaritate de 100 % la toate genotipurile incluse în studiu, ceea ce denotă caracterul filogenetic conservativ al fragmentului genomic studiat.

Analiza hărții de restricție a succesiunii nucleotidice de 650 pb a permis să constatăm prezența a 39

de site-uri de restricție pentru 39 de enzime de digestie, iar procesarea secvenței în bazele de date – o similaritate de 86 % cu gena ce codifică precursorul *proteinei inhibitor a enzimei poligalacturonaza* (PIPG), care inhibă poligalacturonazele secretate de parazit și blochează, astfel, pătrunderea haustoriilor lupoaiei printre celulele epidermale și cortexul plantei-gazdă după atașarea semințelor de *O. cumana* Wallr. [22]. De menționat că familia PGIPs posedă specificitate înaltă față de poligalacturonaze și detectarea acestora ar putea fi utilă în distingerea plantelor-gazdă rezistente de cele sensibile și, eventual, ar putea contribui la înțelegerea specificității față de gazdă.

Astfel, cercetările bioinformatiche au permis identificarea unei serii de compuși – fenilalanin amonia-liaza (PAL), chalcon-sintetaza (CHS), chalcon-izomeraza (CHI) și polifenoxidaza (PPO), care reprezintă enzimele-cheie în calea metabolică a fenilpropanoidelor, genele codificatoare ale enzimelor menționate fiind considerate markeri clasici ai răspunsului plantei la infecție [23; 24].

Totodată, a fost elaborată o schemă ipotetică privind mecanismele genetico-moleculare și fiziologice ce stau la baza interrelației dintre floarea-soarelui și lupoaie, care include componentele implicate în conferirea rezistenței la nivelul peretelui celular, membranelor biologice, căilor metabolice citoplasmatiche. Toate aceste procese complexe de interacțiune se află într-o dependență corelativă cu numeroși indici fiziologici celulari, care intervin în expresia genelor contribuind la formarea patosistemului *H. annuus* L. - *O. cumana* Wallr.

Studii transcriptomice. În scopul cunoașterii mai profunde a bazelor moleculare de interacțiune *Helianthus annuus* L.- *Orobancha cumana* Wallr. a fost studiată expresia în timp real a celor 43 de gene selectate prin studii bioinformatiche la genotipuri sensibile și rezistente de floarea-soarelui, în condiții normale și pe fondal de infecție artificială cu lupoaie, la diferite faze de dezvoltare a patogenului (figura 2a).

Profilele activității genelor variază, în funcție de faza de dezvoltare a patosistemului și de genotip, inclusiv în cadrul aceleiași reacții fiziologice de rezistență. Astfel, în cazul unor genotipuri rezistente, genele implicate în sinteza calozei (*GSL1-4*) se caracterizează printr-o supraexpresie pronunțată (cca 200 %) manifestată, în special, în primele etape de stabilire a conexiunilor mediate chimic cu semințele germinate de lupoaie, pe când în cazul altor forme rezistente de floarea-soarelui se relevă o stare de alarmă exprimată preponderent prin represia sintezei ARNm. În patosistemul constituit cu implicarea genotipului sensibil de *H. annuus* a fost evidențiată intensificarea semnificativă a stării de stres, manifestată prin ritmul accelerat de acumulare a secvențelor transcrise. În cazul dat, sporirea conținutului de transcripți ai unor gene

coincide cu invazia patogenului, iar al altor gene – cu extenuarea plantei gazdă după dezvoltarea lăstarilor. În activitatea anumitor gene asociate sintezei calozei și metabolismului ligninei (*PAL*, *C4H*, *4CL1* și *FAH1*) au fost puse în evidență dependențe corelative pozitive (*GSL2*, *GSL3*) sau negative (*PAL*, *C4H*) la diferite etape ontogenetice ale *O. cumana* [25]. Profilul sumar al activității genelor *APX* al combinației incompatibile nu a determinat modificări esențiale, ceea ce indică asupra unei bune capacități de reglare și menținere a metabolismului în situații de stres biotic [26].

Analiza comparativă generală a activității transcripționale a demonstrat profile diferite de expresie (figura 2b).

Astfel, în circa 50 % de cazuri expresia genelor rămâne neschimbata pe fondalul infecției, în timp ce

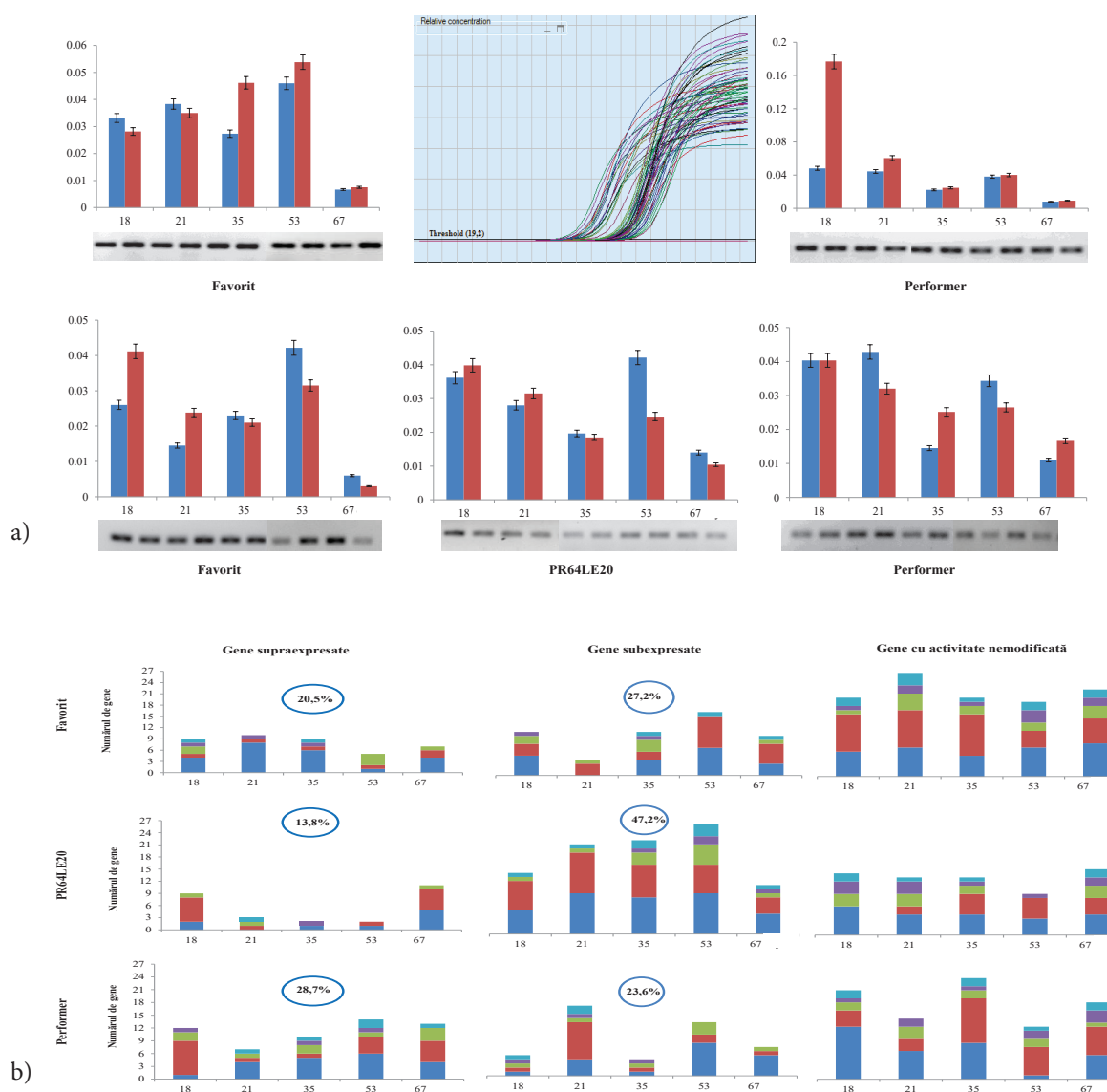


Figura 2. Activitatea unor gene implicate în răspunsul defensiv la genotipuri de floarea-soarelui rezistente și sensibile, cultivate în absența și prezența lupoaiei:

a) – expresie relativă a genelor; b) – profilul de expresie diferențiată a genelor.

în majoritatea dintre celelalte 50 % de cazuri, expresia genelor este inhibată la genotipurile rezistente și supraexpresată – la genotipul sensibil. Printre genele care și-au majorat expresia se regăsesc cele asociate cu sinteza peretelui celular, semnalizarea de apărare, reglarea transcripției și a sintezei de proteine, stresul oxidativ, metabolismul primar și secundar,

Prin urmare, invazia plantei parazit contribuie la modificarea expresiei unui șir de gene care inițiază sau accelerează diverse mecanisme cu rol în asigurarea reacției defensive a florii-soarelui la lupoaie.

Studii proteomice. Un aspect deosebit de interesant în manifestarea răspunsului imun la stresul biotic îl reprezintă biosinteza proteinelor asociate cu patogenitatea (PR – *pathogenesis related proteins*).

Analiza calitativă a 144 de spectre electroforetice ale polipeptidelor obținute prin SDS –electroforeza proteinelor extrase din frunzele și sistemul radicular al genotipurilor de floarea-soarelui crescute în lipsa infestării și pe fondal de infecție, au scos în evidență modificări tranzitorii ale metabolismului proteic, relevate în perioadă de formare a tuberculilor, și o serie de componenți care pot fi asociați cu interacțiunea

dintre planta-gazdă și patogenul studiat. S-a atestat că atacul parazitului determină biosinteza timpurie a unor benzi polipeptidice sau se manifestă prin *intensificarea/ diminuarea* colorației benzilor electroforetice (figura 3a).

Analiza cantitativă a polipeptidelor utilizând tehnologia Protein LabChip (figura 3b) a relevat diferențe dintre cantitatea anumitor componenți proteici la etapele critice de infecție, ceea ce sugerează că acestea ar putea avea un rol important în răspunsul defensiv al plantelor la atacul patogenului. Majoritatea dintre polipeptidele respective posedă mase moleculare similare proteinelor asociate cu rezistența nespecifică (PR), mediată de un număr mare de gene minore care au efect individual slab și acționează aditiv, în mod egal, față de toate rasele agentului patogen (tabelul 3).

Dintre proteinele PR au fost studiate peroxidazele – enzime cu rol cheie în detoxifierea H₂O₂ în timpul polimerizării dependente de peroxid a alcoolilor hidroxicinamilici implicați în procesul de lignificare (biosinteza ligninei), cât și a polimerizării proteinelor peretelui celular, cum ar fi glicoproteinele bogate în

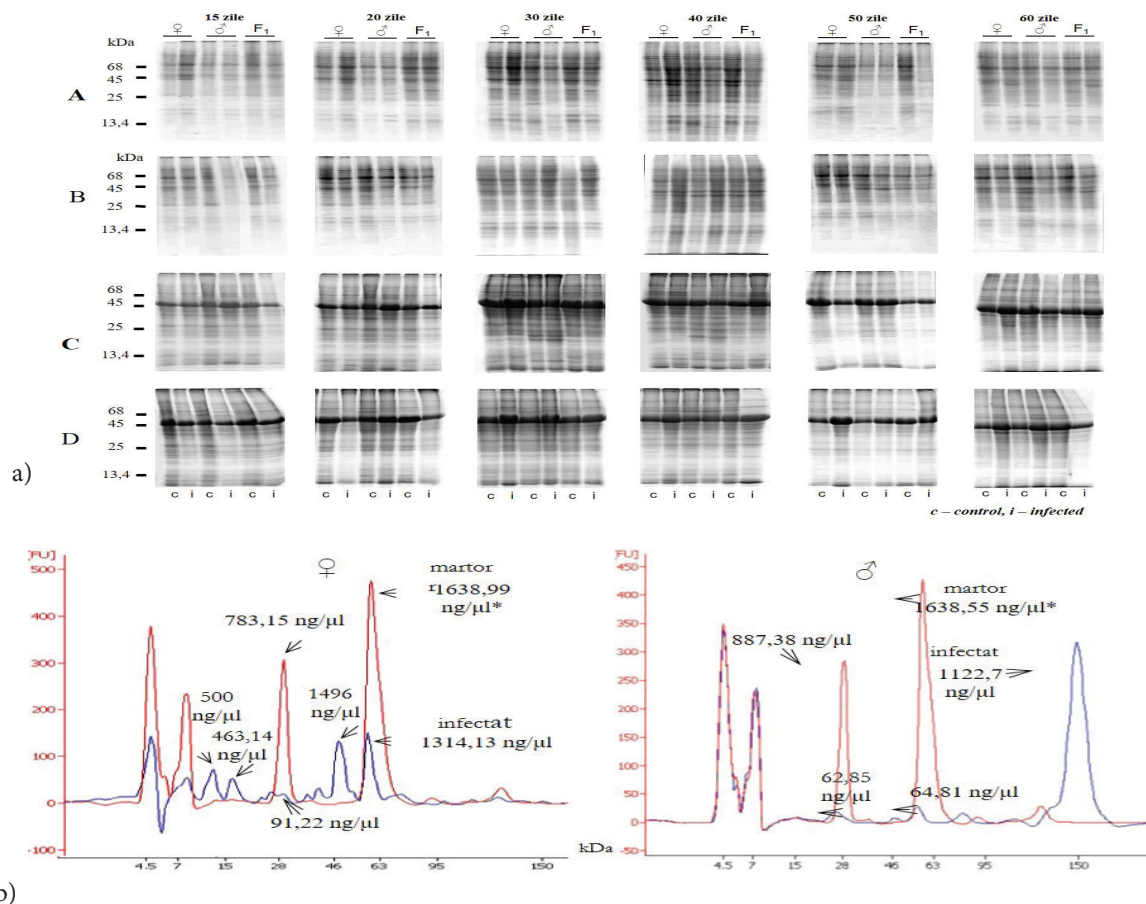


Figura 3. Analiza calitativă (a) și cantitativă a polipeptidelor (b) la diferite genotipuri de floarea-soarelui în varianta control și pe fondal de lupoaie. M – marker, kDa; Fu – intensitatea fluorescenței; *Concentrația proteinei în ng/μl calculată la BioAnalyzer în baza intensității fluorescenței.

Tabelul 3

Benzi polipeptidice de o intensitate sporită ce se încadrează în diapazonul PR-proteinelor la diferite genotipuri de floarea-soarelui

Genotip	Zile	Masa moleculară, kDa											
		36,2	35,5	28,5	26,8	23,1	20,0	16,5	15,7	15,1	13,4	12,7	12,1
♀	15	+++		+	+			++		++			
	20												
	30		+++		++	+		++				+	
	40	+++	++	++	+++	++	+	+++	++	++	+	+	+
	50		++		++			++	+	+	+	+	
	60		++		+			++	++	++	++		
♂	15	+		+	+			+		+			
	20	+	+	+	+	++		++		++			
	30							+					
	40							+			+		
	50												
	60												
F ₁	15			+	+			+					
	20	+	+		+								
	30												
	40												
	50												
	60		++										

hidroxiprolină și prolină, asociate cu fortificarea pereților celulari ai plantei [27-29]. De rând cu peroxidazele, a fost analizată activitatea superoxid-dismutazei (SOD) care catalizează conversia radicalului liber al superoxidului (O²⁻) în oxigen molecular și H₂O₂, a catalazei (CAT), ascorbat peroxidazei (APX) – enzime antioxidante care elimină peroxidul și SRO, asigurând toleranța la stresul oxidativ și rezistența față de patogeni [30-33].

Astfel, studiile proteomice relevă faptul că în urma atacului plantelor cu lupoai are loc modificarea calitativă și cantitativă a paternului polipeptidic în rădăcini și frunze, precum și a grupului de enzime antioxidante

în funcție de genotip și fază de dezvoltare. Genotipurile rezistente se caracterizează prin inhibarea activității enzimatice pe toată perioada de co-cultivare sau la etapele inițiale de dezvoltare, în timp ce genotipul sensibil menține o stare de alertă, posibil determinată de speciile reactive de oxigen, care și determină o activitate sporită a grupului de enzime SOD practic pe toată perioada experimentală.

Studii metabolice. Analiza comparativă privind expresia genelor și activitatea enzimatică la cele două grupuri de genotipuri de floarea-soarelui a scos în evidență diferențe semnificative, dependente de reacția de răspuns la atacul fitopatogenului. Cele

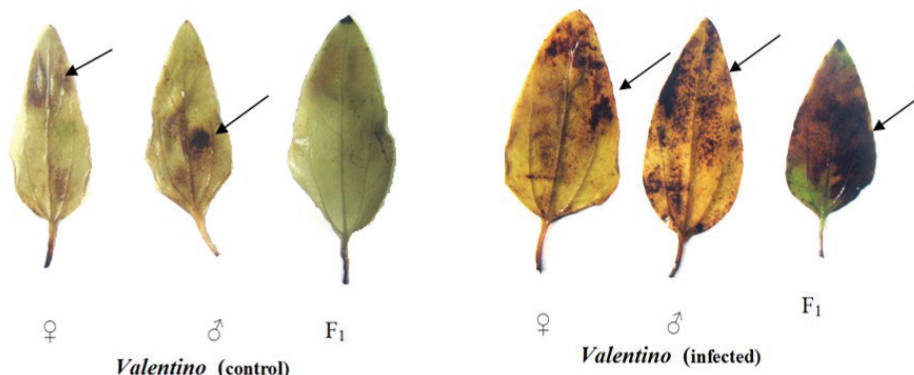


Figura 4. Colorarea frunzelor de floarea-soarelui cu DAB pentru identificarea superoxidului și peroxidului de hidrogen.

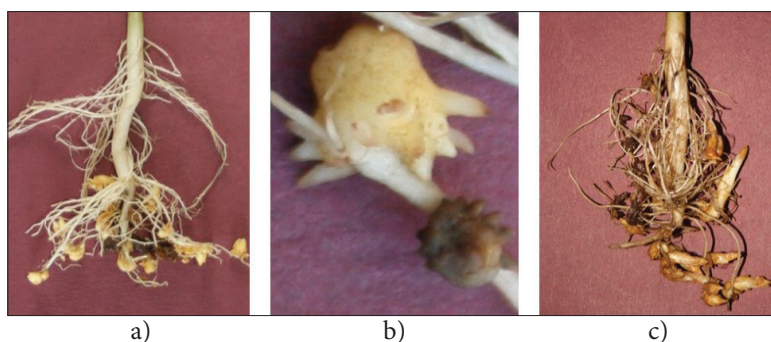


Figura 5. Dezvoltarea *O. cumana* pe rădăcinile de *H. annuus* [18]:

a) – tuberculi cu rădăcini adventive și lăstari subterani, b) și c) – tuberculi necrotizați cu rădăcini adventive.

mai mari diferențe au fost înregistrate în primele faze de infecție, relevând faptul că după recunoașterea agentului patogen și atașarea lupoaiei de sistemul radicular al florii-soarelui sunt induse rapid un șir de evenimente molecular-genetice, biochimice și fiziologic capabile să inhibe dezvoltarea ulterioară a patogenului.

La genotipurile rezistente, de rând cu sinteza proteinelor PR și creșterea intensității activității enzimelor oxidative, s-a constatat acumularea de lignină și caloză care contribuie la fortificarea pereților celulari [34], precum și acumularea de specii reactive de oxigen.

Astfel, analiza calitativă a peroxidului de hidrogen (H₂O₂) și a anionului superoxid (O²⁻) în frunzele prelevate de la plante infestate și sănătoase de floarea-soarelui, prin colorarea cu 3,3-diaminobenzidină (DAB), a indicat prezența SRO în cantități destul de mari, concentrate în diferite părți ale frunzei (figura 4), care constituie prima linie de apărare față de atacul patogenilor, caracterizându-se în același timp prin citotoxicitate atât față de celulele fitoparaziților, cât și a plantelor-gazdă [35].

Stresul oxidativ și intensificarea expresiei genelor implicate în apărare culminează cu un răspuns hipersensibil (HR) și moartea celulară programată în punctul de infecție, care asigură stoparea răspândirii și dezvoltării lupoaiei în țesuturile gazdei, relevată prin formarea necrozei la locul infecției [32; 36; 37], colapsul celular fiind urmat de apariția atașamentelor de culoare brună-roșietică (tuberculi necrotizați). De regulă, necrotizarea începe de la apexul lupoaiei și se extinde spre haustoriu (figura 5).

Tuberculi necrotizați au fost constatați la majoritatea genotipurilor de floarea-soarelui analizate (figura 6), manifestându-se astfel reacția de hipersensibilitate, care reprezintă un indiciu de incompatibilitate între agentul patogen și gazdă. Declanșarea HR-ului este, de obicei, un eveniment extrem de specific, mediat de un set de gene R (de rezistență) capabile să detecteze tipul de patogen prin recunoașterea proteinelor Avr (de avirulență) codificate și sintetizate de parazit, reprezentând o caracteristică evidentă a interacțiunii de tip R-Avr [23].

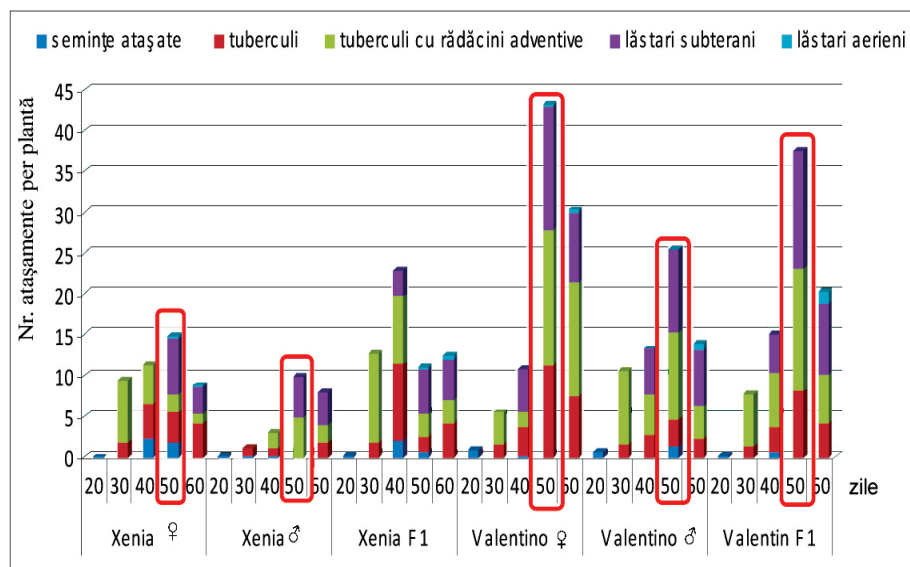


Figura 6. Dinamica creșterii și dezvoltării lupoaiei pe sistemul radicular la floarea-soarelui [18].

CONCLUZII

Pe parcursul evoluției, plantele au dezvoltat mecanisme de rezistență deosebit de complexe, care antrenează modificări ale expresiei genice în țesutul vegetal afectat, stimularea activității unor enzime care aparțin arsenalului de apărare a plantei, producerea unor metaboliți care au efect toxic asupra parazitului sau care consolidează structurile celulare, pentru a limita efectele nocive ale acestuia.

Generalizând datele obținute la diferite nivele de analiză, în funcție de etapele de dezvoltare a patosistemului și de natura genetică a hibridilor incluși în studiu, s-a remarcat că gradul de adaptare la fluctuațiile interne induse de lupoaie depinde atât de agresivitatea, virulența și frecvența plantei parazit, cât și de capacitatea de reglare a rezervelor de substanță și energie metabolică necesară menținerii stării fiziologice de rezistență a florii-soarelui.

Astfel, s-a stabilit că în urma infectării florii-soarelui de către holoparazit, se induce un șir de reacții de apărare, care sporesc rezistența plantelor la infectarea curentă sau ulterioară. A fost identificată acumularea ligninei și calozei ca fenilpropanoizi, care asigură fortificarea peretelui celular și, respectiv, împiedică penetrarea și atașarea patogenului la sistemul radicular al gazdei. Totodată, ca reacție de răspuns la atacul patogenului, s-a relevat activarea/inhibarea transcripției unor gene și activității unor enzime, modificarea cantitativă și calitativă a unor proteine asociate cu patogenitatea, precum și generarea și acumularea SRO.

Cunoașterea factorilor moleculari și genetici de rezistență la lupoaie, precum și a mecanismelor fiziologice de protecție, va facilita procesul de creare a hibridilor rezistenți la *Orobanche cumana* Wallr.

BIBLIOGRAFIE

1. Petcovici I., Lungu E., Buciuceanu M. Afectarea hibridilor de floarea-soarelui cu putregaiul alb. În: Tezele conferinței internaționale „Cultura plantelor de câmp – rezultate și perspective”. Bălți. 2004, p. 163-164.
2. Vrânceanu A.V. Floarea-soarelui hibridă (Hybrid Sunflower). București: Ceres, 2000. 456 p.
3. Kandakov A., Havrland B., Ojog C., Ivanova T. Sunflower market assessment in the Republic of Moldova. Engineering for rural development, Jelgava, 2012, p. 128-133.
4. Sharova P. Zarazikha – opasnyy parazit podsolnechnika. Kishinev.: Kartya Moldovenyaskie, 1977, 48 s.
5. Duca M., Clapco S., Cernolev E., Țapu L. Managementul tehnologic în cultura florii-soarelui și expresia atacului cu *Orobanche cumana*. În: Akademos, 2015, nr. 4, p. 75-83.
6. Vrânceanu A. V., Tudor V. A., Stoenescu F. M., Pirvu N. Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr. differential hosts and resistance sources and genes in sunflower.

In: Proceedings of the 9th International Sunflower Conference, Torremolinos, Spain, July 8–13, 1980, p. 74-80.

7. Rodríguez-Ojeda M. I., Pineda-Martos R., Alonso L. C., Fernández-Escobar J., Fernández-Martínez J. M., Pérez-Vich B. et al. A dominant avirulence gene in *Orobanche cumana* triggers Or5 resistance in sunflower. In: Weed Res. 2013, 53, p. 322-327.

8. Flor H. Current status of the gene-for-gene concept. In: Annu. Rev. Phytopathol. 1971, vol. 9, p. 275-296.

9. Velasco L., Pérez-Vich B., Fernández-Martínez J. M. Research on resistance to sunflower broomrape: an integrated vision, In: OCL 2016, 23(2) D203.

10. Terzić S., Dedić B., Atagić J., Jocić S., Tančić S. Screening wild sunflower species and F1 interspecific hybrids for resistance to broomrape. Helia, 2010, 53, p. 25-30.

11. Heath M. Non-host resistance and nonspecific plant defenses. In: Curr. Opin. Plant Biol. 2000, vol. 3, p. 315-319.

12. Thordal-Christensen H. Fresh insights into processes of non-host resistance. In: Curr. Opin. Plant Biol. 2003, vol. 6, p. 351-357.

13. Lozano-Baena M. D., Prats E., Moreno M. T., Rubiales D., Perez-de-Luque A. *Medicago truncatula* as a model for non-host resistance in legume-parasitic plant interactions. In: Plant Physiol, 2007, vol. 145, p. 437-449.

14. Echevarría-Zomeño S. et al. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. In: Journal of Experimental Botany. 2006, vol. 57, p. 4189-4200.

15. Fernandez-Martinez J. et al. Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. In: Helia. 2008, vol. 31, no. 48, p. 73-84.

16. Labrousse P., Arnaud M.C., Serieys H., Berville A., Thalouarn P. Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. Annals of Botany, 2001, vol. 88, p. 859-868.

17. Perez-de-Luque A., Gonzalez-Verdejo C. I., Lozano M. D., et al. Protein cross-linking, peroxidase and β -1, 3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*. In: J Exp Bot, 2006, vol. 57, p. 1461-1469.

18. Rotarencu V. Aspecte morfo-fiziologice și genetice de interacțiune gazdă-parazit (*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.). Autoref. tezei de doctor în biologie, Chișinău, 2010. 26 p.

19. Louarn J., Boniface M. C., Pouilly N., et al. Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific QTls for different parasitism stages. In: Front. Plant Sci, 2016, vol. 7, p. 1-14

20. Zélicourt A. et al. Ha-DEF1 a sunflower defensin induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. In: Planta. 2007, vol. 226, p. 591-600.

21. Sîtnic V. The interaction network between genes involved in defensive response of sunflower to broomrape. The Xth International Congress of Geneticists and Breeders, Chisinau, 28 June – 1 July, 2015, p. 145.

22. De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. In: Ann. Rev. Phytopathology. 2001, vol. 39, p. 313-335.

23. Ghețea L., Dumitrescu M., Toma N., 2002. Aspecte moleculare și biochimice ale interacției gazdă-parazit în cadrul procesului tumorigen la plante. În: Gh. Câmpeanu, I. F. Dumitru. Progrese în Biotehnologie, vol. II. [on-line] <http://ebooks.unibuc.ro/biologie/biotehnologie/> (vizitat la 27.11.2019).
24. Letousey P., de Zelicourt A., Vieira Dos Santos C. et al. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. In: Plant Pathol, 2007, vol. 56, p. 536-546.
25. Tabără O., Nechifor V., Port A. Expresia genelor *GSL1-4* în rădăcinile de floarea-soarelui infectată cu lupoaie. În: Buletinul AȘM. Științele vieții, nr. 2(332) 2017, p. 85- 93.
26. Tabără O. Nivelul transcripțional al ascorbat peroxidazelor (*APX1* și *APX3*) la *Helianthus annuus* L. infestat cu *Orobanche cumana* Wallr. În: Buletinul AȘM. Științele vieții, nr. 2(338), 2019, p. 104-112
27. Goldwasser Y. et al. Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptica*. In: Physiological and Molecular Plant Pathology. 1999, vol. 54, p. 87-96.
28. Lüthje S., Meisrimler C. N., Hopff D., Möller B. Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. In: Phytochemistry 72, 2011, p. 1124-1135.
29. Pérez-de-Luque A. et al. Histochemistry of the resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*. In: Ellis N (Ed.). Grain legumes annual meeting Norwich, UK John Innes Centre. 2005, p. 9.
30. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. In: Annu Rev Plant Biol. 2004, 55, p. 373-399.
31. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. In: Plant Physiol. 2006 Jun; 141(2), p. 312-22.
32. Heller J., Tudzynski P. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. In: Annu Rev Phytopathol 2011, 49, p. 369-390.
33. Sharma P., Dubey R.S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. Plant Cell Report, 2007, vol. 26, nr. 11, p. 2027-2038.
34. Duca M., Tabara O. Histochemical aspects of *Helianthus annuus* L. - *Orobanche cumana* Wallr. pathosystem. În: Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași s. II a. Biologie vegetală, 2016, 2(62). p. 19-28
35. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. In: Plant Physiol, 2006, vol. 141, p. 391-396.
36. Fernandez-Aparicio M. et al. Resistance against broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) in faba bean (*Vicia faba*) based in low induction of broomrape seed germination. In: Euphytica, 2012, vol. 186, nr. 3, p. 897-905.
37. Louarn J., Boniface M. C., Pouilly N., et al. Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific QTLs for different parasitism stages. In: Front. Plant Sci, 2016, vol. 7, p. 1-14.



Eudochia Robu. *Flori de floarea-soarelui*, 2017, 500 × 400 mm