

ASPECTE ALE STATUTULUI OXIDOREDUCĂTOR LA DIFERITE GENOTIPURI DE FLOAREA-SOARELUI ATACATE DE LUPOAIE

Maria DUCA, Victoria POPESCU, Victor LUPAȘCU

Catedra Biologie Vegetală

Accumulation of H_2O_2 and the activity of catalase in different genotypes of sunflower attacked by broomrape have been analyzed in this work.

The accumulation of H_2O_2 in normal conditions is specified by genotype, being more active in the *Xenia* variety. The attack by broomrape leads to the intensification of the H_2O_2 synthesis in the analyzed genotypes, in particular in the *Valentino* variety.

The activity of catalase decreases in attacked plants of the *Xenia* and *Valentino* varieties at the level of leaves as a result of the accumulation of SRO. The quantity of H_2O_2 correlates with the quantity of enzyme, both in normal conditions and in the plants attacked by broomrape.

Creșterea și dezvoltarea plantelor de cultură este permanent afectată de stresul biotic și abiotic, care influențează morfologia, fiziologia și, în final, productivitatea acestora. Anual, factorii de stres provoacă pierderi considerabile ale recoltei culturilor agricole [3].

Prin reacțiile de răspuns, care se declanșează în momentul percepției efectului extern [9], se activează multiple componente ale căilor de transmitere a semnalelor în sistemele fiziologice, contribuind la menținerea homeostaziei celulare. În procesul de transmitere a semnalelor se include o rețea de interacțiuni atât în interiorul celulelor, cât și dintre celule și plantă în întregime, care au la bază diverse căi metabolice.

Au fost identificate mai multe reacții de răspuns la infectarea plantelor de către organismele parazite, care includ majorarea activității peroxidazei și a fenolilor [11], lignificarea [22], inducerea fitoalexinelor [25], expresia proteinelor specifice [14] etc. Expunerea plantelor la condiții stresorice induce, de asemenea, producerea de specii reactive ale oxigenului (SRO), așa ca H_2O_2 , radicali O_2^- și OH^- [13,18,28], care modifică statutul redox celular [8]. SRO sunt sintetizate în plante ca componenți ai metabolismului aerob, care decurge în diferite organite celulare (mitocondrii, plastide și peroxozomi), în urma transportului de electroni, a reacțiilor mediate de enzime în procesul de fotorespirație, β -oxidării etc. [1]

Pe de o parte, SRO sunt molecule înalt reactive față de lipidele membranare, proteine și ADN, reprezentând principalii factori care contribuie la apariția leziunilor ce deteriorează activitatea funcțională a celulelor [7] și, respectiv, moartea acestora [20]. Pe de altă parte, speciile reactive ale oxigenului, la fel ca și acidul salicilic, etilena și alți compuși [16], sunt implicate în transducerea semnalelor [12] și în activarea genelor de protecție [13,18,28] și, respectiv, în mecanismul de protecție contra agenților patogeni [2].

Nivelul înalt de SRO stimulează producerea acidului ascorbic, glutationului, α -tocoferolului și a carotenozilor [10], care contribuie la activarea enzimelor antioxidante – superoxidismutazei, catalazei și peroxidazei [15]. Drept reacție de răspuns la sporirea concentrației de specii reactive ale oxigenului s-a constatat și activarea proteinelor de șoc, care protejează sistemul enzimatic celular împotriva proceselor oxidative [4], în special proteazelor cu rol de degradare a proteinelor deteriorate [26].

Reieșind din cele sus-menționate, scopul lucrării rezidă în analiza parametrilor statutului oxidoreducător al plantelor prin prisma acumulării peroxidului de hidrogen (H_2O_2) și activității catalazei (CAT) în sistemul-model de interacțiune gazdă-parazit pe exemplul florii-soarelui atacate de lupoaie.

Material și metode

Ca material de studiu au servit două familii de floarea-soarelui (*Valentino* și *Xenia*), reprezentate de hibridii și liniile lor parentale, oferite de către AȘP „Magroselect” SRL (or.Soroca). Genotipurile respective au fost testate față de atacul lupoaiei (*Orobanche cumana* Wallr.), colectate de la plantele de floarea-soarelui infectate în vara anului 2006 din zona de centru a Republicii Moldova. Semințele de lupoaie au fost separate de inflorescențe uscate și păstrate la întuneric la temperatura camerei.

Condițiile de cultivare in vivo. Inocularea artificială a plantelor a fost efectuată în vase de vegetație, în care s-a introdus mixtura de sol (nisip: turbă, 1:1, v/v) uniform infectată cu semințe de lupoaie (la 200 g amestec s-a adăugat 30 mg semințe) [21]. Amestecul de sol a fost udat cu 100 ml apă și vasele au fost lăsate 7 zile pentru condiționarea lupoaiei, după care au fost plantate semințele de floarea-soarelui germinate timp de 2 zile. Vasele au fost expuse în camera de cultivare, la temperatura de 14-16°C cu fotoperioada de 12-14 ore și umiditatea de 60%.

Floarea-soarelui a fost prelevată după 11 săptămâni de la plantare, fiind analizată activitatea catalazei și detectată prezența H_2O_2 .

Determinarea prezenței peroxidului de hidrogen. Ca substrat pentru identificarea vizuală a H_2O_2 în frunze a servit 3,3-diaminobenzidina (DAB). Limbul foliar împreună cu pețiolul s-a detașat de la plantă cu bisturiul și a fost incubat în soluție de 1mg/ml DAB, pH 3,8, timp de 8 ore la lumină, la 25°C. Apoi, frunzele au fost fierte 2-3 min. în etanol 96%. Acest tratament a decolorat frunzele, cu excepția zonelor brune, unde a avut loc polimerizarea peroxidului cu DAB [18]. Pentru analiză au fost luate frunzele etajului superior al plantei.

Determinarea activității catalazei prin metoda gazometrică [30]. În cadrul analizei au fost luate 0,3 g material vegetal, majorat cu $CaCO_3$ pentru crearea mediului bazic (pH 7,7), la care, în scopul obținerii unei mase omogene, s-a adăugat apă. Amestecul s-a transferat în brațul mare al vasului de reacție, iar în brațul mic s-au adăugat 5 ml H_2O_2 de 3%. Vasul s-a unit la gazometru, soluțiile din vas amestecându-se timp de 3 min. S-a determinat volumul O_2 degajat (ml O_2 /1g/min).

Prelucrarea statistică a datelor s-a efectuat prin analiza dispersională, datele fiind comparate în baza criteriului Fisher și prin estimarea limitei semnificative a diferenței (LSD) pentru $P = 0,95$ și $P = 0,99$ [29]. Calculele s-au realizat cu utilizarea aplicației Microsoft Excel.

Rezultate și discuții

Lupoaia reprezintă un parazit angiosperm lipsit de clorofilă, care utilizează în procesul de creștere și dezvoltare asimilatele din planta-gazdă, provocând scăderea producției atât sub aspect cantitativ, cât și calitativ. Infectarea plantelor de floarea-soarelui cu lupoaie, prin penetrarea de către parazit a celulelor din sistemul radicular, provoacă un efect de stres. Celulele răspund la semnalele mecanice sau chimice din peretele celular prin modificarea diferiților indici ai metabolismului celular [11,14,22,25] și difuzează aceste semnale, preponderent la nivel de plasmodesme, în tot corpul plantei.

Una dintre reacțiile primare ale plantelor la acțiunea factorilor externi este **stresul oxidativ**, sau „explozia” oxidativă, determinată de modificarea potențialului electrochimic membranar și de acțiune [8], care poate fi monitorizat prin cuantificarea potențialului redox, a metaboliților asociați cu stresul oxidativ (peroxidul de hidrogen, glutationul etc.), a enzimelor metabolismului oxidativ (catalaza, peroxidaza etc.) și a proteinelor de șoc [5].

Rezultatele obținute de noi în cadrul analizei semicantitative a H_2O_2 prin colorare cu ajutorul DAB a atestat prezența acestuia în frunze atât în condiții normale, cât și în urma atacului, însă în concentrații diferite. Astfel, la familia *Xenia*, acumularea excesivă a H_2O_2 s-a depistat la toate genotipurile atât în normă, cât și pe fon de infecție. Prezența peroxidului s-a manifestat cel mai pronunțat la forma paternă și hibrid, indicând astfel o specificitate de genotip (Fig.1).



Fig.1. Acumularea peroxidului de hidrogen la familia *Xenia* (săgețile arată zonele întunecate unde a avut loc acumularea peroxidului).

O vădită reacție de răspuns la atacul patogenului a fost atestată la familia *Valentino*, unde la control H_2O_2 practic nu este prezent, pe când la plantele afectate de lupoaiie s-a atestat o acumulare excesivă a acestuia la toate genotipurile familiei, dovadă a reacției de răspuns la atacul lupoaiiei (Fig.2).

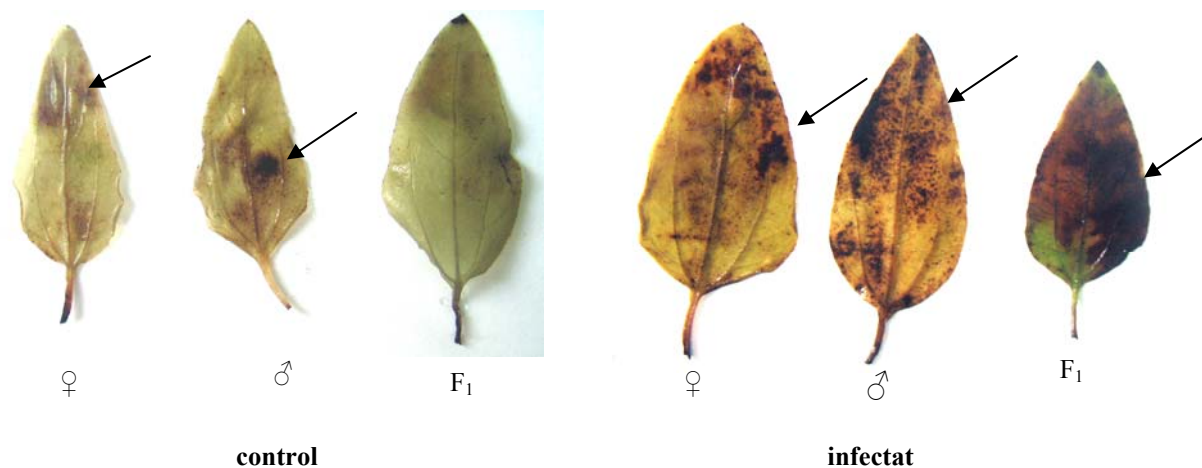


Fig.2. Acumularea peroxidului de hidrogen la familia *Valentino* (săgețile arată zonele întunecate unde a avut loc acumularea peroxidului).

Întrucât orice reacție de stres provoacă acumularea excesivă a peroxidului de hidrogen (ca una dintre reacțiile primare de răspuns [1,19]) și, reieșind din faptul că planta parazit lupoaiia produce cantități mari de antioxidanți [27], considerăm demonstrat rolul sistemului redox în interacțiunea parazit-gazdă [6,17]. Deoarece familia *Xenia* pune în evidență un nivel sporit de toleranță față de lupoaiie, comparativ cu celelalte genotipuri cercetate, putem considera că concentrațiile sporite ale peroxidului, constatate la genotipurile care alcătuiesc această familie, se asociază cu majorarea rezistenței față de patogeni. Infectarea florii-soarelui cu acest parazit intensifică puternic acumularea H_2O_2 la locul infecției, fiind determinată de un complex de mecanisme de reglare a conținutului acestora [13], dar nu este clar dacă acumularea H_2O_2 este declanșată de planta-gazdă, de parazit sau de ambele organisme [23].

Reglarea și autoreglarea conținutului SRO în plante se realizează la nivel de mecanisme enzimatice (acțiunea *superoxidismutazei*, *catalazei*, *peroxidazei* etc.) și neenzimatice (*antioxidanții*, *glutathionul*), care contribuie la menținerea echilibrului oxidoreducător și a homeostaziei celulare [13].

Rezultatele cercetărilor asupra activității catalazei (CAT, EC 1.11.1.6.), una dintre cele mai răspândite enzime din clasa *Oxidoreductazelor*, cu funcție de protecție a celulelor contra SRO, a demonstrat că activitatea CAT în frunzele genotipurilor de floarea-soarelui infectate scade față de control.

În frunze se expresează gena *cat1*, care codifică una dintre formele izoenzimice ale *catalazei* (CAT-1), activă în primele etape ontogenetice ale plantei [24]. Deoarece la genotipurile de floarea-soarelui analizate a fost atestată acumularea SRO, s-a presupus că activitatea CAT este redusă din cauza supresiei genei *cat1* [6], întrucât se cunoaște că în urma majorării SRO în celulele supuse stresului scade activitatea enzimei [28], ceea ce s-a observat la plantele studiate în condiții normale și infectate.

Astfel, activitatea CAT variază între 17,89-83,67 ml O_2 /1g m.v. Cele mai mari valori ale activității enzimei în frunze la familia *Xenia* s-au constatat la linia maternă, valorile obținute la linia paternă și hibrid fiind la nivelul genotipului matern. Pe fundal de infecție, activitatea CAT scade la toate genotipurile familiei *Xenia*: cu 76,43% la linia maternă, cu 34,65% la linia paternă și cu 20,86% la hibrid.

Activitatea CAT la genotipurile, care alcătuiesc familia *Valentino*, atestă valori mai mici față de familia *Xenia* în condiții normale, rezultatele fiind confirmate și de prezența redusă a H_2O_2 (Fig.3), excepție făcând hibridul care are valori de 83,67 ml O_2 /1g m.v. La genotipurile parentale activitatea enzimei variază nesemnificativ – între 50,0 și 45,89 ml O_2 /1g m.v. Pe fon de infecție, se atestă o scădere a activității catalazei, cu excepția genotipului matern, unde s-a observat o creștere nesemnificativă, pe când la hibrid se atestă o diminuare a CAT – cu 49,11%.

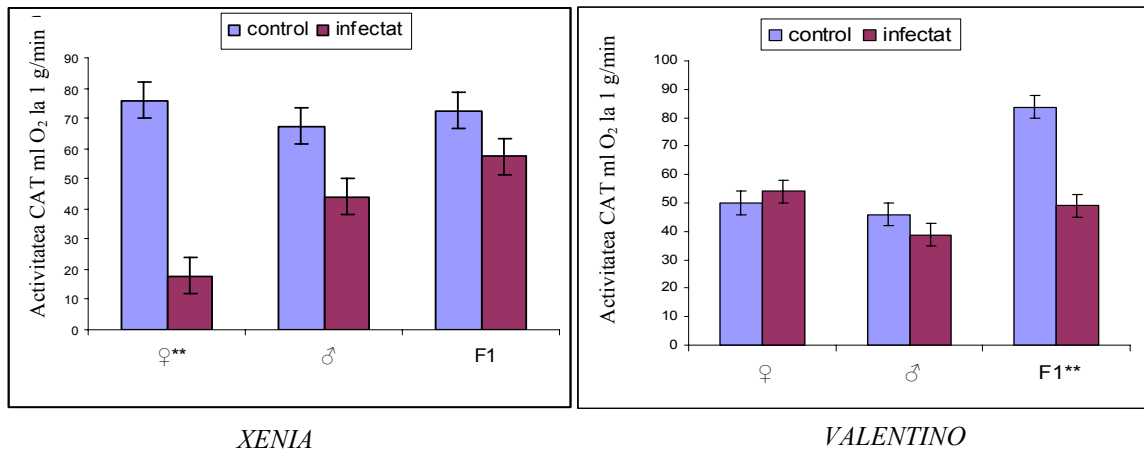


Fig.3. Activitatea catalazei în frunzele plantelor de floarea-soarelui. (** P<0,01)

Întrucât lupoaia este un rizoparazit, percepția (la nivelul receptorilor) și transmiterea semnalelor (preponderent prin xilem și floem), ca rezultat al infectării, se inițiază la nivelul sistemului radicular. Din aceste considerente, a fost studiată activitatea catalazei în rădăcinile plantelor de floarea-soarelui în condiții normale de creștere și pe fundal de infecție cu lupoaie. S-a constatat că activitatea enzimei este mai redusă comparativ cu datele obținute la nivelul frunzelor și variază în limitele de 3,56-15,78 ml O₂/1g m.v. Cele mai mari valori s-au obținut la genotipul patern al familiei *Xenia*. Pe fon de infecție se observă o diminuare nesemnificativă a activității CAT la linia maternă și hibrid și o diminuare semnificativă (cu 19,01%) la linia paternă (Fig.4).

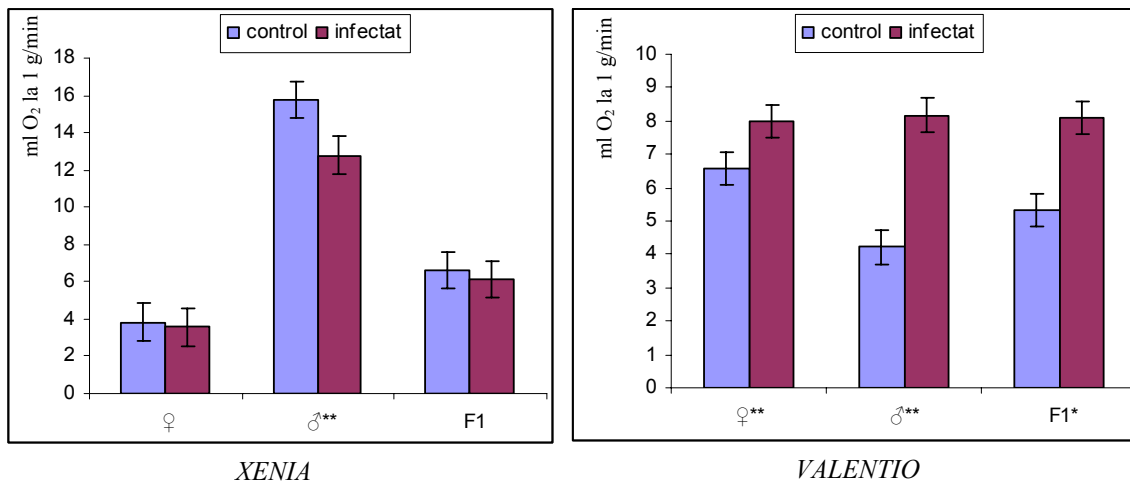


Fig.4. Activitatea catalazei în rădăcina plantelor de floarea-soarelui. (** P<0,01, *P<0,05)

Diminuarea activității catalazei în frunze în condiții de infectare corelează cu cea din rădăcină doar în cazul genotipurilor familiei *Xenia*, pe când la genotipurile din familia *Valentino* s-a atestat un fenomen invers, observându-se o majorare semnificativă a activității enzimei în sistemul radicular la genotipurile infectate (21,95-93,60%). Sporirea activității CAT poate fi explicată prin acumularea excesivă a SRO în plantă, în special la locul infecției, acumularea dată fiind declanșată atât de planta-gazdă, cât și de parazit [23]. Totodată, a fost stabilit că valorile parametrului studiat la genotipurile infectate nu se deosebesc semnificativ (*Valentino* ♀ – 8,0 ml O₂/1g m.v., *Valentino* ♂ – 8,17 ml O₂/1g m.v., *Valentino* F₁ – 8,11 ml O₂/1g m.v.).

Astfel, rezultatele obținute demonstrează că familia *Valentino* este susceptibilă la atacul lupoaiei.

Concluzii

1. Acumularea peroxidului în condiții normale manifestă specificitate de genotip, fiind mai pronunțată la familia *Xenia* și practic lipsește la familia *Valentino*. Atacul cu lupoaie induce intensificarea sintezei H_2O_2 la genotipurile analizate, în special la reprezentanții familiei *Valentino*, constituind una dintre reacțiile primare de răspuns ale plantelor la stres.

2. Activitatea catalazei scade pe fon de infecție la familiile *Xenia* și *Valentino* la nivelul frunzelor ca rezultat al acumulării SRO. Cantitatea H_2O_2 corelează cu activitatea enzimei, atât în condiții normale, cât și în urma atacului lupoaiei, fiind relevantă prin diminuarea acestui indice.

3. Diminuarea activității catalazei în frunze în condiții de infectare corelează cu cea din rădăcină doar în cazul genotipurilor familiei *Xenia*, pe când la genotipurile din familia *Valentino* s-a atestat un fenomen invers, ceea ce denotă o mai mare susceptibilitate a familiei date față de parazit.

Referințe:

1. Apel K. and Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. - 2004. - No.55. - P.373-399.
2. Bolwell G.P., Butt V.S., Davies D.R., Zimmerlin A. The origin of the oxidative burst in plants. // Free Radic. Res. - 1995. - Vol.23. - P.517-523.
3. Boyer J.S. Plant productivity and environment // Science. - 1982. - Vol.218. - P.443-448.
4. Burdon R.H. Stress protein in plants // Bot. L. Scotl. - 1993. - Vol.46. - P.463-475.
5. Cassells A.C and Curry R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micro propagators and genetic engineers // Plant Cell, Tissue and Organic Culture. - 2001. - No.64. - P.145-157.
6. Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W. et al. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Plant Biology. - 1998. - No.95. - p.5818-5823.
7. Desikan R., Hancock J.T., Neill S.J. Oxidative stress signaling. – In: Hirt and K.Shinozaki (eds.). Plant responses to abiotic stress: topic in current genetics. - Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 2003, p.121-148.
8. Duca M., Port A., Romanciuk L., Duca Gh. The redox state of aquatic medium and plants germination process regulation // Self-purification processes in natural waters. - Chisinau, 1995, p.245-256.
9. Duncan R.R. Plant tolerance to acid soil constraints: genetic resources, breeding methodology and plant improvement // Plant-Environment Interactions, 2nd ed. - New York, 2000, p.1-38.
10. Gille G., Siegler K. Oxidative stress and living cells // Folia Microbiol. - 1995. - Vol.40. - P.131-152.
11. Goldwasser Y., Hershenhorn J., Plakhine D., Kleifeld Y., Rubin B. Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptica* // Physiological and Molecular plant Pathology. - 1999. - Vol.54. - P.87-96.
12. Hammond-Kosack K.E., Jones D.C. Resistance genre-dependent plant defense responses // Plant Cell. - 1996. - Vol.8. - P.1773-1791.
13. Hung S.H., Yu C.W., Lin C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // Bot. Bull. Acad. Sin. - 2005. - Vol.46. - P.1-10.
14. Joel D.M., Partnoy V.H. The angiospermous root parasite *Orobanche* L. (Oronancheaceae) induces expression of pathogenesis related (PR) gene in susceptible tobacco roots // Annals of Botany. - 1998. - Vol.81. - P.779-781.
15. Larson R.A. Plant defenses against oxidative stress // Arch. Insect Biochem. Physiol. - 1995. - Vol.29. - P.175-186.
16. Leon, J., Lawton M.A., Raskin I., Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco // Plant Physiol. - 1995. - Vol.108. - P.619-629.
17. Mittler R., Herr E.H., Orvar B.L. et al. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyper responsive to pathogen infection // PNAS. - 1999. - No.96(24). - P.14165-14170.
18. Orozco-Cardenas M., Ryan C.A. Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and system via the octadecanoid pathway // Plant Biology. Proc. (Natl. Acad. Sci. USA) - 1999. - No.96. - P.6553-6557.
19. Orozco-Cardenas M., Narvaez-Vasquez J., Ryan Clarence A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, system, and methyl jasmonate // The Plant Cell. - 2001. - No.13. - P.179-191.
20. Orozco M.L. and Glijin A. The role of reactive oxygen species in plant defense responses // Conferința științifică internațională „Învățământul superior și cercetarea – piloni ai societății bazate pe cunoaștere”. Științe reale, 28 septembrie. - Chișinău, 2006, p.281.
21. Panchenko A.Y. Early diagnosis of broomrape resistance in breeding and improving seed production of sunflower (in Russia) // Viestnik, Sielkskkojosia Stevennog Nauki. - 1975. - Vol.2. - P.107-115.

22. Perez-de-Luque A., Rubiales D., Cubero J.I., Press M.C., Scholes J., Yonezama K., Takeuchi Y., Plakhine D., Joel D.M. Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite // *Annals of Botany*. - 2005. - Vol.45. - P.379-385.
23. Sauerbon J., Buschmann H., Ghiasvand Ghisasi K., Kogel K.-H. Benzothiadiazole activates resistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root-parasite weed *Orobanche cumana* // *Genetics and resistance*. - 2002. - Vol.92. - No.1. - P.59-64
24. Schultes N. P., Zelitch I., McGonigle B. et al. The primary leaf catalase gene from *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana sylvestris* // *Plant Physiology*. - 1994. - Vol.106. - P.399-400.
25. Serghini K., Perez-de-Luque A., Castejon-Munoz M., Garcia-Torres L., Jorin J.V. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loeffl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins // *Jornal of Experimental Botany*. - 2001. - Vol.52. - P.2227-2234.
26. Stadtman E.R. Protein oxidation and ageing // *Science*. - 1992. - Vol.258. - P.1220-1224.
27. Viron C., Lhermite S., Andre P., Lafosse M. Isolation of phenylpropanoid glycosides from *Orobanche rapum* by high speed countercurrent chromatography // *Phytochem. Anal.* - 1998. - Vol.9. - P.39-43.
28. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // *Успехи биологической химии*. - 2001. - Т.41. - С.3-38.
29. Доспехов А. Методы полевого опыта. - Москва: Агропромиздат, 1985.
30. Третьякова Н.Н. Практикум по физиологии растений. - Москва: Колос, 1982, с.134.

Notă: Lucrarea a fost realizată în cadrul Proiectului instituțional 06.407.026F finanțat de CSSDT al AȘM.

Prezentat la 17.07.2007