

EXPRESIA GENELOR *GSL1-4* ÎN RĂDĂCINILE DE FLOAREA-SOARELUI INFECTATĂ CU LUPOAIE

Tabără Oleseă, Nechifor Victoria, Port Angela

Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Centrul de Genetică Funcțională

Rezumat

În lucrare sunt puse în discuție datele privind activitatea transcripțională a patru gene care codifică glucan sintaze, corelate cu investigații histochimice ale țesutului radicular, la genotipuri rezistente și sensibile față de *Orobanche cumana*, unul din cei mai devastatori patogeni ai culturilor de *Helianthus annuus* L. Analiza a trei variante de studiu: *normă*, *incompatibilitate patogen-gazdă* și *patosistem* a demonstrat profile diferite de expresie în cazul unei și aceleași reacții fiziologice (rezistență). În combinația incompatibilă *Favorit-patogen*, toate cele patru gene *GSL* s-au caracterizat prin supraexpresie cu 210 %, în special în primele etape de stabilire a conexiunilor mediate chimic cu semințele germinate de lupoaie. În cazul patosistemului *Performer-O. cumana* sporirea conținutului de transcripți a trei gene coincide cu invazia patogenului (formarea atașamentelor, haustoriilor și a lăstarilor aerieni). A fost pusă în evidență o dependență corelativă pozitivă în activitatea genelor *HaGSL2* și *HaGSL3* la diferite etape ontogenetice ale *O. cumana*, la toate genotipurile studiate.

Cuvinte-cheie: Floarea-soarelui, lupoaie, caloză, gene *GSL*, glucan-sintaze.

Depus la redacție 21 septembrie 2017

Adresă pentru corespondență: Tabără Oleseă, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 3/2, MD2028 Chișinău, Republica Moldova;
E-mail: olese-eremia@ramble.ru

Introducere

Genul *Orobanche* reprezintă un grup de plante superioare lipsite de clorofilă, care parazitează pe rădăcinile gimnospermelor, utilizează substanțele nutritive ale gazdei diminuând astfel dezvoltarea organismului vegetal.

Infecția cu reprezentanții acestui gen de antofite debutează cu germinarea semințelor patogenului, proces indus de către strigolactonele sintetizate de către plante. Germeții manifestă reacție de chemotropism și crescând direcționat spre țesuturile gazdei formează atașamente, care ulterior diferențiază în haustorii [9]. Planta poate stopa penetrarea celulelor intruzive de lupoaie la nivelul cortexului rădăcinii [14, 16], endodermei [15] și al cilindrului central [12]. Astfel de reacții de inhibare a invaziei patogenului au fost observate macroscopic la diferite patosisteme, germeții atașați nu evoluau în dezvoltare.

Mecanismele defensive dezvoltate de către plantă la nivelul cortexului se manifestă prin fortificarea pereților celulari, intensificarea sintezei proteinelor *cross-linking*, depozitarea compușilor fenolici în apoplast în zona de infecție. Un eveniment important în răspunsul gazdei la patogen este acumularea calozei în structurile membranare, proces observat la numeroase plante inclusiv la floarea-soarelui infectată cu *O. cernua* și *O. cumana* [5, 19].

Caloza este polimerul (1,3)- β -glucanului cu unele ramificări în pozițiile β -1,6 [2]. Prezentă în toate algele verzi multicelulare și în plantele superioare este una dintre cele mai dinamice poliglucide ale peretelui celular. Conținutul și distribuția calozei variază temporal și spațial în funcție de etapele ontogenezei și acțiunea factorilor biotici și abiotici, îndeplinind funcția de barieră fizică pentru diverse leziuni și restaurarea integrității celulelor plantei-gazdă [6, 7].

Ellinger și Voigt, (2014) studiind reacția de răspuns a plantelor la stres, au raportat date ce confirmă acumularea calozei sub forma unor papile în spațiul dintre plasmalemă și suprafața internă a peretelui celular [6, 21] care blochează porii tuburilor ciuruite. Astfel, prin sinteza și degradarea calozei în regiunea plasmodesmelor se reglează permeabilitatea substanțelor ca reacție la factorul stresogen. De asemenea, se cunoaște că planta - gazdă poate depozita caloza nemijlocit în locul de contact al patogenului [13].

Investigațiile efectuate de două grupe de cercetători Jacobs și colab. (2003) și Nishimura și colab. (2003) prezintă contribuții majore în elucidarea diferitor aspecte ale metabolismului calozei. Autorii au oferit pentru prima dată informații despre rolul biologic al proteinelor funcționale implicate în biosinteza calozei [8, 13]. Diverse studii realizate la *Arabidopsis* indică acumularea calozei sub acțiunea secetei și al patogenilor în rezultatul activării unei și aceleiași gene cu diferite adnotări, descrisă inițial ca *PMR4* (*Powdery Mildew Resistant4*), apoi *GSL5* (*Glucan-Synthase Like 5*) sau *CalS12* (*Callose Synthase genes*) [2, 6].

Se consideră că formarea papilelor de caloză este un răspuns de apărare precoce [18]. Încetinirea invaziei patogenilor în țesutul atacat, datorită acumulării calozei, permite plantei să își reorganizeze metabolismul astfel, încât se activează expresia genelor specifice care determină inducerea răspunsurilor de apărare suplimentare. Cu toate că polimerul glucanic este implicat în diverse procese biologice, informațiile despre reglarea metabolismului și valențele funcționale acestuia sunt fragmentare.

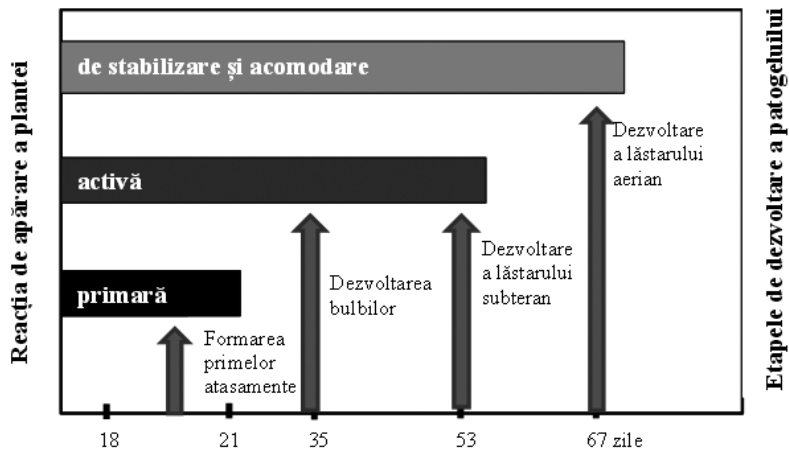
Actualmente, la floarea-soarelui este identificată o familie de 4 gene care codifică glucan sintaze (*GSLI-4*). Dintre acestea, doar *HaGSLI* a prezentat activitate de transcripție în țesut calusal inoculat cu lupoai de la plantele crescute *in vitro*, începând cu prima zi de infecție și până la ziua a 8-a [10]. Până în prezent literatura de specialitate conține doar aceste rezultate. Nu se cunoaște care este activitatea *GSLI-4* s-au a altor gene asociate metabolismului calozei în planta gazdă cultivată *in vivo* la diferite etape de invazie a patogenului.

Astfel, în prezenta lucrare sunt puse în discuție datele privind activitatea transcripțională a patru gene care codifică glucan sintaze, corelate cu investigații histochemice ale țesutului radicular la genotipuri rezistente și sensibile față de lupoai.

Material și metode de cercetare

Colectarea materialului. În studiu au fost utilizate trei genotipuri de floarea-soarelui, dintre care doi hibrizi rezistenți (Favorit și PR64LE20) și unul sensibil (Performer) la acțiunea parazitului. Reacția acestor genotipuri a fost testată histochemic prin colorare cu Aniline Blue [1]. Cultivarea plantelor s-a realizat în vase de vegetație pe fundal de infecție artificială cu lupoai (200g substrat contaminat cu 30 mg semințe). Eșantioanele radiculare de floarea-soarelui au fost colectate la 5 etape de dezvoltare a patogenului (Fig. 1).

Obținerea probelor de ARN și ADNc. Din materialul colectat s-au extras 90 probe de ARN total care au servit ca matriță pentru sinteza ADNc. Extragerea ARN-ului s-a realizat cu reagentul TRI-zol conform protocolului standard (*Applied Biosystems*), iar calitatea și concentrația acestuia a fost analizată electroforetic în gel de agaroză de 1% și spectrofotometric la lungimea de undă 260 și 280 nm.



Cultivarea plantelor de floarea-soarelui pe fundal de infecție cu *O. cumana*

Figura 1. Schema de prelevare a probelor de studiu.

Preliminar reacțiilor de revers-transcripție, ARN-ul total (1μg) a fost tratat cu ADN-ază (Thermo Scientific). Transcripția inversă s-a efectuat prin utilizarea kit-ului Revertaid RT (Fermentas), a primerilor Oligo-dT₁₈ și a hexamerilor arbitrari, conform protocolului producătorului.

Analiza nivelului de expresie a genelor de interes. Nivelul de transcripție a fost cuantificat prin PCR în timp-real la amplificatorul DT-96 (*DNA technology, Rusia*).

Secvența amorselelor a fost elaborată în baza EST-urilor cunoscute la *H. annuus* (Tab.1). prin programele Primer3Web v. 3.0.0. și OligoAnalyzer 3.1.

Tabelul 1. Genele (*Glucan-synthase like*) și secvența nucleotidică a primerilor

EST	Număr de acces (NCBI)	Primer sens, 5'-3'	Primer antisens, 5'-3'	Amplicon (pb)
HaGSL1	DQ837211.1	acagggaaaagaccaggaagt	ggactgcttctccacgagta	116
HaGSL2	DQ837212.1	cggtgtctcatgccaacagt	cctcaacctcgtaatgtaagc	122
HaGSL3	DQ837213.1	gtgaccatagagaccaagtgt	cccaccctgaccagaacag	149
HaGSL4	DQ837214.1	tgaggttgaggagcctagca	cccgtctcagaagcattgga	105
Actina	AF282624.1	gctaacagggaaaagatgactc	actggcataaagagaagcagc	96

Reacția de amplificare a fost realizată cu kit-ul Maxima SYBR Green/ROX PCR (Fermentas), primeri specifici 0,4 mM, 2 μl de ADNc (produsul revers-transcripției diluat în raport de 1:4), conform programului: 95°C – 10 min; 5 cicluri la 95°C – 15 s, 64°C – 20 s; 40 cicluri de 95°C – 15 s, 60°C – 40 s. Lipsa produselor nespecifice a fost confirmată în gel de 1,4 % agaroză și analiza curbelor de topire.

Analizele au fost efectuate în 3 repetiții biologice și 2 analitice. Valorile expresiei relative a genelor s-au determinat conform formulei $2^{-\Delta\Delta CT}$ și sunt exprimate în unități convenționale (u.c.) [11]. Estimarea semnificației diferențelor s-a realizat prin testului-t, P=0,05 [22].

Rezultate și discuții

Cultivarea plantelor de floarea-soarelui până la etapa de butonizare, pe fundal de infecție cu *O. cumana*, a rezultat în atacul intens al parazitului asupra genotipului susceptibil. Hibridii rezistenți nu au prezentat semne fenotipice de infecție. Aceste date confirmă reacția de răspuns a acestor genotipuri investigate anterior de alți autori [17].

Analiza histochimică [4] a pus în evidență acumularea calozei în țesutul radicular la plantele hibridului sensibil și doar la unul dintre cei doi hibridi rezistenți studiați. Bazele de date genomice, inclusiv articole de specialitate [10], indică patru gene *GSL* responsabile de sinteza calozei la floarea-soarelui, a căror secvență genică a servit ca matriță în elaborarea primeriilor pentru cuantificarea transcripților în condiții de stres biotic.

Nivelul de expresie a genelor de interes la varianta martor a genotipului Favorit (rezistent) a prezentat valori similare mai mici comparativ cu cele constatate la plantele cultivate pe fundal de infecție (fig. 2).

Astfel, conținutul transcripților *HaGSL1* a fost mai mare față de martor, la primele trei etape de analiză: 18, 21 și 35 zile (de 3,1; 1,6 și respectiv 1,9 ori), spre deosebire de cel al genelor *HaGSL2* și *HaGSL3*, a căror activitate s-a evidențiat doar la 18 și 35 zile. În ce privește, *HaGSL4* s-a constatat un maxim de activitate doar în perioadă formării primelor atașamente ale patogenului, peste 21 zile (1,8 u.c.), ceea ce reprezintă o majorare a nivelului de expresie față de martor de 5,4 ori.

Aceste deviații în activitatea glucan sintazelor ar putea fi asociate cauzal cu anumite interconexiuni biochimice de semnalizare dintre rădăcinile gazdei și semințele germinate de lupoaie, în vederea unor eventuale atașări și dezvoltarea haustorului. De menționat faptul că, acumularea papilelor de caloză la acest genotip a fost observată

în celulele cilindrului central, mai târziu, peste 35 zile, cu o dinamică pozitivă până la 67 zile (fig. 2).

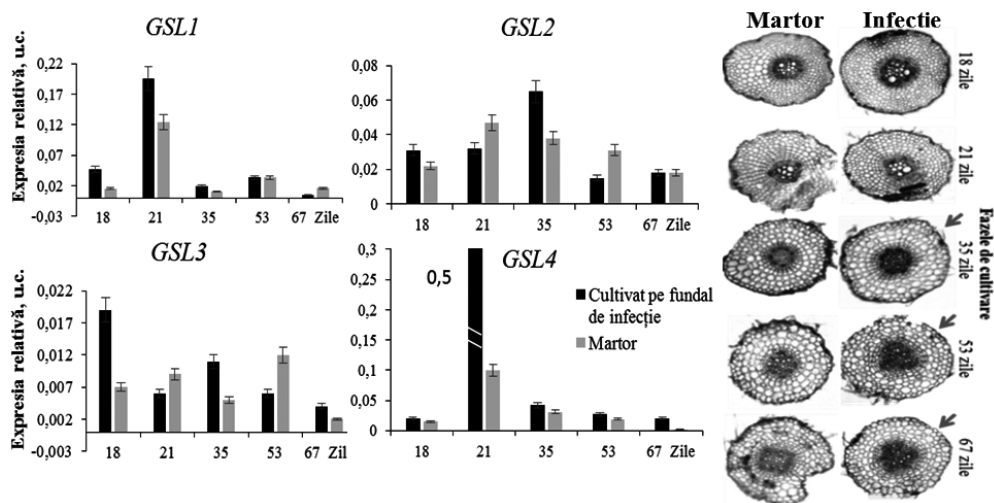


Figura 2. Nivelul de expresie a *GSL* și fenotipul țesutului radicular la genotipul Favorit.

Al doilea genotip rezistent studiat - PR64LE20 a prezentat un alt profil de expresie a *HaGSL1-4*. De exemplu, *HaGSL1* a indicat valori cantitative a ARNm cu 37% mai mari în țesutul radicular al plantelor infectate față de martor doar peste 18 zile, iar *HaGSL4* nu și-a modificat activitatea în nici una din etapele analizate, rămânând la nivelul de 0,007-0,1 u.c. Spre deosebire de *HaGSL1* și *HaGSL4*, în activitatea de transcripție a genelor *HaGSL2* și *HaGSL3* s-a conturat o tendință de sporire față de martor (cu 63% și respectiv 100%), însă doar la etapa finală a experimentului (67 zile) asociată cu îngroșarea calozică a cortexului (fig. 3).

Studii moleculare și histologice realizate de alți cercetători pe rădăcinile rezistente de floarea-soarelui penetrate de *O. cumana* au arătat o supra-expresie a genei *HaGSL1*, începând cu prima zi până la a 8-a după inoculare, iar prin microscopie de epifluorescență a fost atestată depunerea intensă de caloză la interfața dintre gazdă - parazit și în țesuturile rădăcinii, sub punctul de atașare a apresiului [10].

Echevarría-Zomeño și colab. (2006) au identificat depuneri disperse de caloză în apropierea zonei de infecție, în celule care nu sunt în contact direct cu planta- parazit [5], rezultate contrare celor raportate la mazărea infectată cu *O. crenata* [14] și alte patosisteme, unde caloză s-a acumulat în celulele direct învecinate cu patogenul.

Verma și Hong (2001) au demonstrat la *Arabidopsis* o specificitate funcțională a fiecărui membru din familia de 12 gene *GSL*. La infecția acestei plante cu mucegaiul *Blumeria graminis*, au fost observate depuneri de caloză la punctul de penetrare, iar din membrii familiei *GSL* doar *AtGSL5* a fost implicată în formarea papilelor de caloză [8].

Transcrierea genei *VfGSL5* la *Vicia faba* infectată cu *Puccinia striiformis* a manifestat o activitate crescută de la a 12-a zi până la a 24-a zi de infecție, după care a scăzut semnificativ [3].

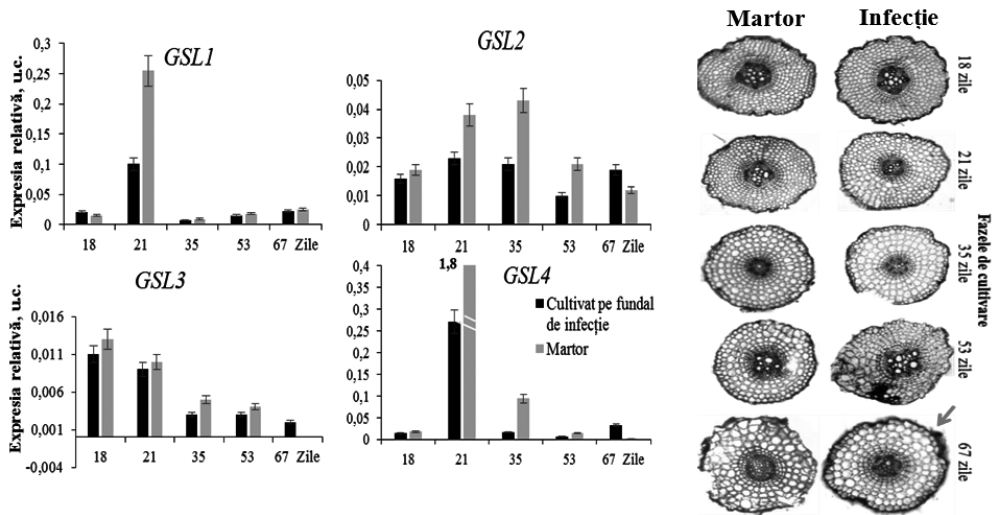


Figura 3. Nivelul de expresie a *GSL* și fenotipul țesutului radicular la genotipul PR64LE20.

Astfel, generalizând datele experimentale obținute pe genotipurile rezistente Favorit și PR64LE20, se constată legități similare în acumularea calozei sub acțiunea stresului biotic la nivelul cortexului (celulele în contact direct cu patogenul) și al cilindrului central (țesut ce nu comunică cu patogenul), observate și de alți autori la patosistemele descrise.

Rezultate deosebite celor obținute de noi, sunt cele arătate de Letousye și colab., (2007) care au constatat modificarea activității transcripționale doar a unei gene singure (*HaGSL1*) din cele 4 variante investigate în țesutul calusal de floarea-soarelui (LR1) infectat cu lupoaie (rasa E). Aceste rezultate pot fi explicate prin utilizarea materialului biologic diferit și a altor condiții experimentale (cultivarea *in vitro* a țesutului de floare-soarelui infectat cu semințe germinate de lupoaie, populații și rase diferite de lupoaie, etc.).

Analiza activității glucan-sintazei la plantele martor ale genotipului sensibil – Performer, spre deosebire de genotipurile rezistente, a relevat valori mai mari față de formele infectate în majoritatea cazurilor. Gena *HaGSL1* a indicat un nivel de expresie mai intens cu 133% față de martor la etapa de formare a lăstarilor subterani (35 zile), atunci când deja s-a produs infecția și patogenul s-a conectat la sistemul conducător al rădăcinii gazdei (fig. 4).

Evaluarea profilului de transcripție a genelor *HaGSL2-3* a pus în evidență valori crescute la două etape: de formare a primelor atașamente (18-21 zile) și dezvoltare a lăstarilor aeriени (67 zile) ale variantelor infectate de 2,7 ori pentru gena *HaGSL2* și de 3,7 ori pentru secvența *HaGSL3*. Acumularea calozei la nivelul stelului genotipului Performer a fost detectată la etapele de formare a lăstarilor subterani și aeriени de lupoaie.

Această discordanță temporală a depunerilor de caloză în raport cu activitatea de transcripție a *GSL*, observată inclusiv la genotipul rezistent Favorit poate fi explicată prin specificul evenimentelor de procesare post-transcripțională a produselor de expresie.

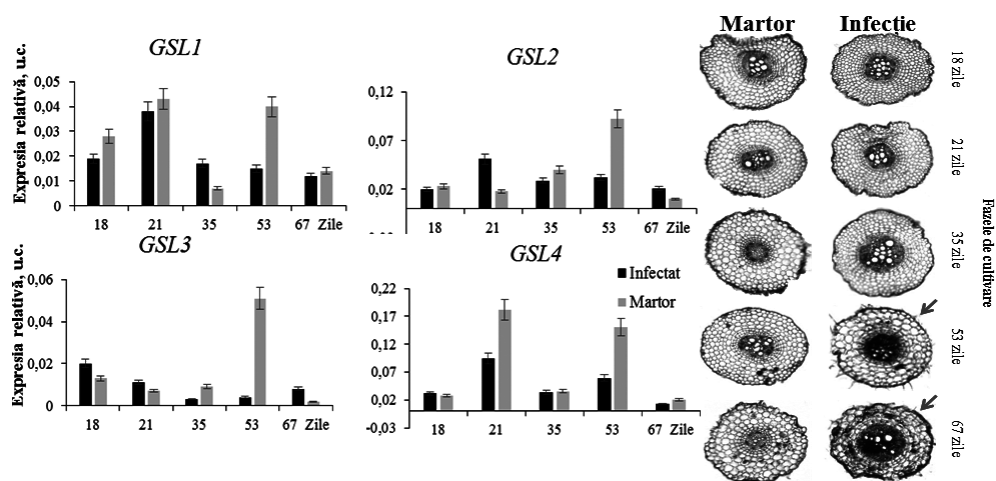


Figura 4. Nivelul de expresie a *GSL* și fenotipul țesutului radicular la genotipul Performer.

Cercetările altor autori indică, pentru genotipul sensibil de floarea-soarelui (2603) infectat cu lupoai, lipsa transcripțiilor genelor *GSL*, dar și un fon de fluorescență foarte slab al calozei la interfața gazdă-parazit [10]. Contrar acestor concluzii, în cazul plantelor de *Vicia faba* infectată cu *O. crenata* nu au fost depistate depuneri de caloză în interacțiunile compatibile [15].

Există diferite concepte cu privire la reacțiile de compatibilitate și incompatibilitate. De exemplu, susceptibilitatea plantelor este determinată nu de incapacitatea de a dezvolta mecanisme specifice defensive, dar de imposibilitatea detectării agentului patogen și/sau de a activa unele procese fiziologice datorită lipsei afinității față de o anumită rasă a acestuia.

Datele obținute corelate cu cele din literatură privind metabolismul calozei și semnificația acestui parametru în formarea reacției de răspuns a plantei la infecția cu *O. cumana* indică asupra necesității unei abordări mai largi a problemei, prin includerea în studiu a componentelor biochimici intermediari ai căii de sinteză și catabolism a polimerilor glucanici.

Concluzii

Analiza comparativă a activității de transcripție a patru gene care codifică glucan sintaze în trei variante de studiu: normă, incompatibilitate patogen-gazdă și patosistem a demonstrat profile diferite de expresie în cazul unei și aceleași reacții fiziologice (rezistență).

În combinația incompatibilă *Favorit* - *O. cumana*, toate cele patru gene *GSL* s-au caracterizat prin supraexpresie cu 260% , în special în primele etape de stabilire a conexiunilor mediate chimic cu semințele germinate de lupoai.

În cazul patosistemului *Performer* - *O. cumana* sporirea conținutului de transcripți a trei gene coincide cu invazia patogenului: *HaGSL1* după formarea haustoriilor, iar *HaGSL2* și *HaGSL3* la formarea primelor atașamente și dezvoltarea lăstarilor aerieni.

A fost pusă în evidență o dependență corelativă pozitivă în activitatea genelor *HaGSL2* și *HaGSL3* la diferite etape ontogenetice ale *O. cumana*, la toate genotipurile studiate.

Bibliografie

1. Bordallo J.J., Lopez-Llorca L.V., Jansson H.B., Salinas J., Persmark L., Asensio L. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. //New Phytologist, 2002, vol. 154(2), p. 491-499.
2. Chen X.Y., Kim J.Y. Callose synthesis in higher plants. //Plant Signaling & Behavior, 2009, vol. 4(6), p. 489-492.
3. Cheng Y., Zhang H., Yao J., Wang X., Xu J., Han Q., Wei G., Huang L., Kang Z. Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen. //BMC Plant Biology, 2012, vol. 12, p. 96.
4. Duca M., Tabara O. Histochemical aspects of *Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr. pathosystem. //Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași s. II a. Biologie vegetală, 2016, vol. 62(2), p. 19-28.
5. Echevarria-Zomeño S., Pérez-de-Luque A., Jorrín J., Maldonado A.M. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. //Journal of Experimental Botany, 2006, vol. 57(15), p. 4189–4200.
6. Ellinger D., Voigt C. A. Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. //Annals of Botany, 2014, vol. 114, p. 1349–1358.
7. Flors V., Ton J., Jakab G. Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? //J. Phytopathol., 2005, vol. 153, p. 377-383.
8. Jacobs A.K., Lipka V., Burton R.A., et al. An *Arabidopsis* callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. Plant Cell, 2003, vol. 15, p. 2503–2513.
9. Joel D.M., Steffens J.C., Matthews D.E. Germination of weedy root parasites. //In: Kigel J., Galili G., editors. Seed Development and Germination. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995. p. 567–597.
10. Letousey P., de Zélicourt A., Vieira Dos Santos C., Thoiron S., Monteau F., Simier P., Thalouarn P., Delavault P. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. //Plant Pathology, 2007, vol. 56, p. 536–546.
11. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. //Methods, 2001, vol. 25(4), p. 402-408.
12. 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. //Plant Physiol., 2007, vol. 145, p. 437–449.
13. Nishimura M.T., Stein M., Hou B.H., Vogel J.P., Edwards H., Somerville S.C. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. //Science, 2003, vol. 301, p. 969–972.
14. Pérez-de-Luque A., González-Verdejo C.I., Lozano M.D., Dita M.A., Cubero J.I., González-Melendi P., Risueño M.C., Rubiales D. Protein cross-linking, peroxidase and b-1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against *Orobanche crenata*. //Journal of Experimental Botany, 2006a, vol. 57, p. 1461–1469.
15. Pérez-de-Luque A., Lozano M.D., Moreno M.T., Testillano P.S., Rubiales D. Resistance to broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba*): cell wall changes associated with prehaustorial defensive mechanisms. //Annals of Applied Biology, 2007, vol. 151(1), p. 89–98.
16. Pérez-de-Luque A., Rubiales D. Interaction between *Orobanche crenata* and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite. //Annals of Botany, 2005b, vol. 95, p. 935-942.
17. Pricop S.M. și Cristea S. The attack of the *Orobanche cumana* Wallr. and its influence on a differential sunflower host assortment under Dobrogea conditions. //Research Journal of

Agricultural Science, 2012, vol. 44(2), p. 78-84.

18. Schwessinger B., Ronald P.C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. //Annu. Rev. Plant Biol, 2012, vol. 63, p. 451–482.

19. Serghini K. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobancha cernua* Loeft.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. //Journal of Experimental Botany, 2001, vol. 52, p. 2227-2234.

20. Verma D.P, și Hong Z. Plant callose synthase complexes. //Plant Molecular Biology, 2001, vol. 47: 693–701.

21. Voigt C.A. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. //Front. Plant Sci., 2014, vol. 5(168), p. 72-77.

22. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва, Колос, 1979. 414 с.