

CZU 633.854.78:581.142

AFINITATEA ȘI UNELE PARTICULARITĂȚI FIZIOLOGICE ALE DIFERITOR RASE DE LUPOAIE (*OROBANCHE CUMANA WALLR.*)

Maria DUCA, Angela PORT, Elena CERNOLEV, Ana MUTU, Rodica CHILARI
Universitatea Academiei de Științe a Moldovei

Abstract. The interaction between sunflower (host) and broomrape (parasite) is directly influenced by physiological and biochemical characteristics of the pathogen, characterized by affinity, virulence and aggressiveness. The parasitization process of broomrape begins with the germination of seeds and is induced by germination stimulants located in the rhizosphere of sunflower plants. In this study the germination capacity of broomrape seeds (45 populations collected from sunflower and tobacco agrocenosis) has been evaluated on exudates obtained from the root system of various sunflower genotypes: the sensitive genotype LMD1 and differential lines resistant to races E, F, G and H. Broomrape seeds from tobacco agrocenosis germinated on all studied exudates, showing a high level of affinity to host plant. Therefore, the germination inductors specific to sunflower induced the germination process of the parasite characteristic for the anthophytoses on tobacco plants. The average germination rate on the root exudate of the sensible genotype LMD1 was 15,2% and on the exudate of the race H differential (HLG 5661) - 17,7%. Indicators significantly lower were noted in the other variants under study.

Key-words: *Orobanche*; *Helianthus annuus*; Root exudates; Host-pathogen interaction; Affinity; Germination stimulants; Seed germination.

Rezumat. Interacțiunea dintre floarea-soarelui (gazdă) și lupoaie (parazit) este direct influențată de particularitățile fiziologice și biochimice ale patogenului, caracterizate prin afinitate, virulență, agresivitate. Procesul de parazitare a lupoaiei începe cu germinarea semințelor, indusă de stimulenți de germinare prezenți în rizosfera plantelor de floarea-soarelui. În acest studiu a fost evaluată capacitatea de germinare a semințelor de lupoaie (45 de populații colectate din agrocenoze de floarea-soarelui și tutun) pe exudate obținute din sistemul radicular al diferitor genotipuri de floarea-soarelui: genotipul sensibil LMD1 și linii diferențioare cu rezistența cunoscută la rasele de lupoaie E, F, G și H. Lupoaia din agrocenozele de tutun a germinat pe toate exudatele studiate, demonstrând un grad înalt de afinitate față de planta-gazdă. Astfel, stimulatorii de germinare specifici pentru floarea-soarelui au indus procesul de germinare a parazitului caracteristic antifitozelor pe plantele de tutun. Facultatea germinativă medie pe exudatul radicular al genotipului sensibil LMD-1 a constituit circa 15,2% și pe exudatul diferențiatorului pentru rasa H de lupoaie (HLG 5661) – 17,7%. Indici considerabil mai mici au fost constatați la celelalte variante luate în studiu.

Cuvinte-cheie: *Orobanche*; *Helianthus annuus*; Exudat radicular; Interacțiune gazdă-patogen; Afinitate; Stimulatori de germinare; Germinarea semințelor.

INTRODUCERE

Floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) reprezintă o cultură cu un spectru larg de utilizare, fiind și una dintre cele mai cultivate plante oleaginoase în lume, inclusiv în Republica Moldova. Una din cauzele semnificative care determină scăderea drastică a recoltei în aspect calitativ și cantitativ sunt fitoparaziții acestei culturi agricole, în special lupoaia (*Orobanche cumana* Wallr.).

Interacțiunea gazdă-parazit este într-o dependență strânsă atât de particularitățile fiziologice ale parazitului (manifestate prin afinitate, agresivitate, virulență) și ale gazdei (determinate de mecanismele de rezistență specifică, nespecifică și indusă), cât și de acțiunea factorilor de mediu.

O condiție primordială, necesară pentru asigurarea conviețuirii dintre cei doi parteneri și deci a posibilității apariției și evoluției bolii, o constituie afinitatea agentului patogen față de planta-gazdă (Butler, L.G. 1995; Hirsch, A.M. et al. 2003). În lipsa acestui mecanism de recunoaștere reciprocă, agentul patogen nu-și poate manifesta activitatea parazită și se comportă față de planta respectivă ca față de un substrat neutru, „indiferent” pentru el (Velichi, E. 2012).

Gradul de afinitate este determinat, în mare parte, de abilitatea plantei-gazdă de a produce și de a secreta în rizosferă compuși chimici cu funcții de semnalizare, față de care fitopatogenii manifestă receptivitate prin reacția de chemotropism (Press, M.C. et al. 1990; Degenhardt, J. et al. 2003). De aceea apropierea „partenerilor” se realizează doar atunci când patogenul nimerește – împreună cu apa, curenții de aer sau prin intermediul unui purtător – direct pe plantă sau în sol, lângă sistemul radicular al plantei (Keyes, W.J. et al. 2001).

Prin urmare, inițierea procesului de patogeneză necesită anumiți compuși chimici secretați de către rădăcinile plantei-gazdă, care asigură o modalitate de comunicare și semnalizare chimică, cu rol esențial în natură (Press, M.C. et al. 1990). Recunoașterea semnalului chimic produs de planta-gazdă contribuie atât la inițierea procesului de germinare (Chang, M. et al. 1986), cât și la dezvoltarea organului de atașare și formare a apresoriului (Butler, L.G. 1995; Keyes, W.J. et al. 2001).

Specificitatea interacțiunii dintre gazdă și parazit depinde de structura chimică a stimulanzilor, care reprezintă metaboliți secundari caracteristici pentru fiecare specie de plante (Hirsch, A.M. et al. 2003). De exemplu, procesul de parazitare al lupoaiei (*Orobanche cumana* Wallr.) începe cu germinarea semințelor, indusă de stimulenți de germinare prezenți în rizosfera plantelor de floarea-soarelui (Denev, I. et al. 2007).

Cea mai răspândită clasă de substanțe care stimulează germinarea semințelor de *Orobanche* și a altor specii de plante parazite obligate, așa ca *Striga*, sunt lactonele sesquiterpenice (Joel, D.M. et al. 2011; Raupp, F.M. et al. 2013), heliolactonele (Ueno, K. et al. 2014) și strigolactonele (Yoneyama, K. et al. 2011).

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul biologic. Studiul s-a axat pe cercetarea capacității de germinare a 45 de populații de *Orobanche cumana* Wallr. de origine locală (42 de populații colectate din regiunile de Sud și Centru ale Republicii Moldova), din Spania (regiunea Sevilla), România (Fundulea) și din Ucraina (Ismail).

În calitate de inductori ai procesului de germinare au fost utilizate exudatele genotipului sensibil de floarea-soarelui (LMD1) și exudate ale liniilor diferențiatore pentru rasele E (LMD2), F (LC 1093A), G (LMD3) și H (LG5661). În calitate de probă-control a servit germinarea semințelor pe hârtie de filtru umectată cu apă distilată sterilă. Fiecare populație a fost investigată în patru repetiții biologice a câte 100–150 de semințe de lupoaie.

Metode. Dezinfectarea semințelor de lupoaie s-a realizat în soluția de NaClO 12% și 1% Tween-20, timp de patru minute, cu agitare, ulterior fiind transferate în baia cu ultrasunet pentru 1 minut (Batchvarova, E. et al. 1999). Semințele de lupoaie, după ce au fost imersate repetat în apă distilată autoclavată pentru înlăturarea dezinfectantului, au fost amplasate în cutii Petri, sterilizate cu ajutorul lămpilor UV, pe hârtie de filtru autoclavată, umectată cu apă distilată sterilă în scopul condiționării, pe un termen de 7–12 zile în camera de cultivare „Friocell” și «TCBJL 80», la +20°C (El-Halmouch, Y. et al. 2006). În calitate de substrat a fost utilizată hârtia de filtru îmbibată cu 1 ml de exudat rizosferic al genotipului sensibil (LMD-1) sau al diferențiatorilor rezistenți la diferite rase de lupoaie (E, F, G și H).

Monitorizarea germinării și numărarea semințelor germinate s-au realizat în dinamică, la 7, 10 și 12 zile, la binocularul «MBS-10», mărimea 28, echipat cu cameră CCD (MEM1300, Future Optics Sci. & Tech. Co., Ltd), conectată la calculator.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Lupoaia parazitează floarea-soarelui și reprezintă o specie de antofite cu specializarea îngustă (monofagi). Monofagia este un factor evolutiv care favorizează perpetuarea speciei și formarea rapidă a raselor fiziologice prin dezvoltarea unor proprietăți biologice și fiziologice specifice, care asigură adaptarea parazitului la noile condiții de mediu. Schimbarea condițiilor de mediu determină variabilitatea parazitului, inclusiv evoluția acestuia. O achiziție evolutivă a organismelor parazite reprezintă existența afinității dintre agentul patogen și gazdă, inclusiv germinarea semințelor, inițiată de exudatele rădăcinilor plantei-gazdă. Această caracteristică a germinării este deosebit de importantă în procesul patologic și pentru receptivitatea plantelor la boli, în vederea asigurării unui grad mai mare de supraviețuire.

Semințele de lupoaie (1200-1500 în fiecare capsulă) sunt foarte mici, elipsoidale sau elongate, de culoare maro-închis. Fiind foarte ușoare (aproximativ 0,004 mg), acestea sunt transportate de curenții de aer și de apă la distanțe mari. Semințele rămase în sol își păstrează facultatea germinativă timp de 5-8 ani. În vecinătatea rădăcinilor de floarea-soarelui germinarea semințelor este indusă, astfel dezvoltându-se, ulterior, plantele de lupoaie. Germinarea semințelor de lupoaie reprezintă, așadar, prima etapă a procesului de parazitare, fiind indusă de către stimulenți de germinare secretați și eliminați de către rădăcinile plantelor gazdă în cantități foarte mici (Sato, D. et al. 2005; Glijin, A. et al. 2011).

Pornind de la aceste considerente, scopul prezentului studiu a constat în analiza exudatelor obținute din sistemul radicular al diferitor genotipuri de floarea-soarelui pentru a identifica nivelul de afinitate al

populațiilor de lupoaiie din Republica Moldova față de liniile diferențiatore, astfel încât să caracterizăm aceste populații și să relevăm rasa fiziologică a acestora.

Conform datelor obținute s-a constatat că, din totalul de 45 de populații de *Orobanche cumana* Wallr., doar o populație a germinat pe toate exudatele (colectată de pe tutun, satul Molovata Veche, raionul Dubăsari). Pe exudatul genotipului sensibil au germinat 20 de populații de lupoaiie, iar pe cel al liniei diferențiatore de rasa H – 21 de populații. S-au remarcat 13 populații ale agentului patogen, care au germinat pe ambele tipuri de exudate, reprezentând astfel 31,7% din totalul populațiilor analizate. Pe exudatul diferențiatorului rasei E au germinat 5 populații (12,2%), colectate preponderent din zona de centru a republicii, pe cel al diferențiatorului rasei F – 9,8%, iar în cazul diferențiatorului rasei G – mai puțin de 5,0%.

Facultatea germinativă medie a constituit circa 15,2% pe exudatul obținut din sistemul radicular al genotipului sensibil LMD-1 și 17,7% pe exudatul liniei diferențiatore la rasa fiziologică H LG5661. Indici considerabili mai mici au fost constatați la celelalte variante de studiu.

Absența germinării pe diverse tipuri de substrat la unele populații de lupoaiie poate fi explicată prin anumite condiții specifice de umiditate și temperatură, necesare pentru întreruperea stadiului de latență în timpul preconditionării (Matúšová, R. et. al. 2004). Temperatura utilizată pe perioada preconditionării afectează puternic capacitatea de reacție la stimulenții chimici (Mayer, A.M. et. al. 1995). Semințele plantelor-parazit sunt sensibile la stimulentele germinării doar pentru o perioadă scurtă de timp, putând trece apoi, relativ repede, din nou în starea de latență.

Dintre populațiile ce au germinat pe exudatul genotipului sensibil, 16 au avut un nivel de germinare sub 10%, majoritatea (56,3%) fiind colectate din zona de sud. Valori de 10-40% ale energiei de germinare a semințelor s-au constatat la 3 populații (colectate în satul Molovata Veche din raionul Dubăsari; satul Buțeni din raionul Ialoveni și satul Svetlâi din raionul Comrat), ceea ce constituie 15,0% din populațiile cu localizare geografică în Centrul și Sudul Republicii Moldova. Astfel, reieșind din distribuția geografică a populațiilor germinate pe exudatul rizosferic al genotipului sensibil, este evident că prevalează cele din zona de sud a țării (fig. 1).

Cele 20 de populații care au germinat pe exudatul rizosferic al genotipului sensibil de floarea-soarelui sunt colectate din or. Soroca, s. Drăgănești, s. Verejeni, s. Căzănești, s. Brânzenii Noi, or. Strășeni, s. Holercani, s. Molovata, s. Sângera, s. Buțeni, s. Fundul Galbenei, s. Cazangic, or. Cimișlia, s. Ermoclia, or. Ștefan Vodă, s. Svetlâi, s. Carabetovca, s. Corteni, s. Grigorievca, s. Alexanderfeld și populația din or. Ismail, Ucraina, reprezentând 56,1% din totalul populațiilor studiate (fig. 2).

Nouă populații de pe exudatul rizosferic al diferențiatorului rasei H, colectate preponderent din zona de centru și de sud, au prezentat un nivel foarte scăzut al facultății germinative (mai mic de 10%), în timp ce populațiile colectate din s. Holercani (Dubăsari), din or. Soroca, din Molovata Veche (Dubăsari) prezintă un grad ridicat de germinare (47,9-80,0%) (fig. 2).

Lupoaiia, ca plantă holoparazită, poate supraviețui doar în cazul când obține resursele nutritive de la planta-gazdă. Semințele lupoaiiei sunt foarte mici și nu conțin substanțele de rezervă necesare pentru creștere și dezvoltare (Masirevic, S.T. et. al. 2014), de aceea, dacă nu reușesc să se atașeze de planta-gazdă, germenii pier (Butler, L.G. 1995). Asemenea efecte au fost constatate și în cadrul cercetărilor noastre.

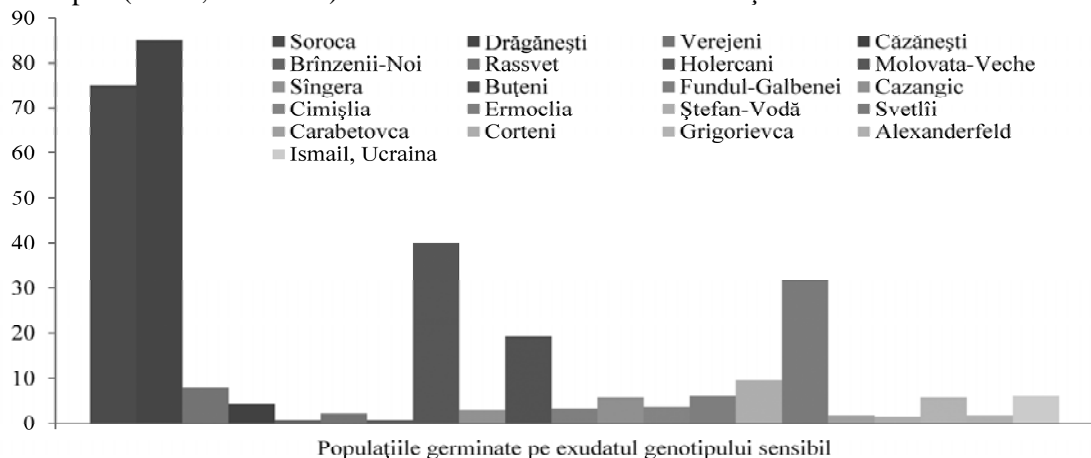


Figura 1. Germinarea (%) semințelor de *Orobanche cumana* Wallr. pe exudatul genotipului sensibil LMD-1

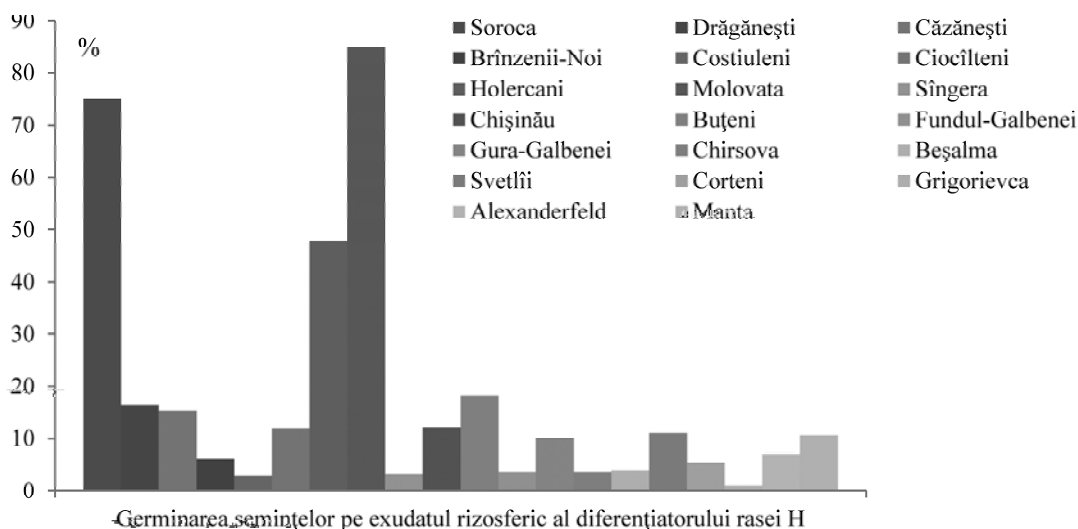


Figura 2. Germinarea semințelor de *O. cumana* Wallr. pe exudatul diferențiatorului rasei H (LG5661)

În baza datelor analizate putem constata că majoritatea rezultatelor au fost obținute la a 7-a zi de germinare și doar 20-25% din variantele incluse în studiu au manifestat o majorare nesemnificativă a energiei germinative în cea de-a 10-a și a 12-a zi. Germinarea semințelor de *Orobancha cumana* evaluată în dinamică a demonstrat că, datorită dependenței existențiale a semințelor plantei-parazit de statutul biochimic al mediului format de rizosfera plantei-gazdă și de conținutul mic de substanțe nutritive al endospermului, germeii pier peste 3-4 zile. Astfel, la a 12-a zi, semințele germinate, epuizându-și energia metabolică, chiar și în prezența mediatorilor chimici, neîntâlnind rădăcinile plantei-gazdă, degenerază.

Considerăm că facultatea germinativă în astfel de experimente poate fi analizată la a 7-10-a zi (fig. 3), având în vedere și procesul laborios de analiză, minuțiozitatea acestuia.

Cercetările privind identificarea stimulenților de germinare, cu rol crucial în ciclul de viață al plantelor parazite, au o importanță deosebită pentru proiectarea de noi strategii de control și protecție împotriva plantelor parazite, în general, și al lupoaiiei, în particular. Din acest punct de vedere, pentru elaborarea tehnologiilor agricole intensive și ecologice de cultivare, asemenea studii constituie un obiectiv important de-a lungul anilor.

Germinarea semințelor de lupoaiie, ca primă etapă a procesului de parazitare, a fost studiată în prezența produșilor naturali (strigol, sorgolactone, orobanchol și alectrol), izolați din plante-gazde și plante nongazde (Cook, C.E. et al. 1972; Yoneyama, K. et al. 2004; Sato, D. et al. 2005), dar și în prezența mai multor compuși sintetici, cum ar fi GR24, analog al strigolului (Reizelman, A. et al. 2002). În majoritatea cazurilor s-a constatat că procesul de recunoaștere gazdă-parazit este strict specific, dar germinarea se realizează și pe exudate nongazdă, iar lipsa de afinitate dintre agenții patogeni și diferite gazde nu poate fi considerată ca un fenomen de rezistență.

Un caz deosebit de interesant, observat în cadrul cercetărilor realizate, a fost germinarea semințelor de lupoaiie colectate din câmpurile de tutun din s. Molovata Veche, Dubăsari. Spre deosebire de semințele de lupoaiie colectate din agrocenozele de floarea-soarelui, aceste semințe au germinat pe toate exudatele nongazdă. Cele mai înalte valori ale energiei și facultății germinative s-au constatat în variantele cu exudat obținut din sistemul radicular al genotipului sensibil și liniilor diferențiatorare ale raselor G și H (cca 70%), urmate de exudatele diferențiatorilor raselor F (16,4%) și E (2,8%). Astfel, stimulatorii germinativi specifici florii-soarelui au indus procesul de germinare al parazitului caracteristic antofitozelor pe plantele de tutun.

Conform datelor obținute putem presupune că majoritatea populațiilor de lupoaiie au o reacție similară la semnalul molecular de recunoaștere și că evoluția conjugată gazdă-parazit se manifestă începând cu primul nivel de interacțiune, cel de recunoaștere.

Dinamica germinării semințelor (zile/% semințe germinate)









	7 zile		10 zile		
		%		%	
Populații de lupoai	O2		73,2		75,0
	O4		85,0		90,0
	O20		18,6		19,2
	O32		70,6		70,7

Figura 3. Germinarea semințelor de lupoai pe diferite exudate de floarea-soarelui

CONCLUZII

Studiile efectuate confirmă existența mecanismelor specifice de comunicare a plantelor prin recunoașterea de către fitoparaziți a semnalelor chimice existente în exudatele radiculare ale plantelor de cultură. În conformitate cu rezultatele obținute, menționăm nivelul suficient de înalt de afinitate a agentului patogen față de planta-gazdă cu o pondere mai pronunțată pe exudatele obținute din genotipul sensibil de floarea-soarelui și cel obținut de pe liniile diferențiator rezistente ale ultimelor rase fiziologice. Lupoaiă colectată din agrocenozele de tutun a demonstrat un procent de germinare înalt pe toate exudatele analizate.

Cercetările au fost realizate în cadrul proiectului „Rezistența florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.) la lupoai (*Orobanche cumana* Wallr.): mecanisme genetico-moleculare și fiziologice” 15.817.05.03F

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. BATCHVAROVA, E., GRYNING, S.E., STEYN, D. (1999). Modelling internal boundary-layer development in a region with a complex coastline. In: *Boundary-Layer Meteorology*, vol. 90, pp. 1-20. ISSN 1573-1472.
2. BUTLER, L.G. (1995). Chemical communication between the parasitic weed *Striga* and the crop host: a new dimension in allelochemistry. In: *Allelopathy: organism, processes and application* (K.Inderjit, M.M. Dakshini, F.A. Einhellig, Eds.), ASC Symposium Series, vol. 582, pp. 158-168.
3. CHANG, M., NETZLY, D.H., BUTLER, L.G. et al. (1986). Chemical regulation of distance: characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica*. In: *Journal of the American Chemical Society*, vol. 108(24), pp. 7858-7860. ISSN 0002-7863.
4. COOK, C.E., WHICHARD, L.P., WALL, M.E., et al. (1972). Germination stimulants. 2. The structure of strigol-a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). In: *Journal of American Chemical Society*, vol. 94(17), pp. 6198-6199. ISSN 0002-7863.
5. DEGENHARDT, J., GERSHENZON, J., BALDWIN, I.T., et al. (2003). Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. In: *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14(2), pp. 169-176. ISSN 0958-1669.
6. DENEV, I., DENEVA, B., BATCHVAROVA, R. (2007). The biosynthetic origin of germination stimulants for *O. ramosa* in tobacco and *Arabidopsis*. In: *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 21(1), pp. 54-57.
7. EL-HALMOUCH, Y., BENHARRAT, H., THALOUARN, B. (2006). Effect of root exudates from different tomato genotypes on broomrape (*O. aegyptiaca*) seed germination and tubercle development. In: *Crop Protection*, vol. 25, pp. 501-507. ISSN 0261-2194.
8. GLIJIN, A., ACCIU, A., MITA, E. (2011). Effect of root exudation from different sunflower genotypes on broomrape seed germination. In: *International Symposium on Broomrape (Orobanchae spp.) in Sunflower: proceedings of sym., 25-27 August, Chisinau, Moldova*, p. 23.
9. HIRSCH, A.M., BAUER, W.D., BIRD, D.M. et al. (2003). Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. In: *Ecology* (Ecological Society of America), vol. 84(4), pp. 858-868.
10. JOEL, D.M., CHAUDHURI, S.K., PLAKHINE, D., ZIADNA, H., STEFFENS, J.C. (2011). Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanchae cumana*. In: *Phytochemistry*, vol. 72, pp. 624-634. ISSN 0031-9422.
11. KEYES, W.J., TAYLOR, J.V., APKARIAN, R.P., et al. (2001). Dancing together: social controls in parasitic plant development. In: *Plant Physiology*, vol. 127(4), pp. 1508-1512.
12. MASIREVIC, S.T., MEDIC-PAP, S., TERZIC, A. (2014). Broomrape seed germination on nutritive media and possibility of its biological control. In: *Helia*, vol. 35, pp. 79-86. ISSN 1018-1806.
13. MATUŠOVÁ, R., VAN MOURIK, T., BOUWMEESTER, H.J. (2004). Changes in the sensitivity of parasitic weed seeds to germination stimulants. In: *Seed Science Research*, vol. 14 (4), pp. 335-344. ISSN 0960-2585.
14. MAYER, A.M., BAR NUN, N. (1995). Germination of *Orobanchae* seeds: some aspects of metabolism during preconditioning. In: *Basic and applied aspects of seed biology: proceedings of the fifth international workshop on seeds*. Reading. Kluwer Academic Publishers, pp. 633-639. ISBN: 978-94-010-6410-1.
15. PRESS, M.C., GRAVES, J.D., STEWART, G.R. (1990). Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. In: *Plant, Cell and Environment*, vol. 13(2), pp. 91-104. ISSN 1365-3040.
16. RAUPP, F.M., SPRING, O. (2013). New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobanchae cumana*. In: *J. Agric Food Chem.*, vol. 61, pp. 10481-10487. ISSN 0021-8561.
17. REIZELMAN, A., ZWANENBURG, B. (2002). An efficient enantioselective synthesis of strigolactones with a palladium-catalyzed asymmetric coupling as the key step. In: *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 5, pp. 810-814. ISSN 1099-0690.
18. SATO, D., AWAD, A.A., TAKEUCHI, Y. (2005). Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobanchae*, produced by cotton. In: *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 69 (1), pp. 98-102. ISSN 0916-8451.
19. UENO, K., FURUMOTO, T., UMEDA, S., MIZUTANI, M., TAKIKAWA, H., BATCHVAROVA, R., SUGIMOTO, Y. (2014). Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. In: *Phytochemistry*, vol. 108, pp. 122-128. ISSN 0031-9422.
20. VELICHI, E. (2012). *Fitopatologie generală și specială*. București. Editura Universitară. 201 p. ISBN 978-606-591-511-4.
21. YONEYAMA, K., TAKEUCHI, Y., SATO, D. (2004). Determination and quantification of strigolactones. In: *Proceedings of the 8th international parasitic weeds symposium, Durban (South Africa), June 24-25*.

Data prezentării articolului: 06.09.2016

Data acceptării articolului: 18.11.2016