ANALIZA EXPRESIEI GENEI *NPR1* LA UNELE GENOTIPURI DE FLOAREA-SOARELUI CU REZISTENȚĂ DIFERITĂ LA *Orobanche cumana*

ANALYSIS OF *NPR1* GENE EXPRESSION IN SOME SUNFLOWER GENOTYPES WITH DIFFERENT RESISTANCE TO *Orobanche cumana*

CZU: 632.5:633.854.78 **https://doi.org/10.59295/spd2025e.08**

Maria DUCA
ORCID: 0000-0002-5855-5194
E-mail: maria.duca@usm.md
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor,
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Steliana CLAPCO
ORCID: 0000-0001-7147-2740
E-mail: steliana.clapco@usm.md
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor,
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Angela PORT
ORCID: 0000-0003-3994-8918
E-mail: angela.port@usm.md
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor,
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Ana MUTU
ORCID: 0000-0001-8603-142X
E-mail: ana.mutu@usm.md
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor,
Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova

Summary. *Broomrape (Orobanche cumana Wallr.) is a root holoparasite that severely affects sunflower crops, significantly reducing yield in the majority of sunflower-growing countries. Genetic improvement through the development of resistant genotypes remains one of the most effective and sustainable control strategies. This study analyzed the relative expression of the NPR1 gene, a key regulator of systemic acquired resistance (SAR), in three sunflower hybrids with different resistance levels during the pre-attachment stage of host–parasite interaction. The expression profile of the NPR1 gene remained relatively constant during the first 12 hours post-*

inoculation, both under control conditions and in the presence of germinated O. cumana seeds in all three hybrids studied. In contrast, at 24 hours post-inoculation, strongly reduced levels were found in the sensitive genotype.

Keywords: ge*ne expression, Helianthus annuus, NPR1, Orobanche cumana, parasite resistance.*

INTRODUCERE

Lupoaia (*Orobanche cumana* Wallr.) reprezintă un factor major de limitare a producției de floarea-soarelui în numeroase țări cultivatoare. Fiind un holoparazit lipsit de clorofilă, aceasta extrage substanțele nutritive din organismul plantei gazdă, la nivelul rădăcinilor, ceea ce duce la pierderi semnificative de recoltă [1]. Ameliorarea genetică în vederea obținerii unor genotipuri rezistente rămâne a fi o soluție eficientă și durabilă.

În funcție de faza de dezvoltare a patosistemului, au fost descrise trei tipuri majore de rezistență: rezistența la faza de *pre-atașare*, principalele mecanisme defensive constând în exudarea redusă a stimulilor de germinare, secretarea inhibitorilor de germinare sau/și de dezvoltare a radiculei, rezistența *post-atașament/pre-haustorială*, caracterizată prin dezvoltarea unor bariere fizice, precum lignificarea, suberizarea, sau acumularea de caloză și rezistența *post-haustorială,* exprimată prin secreția de substanțe toxice de natură fenolică care compromit formarea conexiunii vasculare gazdă-parazit [2].

Rezistența este considerată a fi reglată atât de mecanisme poligenice cantitative, cât și calitative. De asemenea, studiile anterioare au relevat că rezistența poate fi indusă și prin activarea răspunsului sistemic dobândit (RSD), declanșat, de regulă, la producerea de acid salicilic (AS) [3]. Creșterea nivelului de AS nu doar susține rezistența bazală la locul infecției și supraviețuirea celulelor adiacente, dar este esențială inclusiv pentru conferirea unei imunități de lungă durată și cu spectru larg care protejează planta împotriva infecțiilor secundare provocate de o gamă variată de patogeni. Aceste răspunsuri biologice se caracterizează prin reglarea coordonată a expresiei unui număr mare de gene de apărare (PR- *pathogenesis related*) [4, 5]. Activarea acestor mecanisme necesită prezența proteinei NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*) – o proteină-cheie implicată în răspunsul plantelor la atacul patogenilor, a cărei activitate este esențială pentru instalarea rezistenței sistemice dobândite.

În cadrul unor studii moleculare anterioare, care au inclus o serie de hibrizi și linii de floarea-soarelui cu niveluri diferite de rezistență la rizoparazitul lupoaia, în fazele tardive de dezvoltare a patosistemului *Orobanche cumana – Helianthus annuus,* a fost formulată ipoteza potrivit căreia gena *NPR1* are un rol esențial în inițierea răspunsului de tip RSD la faze incipiente ale contactului gazdă-parazit [6, 7]. Astfel, s-a constatat că supraexpresia genei *AtNPR1* în *Arabidopsis thaliana* a sporit rezistența plantei față de *Pseudomonas syringae* și *Peronospora parasitica* [8]. Nivelul de expresie ale genei *NPR1* la trestia de zahăr a crescut semnificativ în urma infecției cu micromiceta *Usti-*

lago scitaminea, atingând valori maxime peste 24 de ore după inoculare [9]. Rezultate similare au fost obținute la orez [10], grâul infectat cu *Blumeria graminnis f. sp. tritici,* valorile expresiei fiind de cca 3.5 ori mai înalte față de martor în primele 6-24 ore după inoculare [11].

De asemenea, reacția hipersensibilă a florii-soarelui în cazul infecției cu *Plasmopara halstedii,* agentul cauzal al manei, a fost asociată cu activarea timpurie și locală a genei *NPR1* [12]. Aceste rezultate indică faptul că *NPR1* reprezintă un factor genetic promițător pentru ameliorarea culturilor agricole în vederea sporirii rezistenței la boli prin transgeneză.

În contextul celor expuse, studiul de față își propune să investigheze modificările în nivelul de expresie a genei *NPR1* ca răspuns al florii-soarelui la infestarea cu *Orobanche cumana* Wallr., prin analiza cantitativă a transcripților la trei genotipuri cu niveluri diferite de rezistență, la patru intervale de timp (2, 6, 12 și 24 ore), atât în condiții de control (absența parazitului), cât și în prezența holoparazitului.

MATERIALE ȘI METODE

Material biologic. În studiu au fost incluși trei hibrizi de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.), caracterizați prin comportament distinct față de patogenul *Orobanche cumana*. Doi dintre aceștia, Favorit (purtător al genei *Or6* – rezistent la rasa F) și P64LE20 (rezistent la rasa G de lupoaie), prezintă toleranță la infestarea cu lupoaie, iar Performer este un hibrid susceptibil, lipsit de gene de rezistență. Semințele de floarea-soarelui au fost oferite de către colegii din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea (România). Semințele au fost germinate în cutii Petri, pe un strat de perlit steril, iar plantele au fost crescute până la stadiul de două frunzulițe adevărate. Stresul biotic a fost indus artificial prin introducerea în mediu a semințelor de *O. cumana* germinate în prealabil pe exudat provenit de la un genotip sensibil.

Probele de țesut radicular au fost recoltate de la plantele crescute în două regimuri experimentale: (i) în prezența semințelor germinate de *O. cumana* (condiții infecțioase simulate) și (ii) în absența acestora (martor). Prelevarea s-a realizat la patru intervale de timp: 2, 6, 12 și 24 de ore, ceea ce corespunde fazei timpurii a interacțiunii plantei cu patogenul.

Izolarea ARN-ului și sinteza ADNc. ARN-ul total a fost extras din țesuturi radiculare congelate în azot lichid, utilizând reactivul TRI-zol (Applied Biosystems), conform protocolului standard. Calitatea și cantitatea ARN-ului a fost evaluată spectrofotometric (la lungimea de undă 260 și 280 nm) și prin migrare pe gel de agaroză 1%. Revers-transcripția s-a realizat cu ajutorul kitului RevertAid RT, folosind primeri Oligo(dT)18 și hexameri aleatorii conform instrucțiunilor producătorului (Fermentas).

Analiza expresiei genice prin Real-Time PCR. Expresia relativă a genei *NPR1* a fost determinată prin PCR în timp real, folosind sistemul QuantStudio® 5 (Appli-

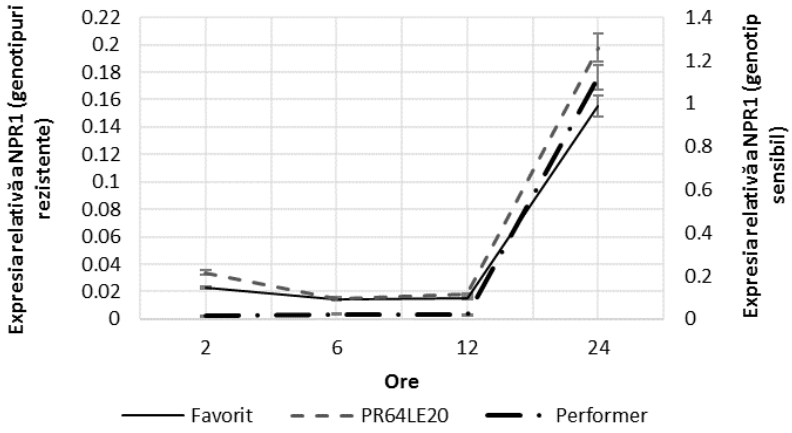
ed Biosystems). Protocolul de amplificare a inclus etapele: 95°C timp de 10 minute, urmate de 5 cicluri (95°C – 15 s; 64°C – 20 s) și apoi 40 cicluri (95°C – 15 s; 60°C – 40 s). Pentru reacțiile de amplificare a fost utilizat Maxima SYBR Green/ROX PCR (Fermentas), primeri specifici (0,4 µM) și 2 µl de ADNc.

Secvențele nucleotidice cunoscute la *Helianthus annuus*, corespunzătoare genei *NPR1* (GenBank: AY667500.1) și genei de referință - actina (AF282624.1), au fost utilizate pentru proiectarea primerilor specifici. Primerii pentru gena de interes au fost F: agacgaatccaaaatcacgtt, R: gattaacatccgcacggttt. Calculul nivelului de expresie relativă a fost realizat conform metodei $2^{\wedge-\Delta\Delta CT}$ descrise de Livak și Schmittgen [13].

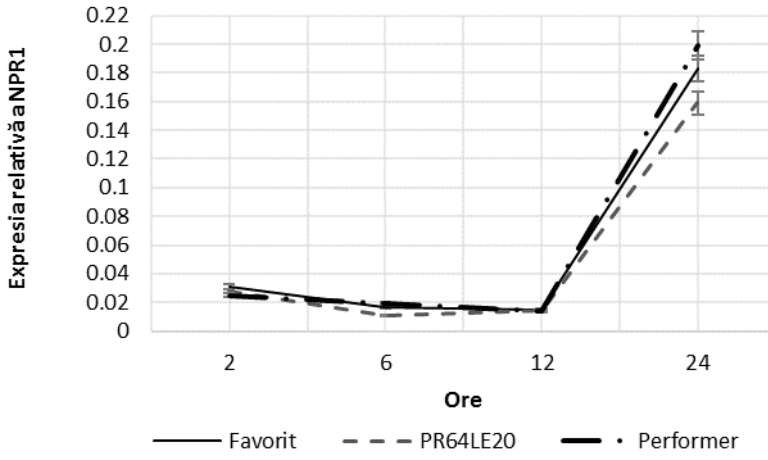
Pentru estimarea diferențelor semnificative statistic s-a utilizat testul *t* standard ($p \leq 0,05$). Modificările expresiei cu valori ale *Fold Change (FC)* mai mari sau egale cu 1,5 sau mai mici de -1,5 au fost considerate semnificative.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Profilul de expresie a genei *NPR1* este similar în probele martor și cele cultivate în prezența semințelor de lupoaie germinate, prezentând valori relativ constante în toate genotipurile în primele 12 ore și o creștere peste 24 ore, ușoară – în cazul hibrizilor rezistenți și pronunțată – la genotipul sensibil (Figura 1). Astfel, în cazul martorului cantitatea de transcripți ai genei *NPR1* a variat între 0.014 și 0.034 până la 12 ore, crescând ulterior până la 0.155 la Favorit, 0.198 la PR64LE20 și 1.121 la Performer. În plantele infestate, nivelul expresiei genei NPR1 a variat între 0.031 și 0.14 în primele 12 ore post-inoculare, crescând ușor la 24 de ore, când s-au înregistrat valori similare pentru toate cele trei genotipuri analizate: 0.183 la Favorit, 0.159 la PR64LE20 și 0.199 la Performer.



A.



B.

Figura 1. Expresia relativă a genei *NPR1* la diferite genotipuri de floarea-soarelui cultivate în absența (A) și în prezența parazitului *O. cumana* Wallr. (B)

Atât în cazul variantei martor, cât și în cea experimentală diferențele dintre cantitatea de transcripți ai genei *NPR1* acumulați pe parcursul perioadei testate nu diferă semnificativ între hibrizi, fenomen ce poate fi explicat prin faptul că la fazele incipiente de contact gazdă-parazit, expresia genei nu este modificată, fiind, posibil, inițial mobilizate proteinele NPR1 din citoplasmă. Se cunoaște că gena *NPR1* este expresată constitutiv în plante, iar proteinele sintetizate, în absența infecției sau a tratamentului cu acid salicilic sau cu analogul său acidul 2,6-dicloroisonicotinic, se acumulează în citoplasmă. Astfel, la *Arabidopsis* s-a stabilit că transcripțiii genei *NPR1* se acumulează constitutiv la un nivel bazal scăzut, iar în urma infecției cu un agent patogen sau a tratamentului cu acid salicilic acest nivel poate fi dublat sau chiar triplat [14]. Proteina NPR1 se acumulează în citoplasmă sub formă oligomerizată, menținută prin legături disulfidice. Drept urmare a infecției nivelul AS și statutul redox al celulei se modifică, ceea ce determină ruperea legăturilor disulfidice și permite translocarea NPR1 în nucleu, unde aceasta contribuie la activarea expresiei genelor implicate în răspunsul de apărare, inducând, în final, RSD [15].

Odată cu inducerea rezistenței sistemice dobândite, este necesară și activarea proteinei NPR1, deoarece exprimarea constitutivă a *NPR1* în absența unui factor inductor nu conduce la exprimarea constitutivă a genelor PR (*pathogenesis-related*) și nici la instalarea rezistenței.

Raportarea valorilor expresiei genei *NPR1* din probele co-cultivate cu *Orobanche cumana* la cele din martor a evidențiat modificări statistic semnificative doar la genotipul sensibil (Figura 2). Această scădere a nivelului transcripțional este deosebit de accentuată peste 24 ore post-inoculare, remarcându-se o reducere de 5,6 ori.

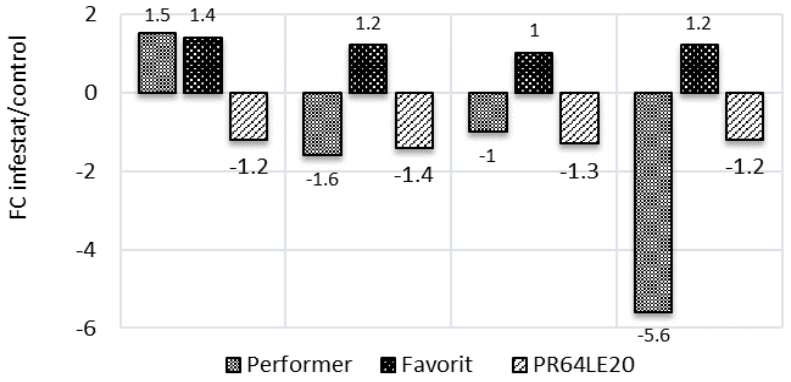


Figura 2. Valorile raportului de expresie a genei *NPR1* la plantele cultivate în absența și în prezența parazitului *O. cumana* Wallr.

Rezultatele obținute în faza de pre-atașament se diferențiază clar de cele observate în fazele tardive ale infecției, precum formarea primelor atașamente (18 zile), dezvoltarea tuberculilor (35 de zile), formarea lăstarilor subterani (53 de zile) și a lăstarilor aerieni (67 de zile) [7]. Astfel, Performer a manifestat un profil de supraexpresie constantă pe parcursul întregii perioade de analiză a patosistemului, cu valori semnificative la faza de dezvoltare a tuberculilor și a lăstarilor aerieni, fapt sugerează o reacție compensatorie tardivă, dar insuficientă pentru a asigura rezistența eficientă. În schimb, genotipurile rezistente au prezentat o subexpresie semnificativă preponderent în fazele de formare a lăstarilor subterani și aerieni, urmând, posibil, un model de apărare rapid în fazele incipiente, urmat de reprimarea căii RSD odată cu avansarea infecției.

Tendința de diminuare a activității genei în fazele tardive de interacțiune gazdă-patogen a fost constatată inclusiv la un șir de linii de floarea-soarelui (MS-2067A, MS-2077A și MS-2091A), unde în majoritatea cazurilor a fost relevată subexpresia genei *NPR1*, presupunându-se că în etapele avansate ale infecției, alte căi metabolice și gene de apărare devin dominante în menținerea rezistenței plantei [6].

CONCLUZII

Profilul expresiei genei *NPR1* este similar în probele martor și cele cultivate în prezența semințelor germinate de lupoaie, prezentând valori constante în primele 12 ore, urmate de o creștere moderată la genotipurile rezistente și pronunțată la genotipul sensibil la 24 ore post-inoculare. La nivelul expresiei *NPR1* în fazele incipiente ale interacțiunii gazdă-parazit nu s-au observat diferențe semnificative între hibrizi. Aceste rezultate concordă cu datele din literatura de specialitate, conform cărora *NPR1* este expresată constitutiv la niveluri scăzute, iar activarea sa post-infecție depinde în principal de modificări post-translaționale. Una dintre acestea este schimbarea statutului redox care determină reducerea tranzitorie a legăturilor disulfidice din forma oligomerică

a proteinei și translocarea monomerului NPR1 în nucleu, unde activează genele *PR*, declanșând răspunsurile de apărare.

Variațiile în nivelul de expresie a genei *NPR1* în probele co-cultivate cu *Orobanche cumana*, comparativ cu martorul, a evidențiat modificări statistic semnificative exclusiv la genotipul sensibil, conținutul de transcripți fiind puternic redus (de aproximativ 6 ori) la 24 de ore post-inoculare.

REFERINȚE:

1. DOMÍNGUEZ, J. R-41, a sunflower restorer inbred line, carrying two genes for resistance against a highly virulent Spanish population of *Orobanche cernua*. In: *Plant Breed.* 1996, 115, p. 203–204.
2. SISOU, D., TADMOR, Y., PLAKHINE, D., ZIADNA, H., HÜBNER, S., EIZENBERG, H. Biological and transcriptomic characterization of pre-haustorial resistance to sunflower broomrape (*Orobanche cumana* W.) in sunflowers (*Helianthus annuus*). In: *Plants*. 2021, 10, 1810. https://doi.org/10.3390/plants10091810
3. 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. In: *Plant Pathology*. 2007, 56(3), p. 536–546. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059-.2007.01575.x
4. ZAVALIEV, R., DONG, X. NPR1, a key immune regulator for plant survival under biotic and abiotic stresses. In: *Molecular Cell*. 2024, 84(1), p. 131–141. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.11.018
5. ZHOU, J.M., TRIFA, Y., SILVA, H., PONTIER, D., LAM, E., SHAH, J., KLESSIG, D.F. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2000, 13(2), p. 191–202. https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.191
6. ŞESTACOVA, T., GISCĂ, I., CUCEREAVÎI, A., PORT, A., DUCA, M. Expression of defence-related genes in sunflower infected with broomrape. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016, 30(4), p. 685–691.
7. DUCA, M., MARTEA, R., PORT, A., CLAPCO, S. Factori de transcripție implicați în răspunsul florii-soarelui la acțiunea lupoiaei. In: *Revista de Ştiinţă, Inovare, Cultură şi Artă „Akademos”*. 2022, 2(65), p. 54–62. https://doi.org/10.52673/18570461.22.2-65.03
8. DELANEY, T.P., FRIEDRICH, L., RYALS, J.A. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1995, 92, 6602–6606. https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6602

9. CHEN, J.-W., KUANG, J.-F., PENG, G., WAN, S.-B., LIU, R., YANG, Z.-D., DENG, H.-H. Molecular cloning and expression analysis of a NPR1 gene from sugarcane. In: *Pakistan Journal of Botany*. 2012, 44(1), p. 193–200.
10. CHERN, M.S., FITZGERALD, H.A., YADAV, R.C., CANLAS, P.E., DONG, X., RONALD, P.C. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1 mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. In: *Plant Journal*. 2001, 27, p. 101–113.
11. AHANGAR, L., RANJBAR, G.A., BABAEIZAD, V., NAJAFI ZARRINI, H., BIABANI, A. Assay of NPR1 gene expression in wheat under powdery mildew stress. In: *Journal of Crop Protection*. 2017, 6(1), p. 157–166.
12. RADWAN, O., MOUZEYAR, S., VENISSE, J.S., NICOLAS, P., BOUZIDI, M.F. Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. In: *Journal of Experimental Botany*. 2005, 56(420), p. 2683–2693. https://doi.org/10.1093/jxb/eri261
13. LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. In: *Methods*. 2001, 25, p. 402–408.
14. CAO, H., GLAZEBROOK, J., CLARK, J.D., VOLKO, S., DONG, X. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. In: *Cell*. 1997, 88, p. 57–63. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81858-9
15. MOU, Z., FAN, W., DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. In: *Cell*. 2003, 113(7), p. 935–944. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00429-x

N.B.*Studiul a fost realizat în cadrul Subprogramului „011101 Abordări genetice și biotehnologice de management al agroecosistemelor în condițiile schimbărilor climatice”, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării a Republicii Moldova.*