FACTORI DE TRANSCRIPȚIE IMPLICAȚI ÎN RĂSPUNSUL FLORII-SOARELUI LA ACȚIUNEA LUPOIAEI

CZU: [633.854.78+582.952.6]:575.1
DOI: https://doi.org/10.52673/18570461.22.2-65.03

Academician **Maria DUCA**
E-mail: mduca2000@yahoo.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5855-5194
Doctor în biologie **Rodica MARTEA**
E-mail: rodica.martea@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1244-7147
Doctor în biologie **Angela PORT**
E-mail: portang@yahoo.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3994-8918
Doctor în biologie **Steliana CLAPCO**
E-mail: clapcostela@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7147-2740
Universitatea de Stat din Moldova

TRANSCRIPT FACTORS INVOLVED IN THE SUNFLOWER RESPONSE TO THE BROOMPARE ACTION

Summary. The present research is focused on bioinformatics and genes expression analysis aiming to elucidate new aspects of resistance mechanisms in the experimental model of the sunflower-broomrape interaction. The qPCR analysis of *WHY1*, *TGA2* and *TGA5* transcription factors revealed transient, oscillating changes in the accumulation of mRNA in plants cultivated in the absence and presence of pathogen in dynamics. The highest level of relative expression of WHY1 factor was attested in the roots of host plant during the stage of aerial shoots development (67 days), contrary to factors belonging to *TGA* family, which showed minimal values of the relative expression at the same stage of development. In the most of cases *WHY1*, *TGA2* and *TGA5* genes were found to be suppressed in the roots of sunflower-resistant genotypes under biotic stress. The higher number of gene interactions is *due to co-expression* in the case of *WHY1* (93.68 %) and the presence of *common protein domains* in the case of *TGA* family factors (70 %). Associations between the *NPR1* gene with *TGA2* (46 connections) and *TGA5* (33 interactions) have also been identified. The highest fluctuations in the level of relative expression of the *NPR1* gene (key element in the manifestation of plant resistance) are found in the sensitive genotype Performer, in the case of noninfested plants and in resistant hybrid PR64LE20 under biotic stress.

Keywords: transcription factors, pathosystem, broomrape, gene networks, gene expression

Rezumat. Investigațiile prezentate s-au axat pe utilizarea instrumentelor bioinformatice și analiza expresiei genice în vederea elucidării unor noi aspecte ale mecanismelor de rezistență în cadrul modelului experimental de interacțiune floarea-soarelui – lupoaie. Datele qPCR ale factorilor de transcripție *WHY1*, *TGA2* și *TGA5* au evidențiat modificări tranzitorii, cu caracter oscilatoriu, în acumularea ARNm în dinamică dezvoltării plantelor cultivate în absența și prezența infecției. Cel mai înalt nivel de expresie relativă a factorului *WHY1* a fost atestat în rădăcinile plantei gazdă în perioada de formare a lăstarilor aerieni ai patogenului (67 de zile), contrar rezultatelor referitoare la unii FT din familia *TGA* care, la aceeași fază de dezvoltare, au prezentat valori minime ale expresiei relative. A fost relevată subexpresia genelor *WHY1*, *TGA2* și *TGA5* în rădăcinile genotipurilor rezistente de floarea-soarelui, într-un număr mai mare de cazuri în condiții de stres. În contrast, genotipul sensibil s-a diferențiat prin efecte de supraexpresie genică în condiții de stres. Ponderea mai mare a interacțiunilor genice revine *celor de coexpresie* în cazul *WHY1* (93,68 %) și prezenței unor *domene proteice comune* în cazul factorilor din familia *TGA* (70 %). De asemenea, au fost identificate asocieri dintre gena *NPR1* cu *TGA2* (46 de conexiuni) și *TGA5* (33 de interacțiuni). Cele mai mari fluctuații ale nivelului de expresie relativă a genei *NPR1* (element-cheie în manifestarea rezistenței plantelor), se constată la genotipul sensibil Performer, în cazul plantelor neinfestate, iar în patosistem – la hibridul rezistent PR64LE20.

Cuvinte-cheie: factori de transcripție, patosistem, lupoaie, rețele de gene, expresie genică.

INTRODUCERE

De-a lungul evoluției, regnul vegetal a dezvoltat o varietate de sisteme și mecanisme generale și specifice de protecție la acțiunea stresului biotic și abiotic [1]. Reacția de recunoaștere și răspuns la stres se manifestă prin procese fiziologice și biochimice similare, indiferent de tipul rezistenței [2], însă mecanismul de declanșare este diferit [3]. Procesele defensive față de infecții implică numeroase molecule endogene de semnalizare [4], precum acidul salicilic (AS) [6; 7], acidul jasmonic (AJ) [8; 9], etilena (ET) [10; 11], oxidul de azot (NO), speciile reactive de oxigen (SRO) [12] ș.a. care induc activarea unui număr mare de gene codificatoare de proteine asociate cu patogeneza (*Pathogenesis-Related* – PR) în țesuturi, atât la nivel local, cât și sistemic [5].

Factorii de transcripție (FT) reglează expresia genelor cu rol în imunitatea declanșată de patogeni (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* – PAMP) [13], imunitatea declanșată de efectori (*Effector-Triggered Immunity* – ETI), căile de semnalizare hormonală [14] și de sinteză a fitoalexinelor etc. [15]. Plantele recunosc anumite modele moleculare ale agenților patogeni, declanșând răspunsuri imune de bază. FT modifică specific expresia genelor, contribuind astfel la inițierea și asigurarea reacției de răspuns la atacul patogenului [14].

Aproximativ 7 % din totalul de secvențe codificatoare ale genomului vegetal revin genelor pentru factori de transcripție [16]. Numărul FT, sau reglatorii transcripționali, variază între 1 000-3 000 și constituie 5-15 % din totalul proteinelor codificate [17]. În funcție de structura domenelor de legare a ADN-ului, FT sunt clasificați în familii și subfamilii, fiind cele mai studiate proteine. Până în prezent au fost identificate peste 50 de familii de FT [18]. La specia *Arabidopsis thaliana* au fost descriși circa 1 500 FT implicați în percepția semnalului și expresia genelor care răspund la stresul biotic [14; 19].

Deși există succese semnificative în cercetarea rezistenței plantelor la patogeni și a interacțiunilor în fitopatosisteme, pentru înțelegerea coevoluției gazdă-parazit și a rolului FT în răspunsul defensiv sunt necesare studii suplimentare. Investigațiile prezentate în lucrare s-au axat pe utilizarea instrumentelor bioinformatice și analiza expresiei genice pentru a elucida unele aspecte noi ale mecanismelor de rezistență în cadrul modelului experimental de interacțiune floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) – lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.).

MATERIALE ȘI METODE

Material vegetal. Au fost analizate trei genotipuri de floarea-soarelui, dintre care ***două rezistente*** – *Favorit,* care conține gena *Or6* ce conferă rezistență specifică față de rasa F și *PR64LE20* – rezistent la rasele G și H de lupoaie și ***un genotip sensibil*** (*Performer*), lipsit de gene de rezistență. Materialul vegetal a fost oferit de Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea, România [20]. Modelul de studiu a inclus genotipuri cultivate în vase de vegetație, infestate artificial cu lupoaie și în absența infecției (martor), conform metodologiei descrise anterior [21].

Prelevarea materialului. Probele de țesut radicular de floarea-soarelui, pentru izolarea ARN-ului total și obținerea ulterioară a eșantioanelor de ADNc au fost colectate în perioade care corespund celor patru etape de dezvoltare a patogenului: formarea primelor atașamente (18 zile), dezvoltarea tuberculilor (35 de zile), formarea lăstarilor subterani (53 de zile) și a lăstarilor aerieni (67 de zile) [21].

Analiza expresiei relative a genelor care codifică trei FT și un coreglator transcripțional a fost efectuată, în dinamică, prin PCR în timp real la amplificatorul DT-96 (*DNA technology*, Rusia) [22], utilizând componentele Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (*Thermo Fisher*). Designul primerilor specifici (tabelul 1) a fost realizat prin programele Primer3Web v. 3.0.0 (*https://primer3.ut.ee/*) și OligoAnalyzer 3.1.

Tabelul 1

Genele și secvența primerilor utilizați în studiu

Număr de acces (GenBank)	Denumirea genei	Primer sens	Primer antisens
GE491965.1	WHY1, Whirly 1	gcgttcaagctgacaaaagag	aggctgataatgcttccgatt
GE516848.1	TGA2, TGACG binding factors 2, AHBP-1b	tggtgatggtgaactgagga	tccacatgcctgagagaaca
GE512673.1	TGA5, TGACG binding factors 5, OBF5	ctcgggaatgtggaaaacac	tgctgctcggttaaaggttc
AY667500.1	NPR1, Non-expressor of pathogenesis-related 1	agacgaatccaaaatcacgtt	gattaacatccgcacggttt

În calitate de genă de referință s-a utilizat actina (NCBI: AF282624.1). Nivelul de expresie relativă a genelor a fost calculat prin metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ [20]. În figuri sunt prezentate valorile medii ale expresiei normalizate la nivelul de expresie al actinei ($2^{-\Delta CT}$) cu devierea standard și valorile raportului de expresie a plantelor infectate *versus* plante neinfectate (FC, Fold Change).

Analiza bioinformatică. Pentru caracterizarea factorilor de transcripție studiați a fost utilizat programul *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v 6.8 (*https://david.ncifcrf.gov/home.jsp*) [23]. Pentru generarea rețelei de interacțiune a factorilor de transcripție a fost utilizat instrumentul *open-source GeneMANIA* (*http://genemania.org/*) [24] și ortologii corespunzători din baza de date pentru planta model *Arabidopsis thaliana* (TAIR) [25].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute până în prezent au permis constatarea faptului că unii FT sunt implicați în transducerea semnalului acidului jasmonic [9] și al etilenei [11], precum și în transmiterea semnalului mediat de acidul salicilic [7; 26]. Cu toate acestea, o relație evidentă între tipul FT și căile de semnalizare în procesul de apărare la plante nu este încă stabilită.

Structura și funcțiile FT *WHY1, TGA2* și *TGA5*. Descrierea factorilor de transcripție analizați s-a realizat în baza categoriilor de informații *Gene Ontology - GO* (tabelul 2).

Factorii *WHY1* și *TGA5* sunt implicați în *răspunsul de apărare*, iar *TGA2* – în procesele de *rezistență sistemică dobândită* (RSD), precum și în reglarea *răspunsului hipersensibil.* Rezultatele recent publicate pentru *Arabidopsis* au demonstrat că familia TGA include 10 factori de transcripție. Dintre aceștia *TGA2*, *TGA5* și *TGA6* au un rol important în inducerea rezistenței sistemice dobândite [12], fiind responsabili de răspunsul dependent de AS împotriva *B. cinerea* [27]. La orez, *TGA2* are impact negativ asupra RSD prin modificarea redox reglată de AS ca răspuns la patogenul bacterian *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* [28].

O particularitate comună a FT din familia *TGA* este includerea acestora în *calea de semnalizare mediată de acidul salicilic* [14; 27; 28]. Factorii *TGA2* și *TGA5* prezintă o localizare nucleară, iar *TGA2* are o localizare dublă, atât în nucleu, cât și în citoplasmă (tabelul 2).

O localizare dublă, în nucleu și în componentele celulare, s-a constatat și pentru factorul de transcripție *WHY1*, care face parte din familia WHIRLY și care reprezintă proteine ce asigură numeroase funcții moleculare [29; 30], inclusiv repararea ADN-ului pentru menținerea stabilității organitelor celulare [32; 33]. *WHY1* este important în răspunsurile de apărare a plantelor [3], fiind implicat în calea de semnalizare a acidului salicilic și în asigurarea răspunsului florii-soarelui la atacul *P. halstedii* în calitate de reglator cheie al RSD [31].

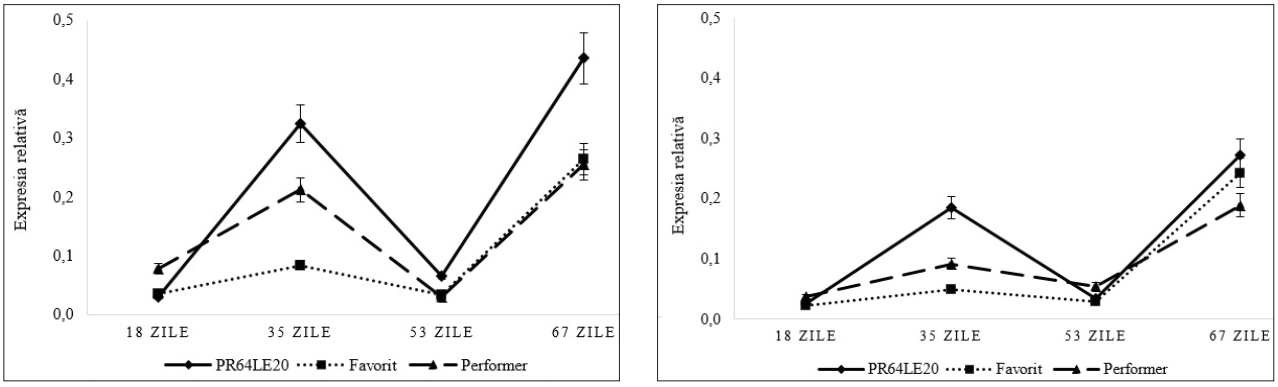
Expresia genelor care codifică FT *WHY1, TGA2* și *TGA5*. Analiza nivelului de expresie a FT la genotipurile sensibile și rezistente de floarea-soarelui în condiții de infestare artificială cu lupoaie, la patru etape de dezvoltare a patogenului, a pus în evidență un profil distinct al conținutului de transcripți.

Nivelul expresiei relative a FT *WHY1* prezintă valori cu o dinamică fluctuantă, atât la plantele martor, cât și la cele cultivate în condiții de infestare. Cele mai mari fluctuații în conținutul de transcripți ai genei *WHY1* se constată la genotipul rezistent PR64LE20. Astfel, în cazul probelor martor au fost constatate valori minime (0,03) ale expresiei relative

Tabelul 2

Adnotarea termenilor Gene Ontology

FT	Procesul biologic	Localizarea celulară	Funcția moleculară
WHY1	Răspunsul de apărare, reglarea transcripției, reparare ADN, reglare negativă a menținerii telomerilor	Plastide, cloroplaste, nucleoid, cromozom	Atașarea specifică la ADN, atașarea la ARNm, atașarea la ADN-ul monocatenar, atașarea la ADN-ul telomeric
TGA2	Răspuns hipersensibil, rezistență sistemică dobândită, reglarea transcripției, răspuns la stimulul xenobiotic, calea de semnalizare mediată de acidul salicilic	Citoplasmă, nucleu	Atașarea specifică la ADN, atașarea la proteine
TGA5	Răspuns de apărare, reglarea transcripției, răspuns la stimulul xenobiotic, calea de semnalizare mediată de AS	Nucleu	Atașarea specifică la ADN, atașarea la proteine



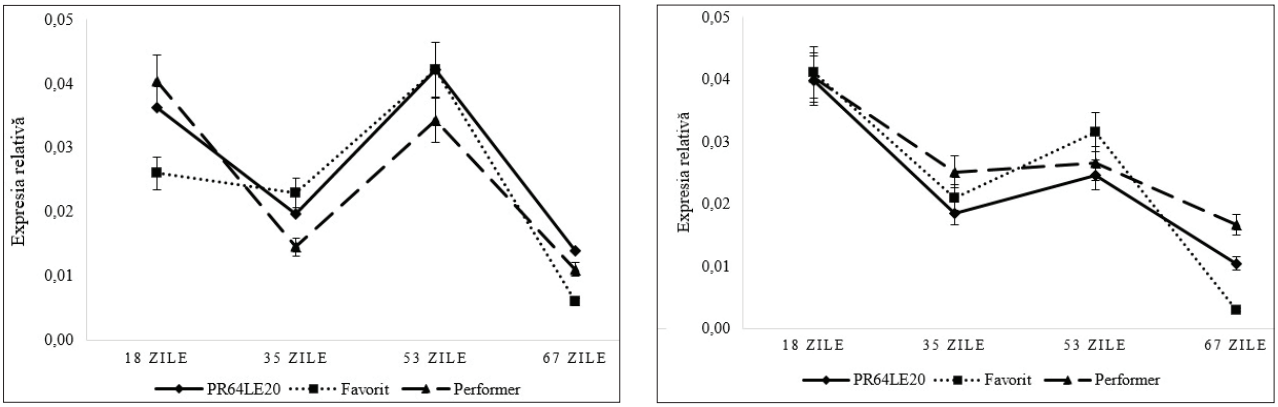
A B

Figura 1. Expresia relativă a genei *WHY1* la genotipurile cultivate în absența (A) și prezența infecției cu lupoaie (B).

la 53 zile și maxime (0,045) la 67 de zile (figura 1). În cazul plantelor infestate, valorile cele mai mici au fost identificate la 18 (0,021) și 67 de zile (0,271).

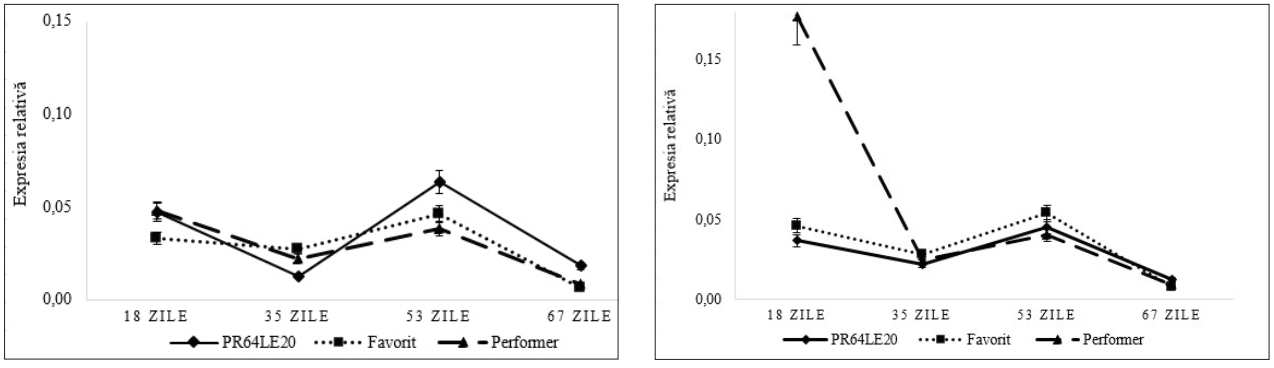
Tendințele de modificare a nivelului de expresie al acestui factor de transcripție în dinamică (18-67 de zile) sunt similare la toate genotipurile studiate, atât în normă, cât și în patosistem. La 18 și 53 de zile se atestă un conținut comparativ mic al transcripților, în timp ce datele înregistrate la 35 și 67 de zile reflectă sporirea activității transcripționale. De remarcat că, la toate variantele analizate, cele mai mari valori ale conținutului de transcripți *WHY1* au fost atestate la 67 de zile. Contrar, dinamica acumulării ARNm pentru ceilalți doi FT – *TGA2* și *TGA5* prezintă valori minime la 67 de zile de dezvoltare a genotipurilor de floarea-soarelui atât în condiții control, cât și în cele de infestare (figurile 2 și 3).

Datele respective, care demonstrează expresia diferențiată a trei FT, sugerează implicarea acestora în reglarea genelor cu funcții diferite în dezvoltarea rezistenței sistemice dobândite. Concluzia enunțată este evidentă, în special, la nivelul profilului de expresie TGA5, care prezintă diferențe semnificative ale valorilor cantitative de transcripți în funcție de gradul de rezistență a genotipurilor analizate și etapa de creștere și dezvoltare a plantelor (figura 3).



A B

Figura 2. Expresia relativă a genei *TGA2* la genotipurile cercetate cultivate în absența (A) și prezența infecției (B).



A B

Figura 3. Expresia relativă a genei *TGA5* la genotipurile cercetate cultivate în absența (A) și prezența infecției (B).

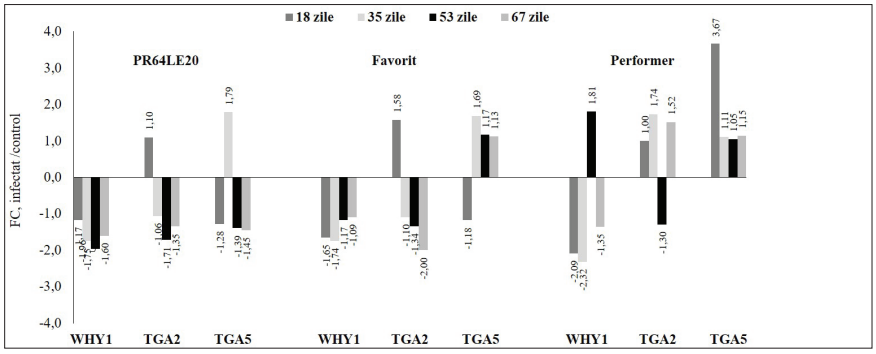


Figura 4. Expresia relativă a genelor (*fold change*) la genotipurile cercetate.

Conținutul ARNm-*TGA5* la genotipul sensibil Performer, în ambele variante (control și infecție) este considerabil mai mic comparativ cu cel identificat la genotipurile rezistente, în special, la 53 de zile – perioadă ce corespunde formării tuberculilor. Formarea acestor structuri ale patogenului demonstrează stabilirea interacțiunilor compatibile gazdă-patogen datorită proceselor specifice de semnalizare celulară. Se cunoaște că FT TGA sunt asociați cu semnalizarea mediată de AS, întrucât aceștia reglează transcripția genelor care codifică PR-1 în răspuns la semnalele AS [27].

Analiza raportului de modificare a expresiei genelor *(fold change)* accentuează particularitățile de modificare a concentrației de transcripți ai FT studiați în condiții de infestare cu lupoaie, în funcție de genotip și etapa de colectare a materialului (figura 4). Astfel, efectul de inhibare a expresiei genei *WHY1* a fost relevat la toate genotipurile de floarea-soarelui, la toate fazele de dezvoltare a patositemului, excepție constituind doar un caz de supraexpresie de 1,81 ori la genotipul sensibil Performer în etapa de 53 de zile.

O situație diferită se constată pentru FT *TGA2.* Deși în majoritatea variantelor analizate (58 %) se identifică inhibarea expresiei genei, totuși în prima fază de interacțiune a florii-soarelui cu lupoaia, conținutul transcripților rămâne nemodificat, așa cum se observă la PR64LE20 cu rezistență la rasele G și H, sau crește de 1,58 ori la al doilea genotip rezistent Favorit. Similar, un nivel de supraexpresie este relevat și în cazul genotipului sensibil Performer la 35 și 67 de zile de cultivare – de 1,74 ori și de 1,52 ori, respectiv.

În cazul FT *TGA5*, la ambele genotipuri rezistente se evidențiază supraexpresia genei (de 1,7-1,8 ori) doar la etapa de 35 de zile, în restul perioadei conținutul transcripților nu a variat esențial. Hibridul sensibil Performer răspunde la infecția cu lupoaie prin majorarea conținutului de transcripți *TGA5* de circa 4 ori, după primele 18 zile de cultivare, etapă urmată de stabilizarea nivelului de expresie în următoarele zile de analiză.

Pentru identificarea **interacțiunii funcționale ale FT cu alte gene** în răspunsul de apărare, au fost elaborate rețele ale factorilor de transcripție *WHY1* (figura 5A), *TGA2* (figura 5B) și *TGA5* (figura 5C). Din totalul de 4 212 de interacțiuni moleculare din rețeaua generată pentru factorul *WHY1*, majoritatea (93,7 %) sunt în bază de *coexpresie* (tabelul 3).

Genele care formează această rețea sunt asociate preponderent cu procese de metabolizare a ARNt, de organizare a plastidelor, reglare a transcripției, reglare a inițierii transcripției de la promotorul ARN polimerazei II etc.

În cazul factorilor din familia *TGA,* aproximativ 70 % dintre interacțiuni sunt generate în baza domenelor proteice comune. Genele conexe factorului *TGA2* sunt asociate cu diverse funcții, inclusiv: activitatea de dimerizare a proteinelor, răspunsul celular la proteine, lipide și carbohidrați, semnalizarea mediată de carbohidrați, răspunsul la acidul abscisic etc.

Tabelul 3

Descrierea interacțiunilor identificate pentru fiecare FT

Tipuri de interacțiuni	***WHY1***	***TGA2***	***TGA5***
Interacțiuni fizice	0,3 %	4,0 %	4,6 %
Predicții pe bază de ortologie	1,9 %	17,5 %	17,4 %
Coexpresie	93,7 %	7,7 %	7,9 %
Domene proteice comune	1,7 %	70,3 %	69,6 %
Colocalizare	2,4 %	0,5 %	0,4 %
Total interacțiuni	**4212**	**5952**	**6181**

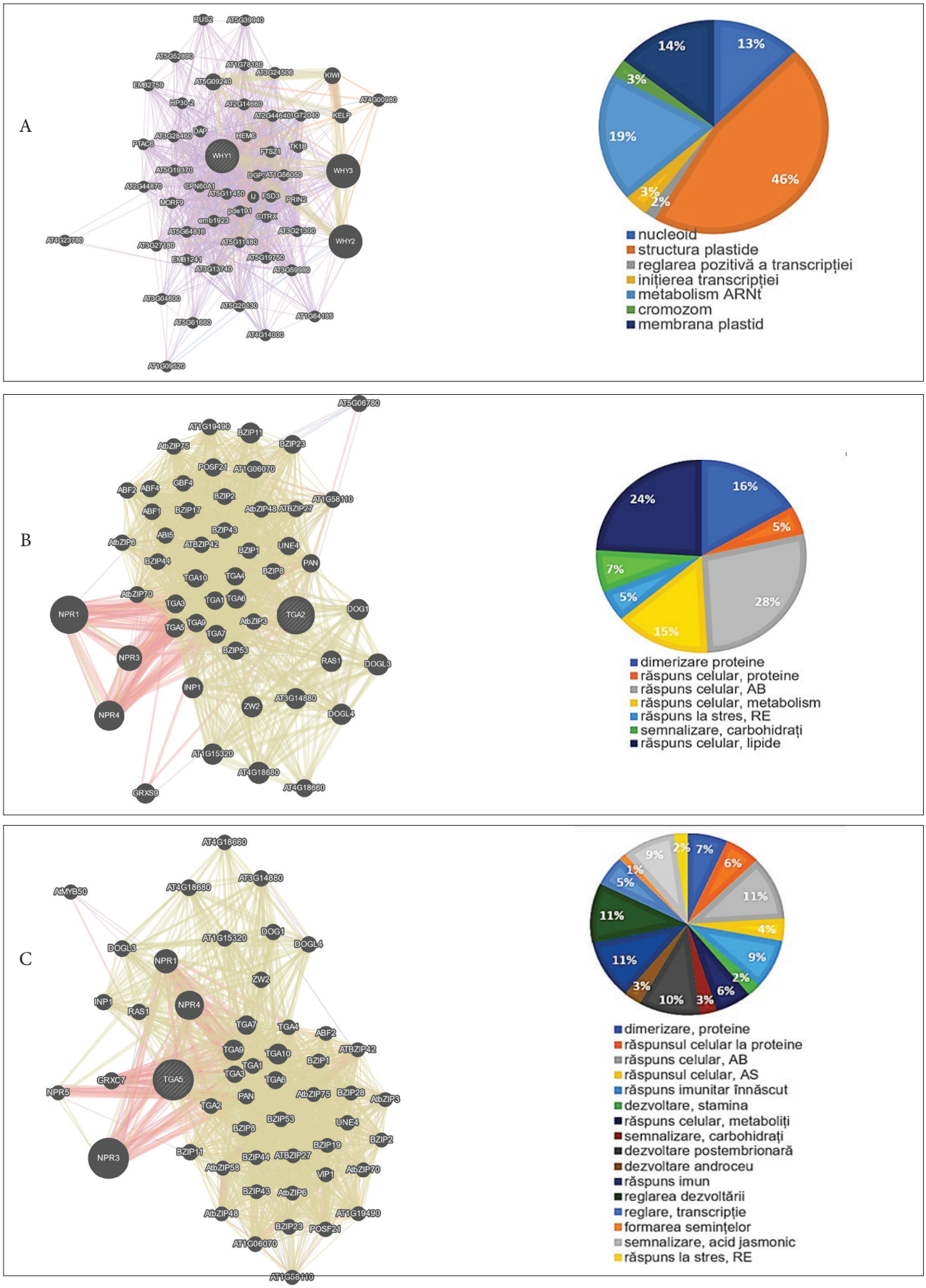


Figura 5. Rețelele de interacțiune a factorilor de transcripție *WHY1* (A), *TGA2* (B) și *TGA5* (C) și gruparea genelor adnotate.

Și în cazul factorului *TGA5* au fost stabilite conexiuni cu numeroase gene implicate în:

- reglarea metabolismului proteic (*reglarea transcripției prin ARN polimeraza II, răspunsul la proteine incorecte topologic, activitatea de dimerizare a proteinelor*);
- reglarea metabolismului carbohidraților (*semnalizarea mediată carbohidrați, răspunsul celular la carbohidrați, răspunsul celular la alcool*);
- reglarea dezvoltării organismului multicelular (*răspunsul la stresul reticulului endoplasmatic*, *reglarea dezvoltării postembrionare*, *dezvoltarea androceului și staminelor, reglarea dezvoltării și maturării semințelor*);
- reacția de răspuns la stresul biotic și abiotic (*răspunsul imun înnăscut, răspunsul celular la AS și implicarea în calea de semnalizare mediată de AJ*).

Este important de menționat că FT *TGA2 și TGA5* prezintă conexiuni cu gena *Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes 1* (NPR1) – un coreglator transcripțional cheie al expresiei genelor reglate prin semnalizarea mediată de AS [11; 33; 32] în mecanismul de dezvoltare a RSD la un spectru larg de patogeni [4; 9; 34].

Pentru membrii familiei *TGA* au fost identificate 46 de conexiuni ale genei *NPR1* cu alte gene în cazul factorului de transcripție *TGA2* (figura 5B) și 33 de interacțiuni în rețeaua pentru *TGA5* (figura 5C). În acest studiu nu au fost relevate conexiuni între *WHY1* și gena *NPR1*.

În contextul dat a fost analizată expresia relativă a genei care codifică *NPR1* (figura 6). Dinamica parametrului respectiv, pe parcursul creșterii și dezvoltării florii-soarelui, a indicat cele mai mari fluctuații la genotipul Performer, sensibil la lupoaie, în absența infecției (max.: 0,65 la 18 zile și min.: 0,09 la 67 de zile) și la genotipul PR64LE20, cu rezistență sporită la patogen (max.: 0,73 la 18 zile și min.: 0,12 la 67 zile) în condiții de cultivare în sol infestat cu lupoaie.

În cazul acestei gene se constată variații fluctuante similare celor relevate la FT analizați. Toate genotipurile studiate au prezentat valori maxime ale activității transcripționale *NPR1* la 18 zile de cultivare, care scad la faza de 35 de zile, atât la plantele martor, cât și la cele infestate. Ulterior, peste 53 de zile de cultivare, perioadă care corespunde etapei de formare a lăstarilor subterani, se atestă acumularea transcripților urmată de o scădere a conținutului la ultima fază analizată. Rezultatele obținute corelează cu cele raportate anterior de Șestacova ș.a. [35] care, analizând expresia genei *NPR1* la șapte linii de floarea-soarelui cu nivel distinct de rezistență la lupoaie, au constatat modificări minime (în special, subexpresie) în activitatea transcripțională a genei în fazele avansate ale infecției cu lupoaie.

Totodată, se observă că infecția cu lupoaie determină o reacție diferită a genotipurilor în ceea ce ține de nivelul expresiei genei NPR1. Hibridul rezistent Favorit se caracterizează prin diminuarea treptată a conținutului de transcripți, valorile cele mai mici (FC= -1,682) fiind înregistrate peste 67 de zile de la cultivare a plantelor. Al doilea hibrid rezistent PR64LE20 nu răspunde cu devieri majore, cu excepția unui efect de diminuare a expresiei *NPR1* (FC= -1,511) la etapa de 53 de zile, care scade în intensitate la faza ulterioară. Un contrast evident se observă în reacția hibridului sensibil *Performer* la atacul cu lupoaie, care se manifestă prin intensificarea expresiei (de circa 1,8 ori), tendință ce pare să se mențină, cel puțin, pe întreaga perioadă de 67 de zile.

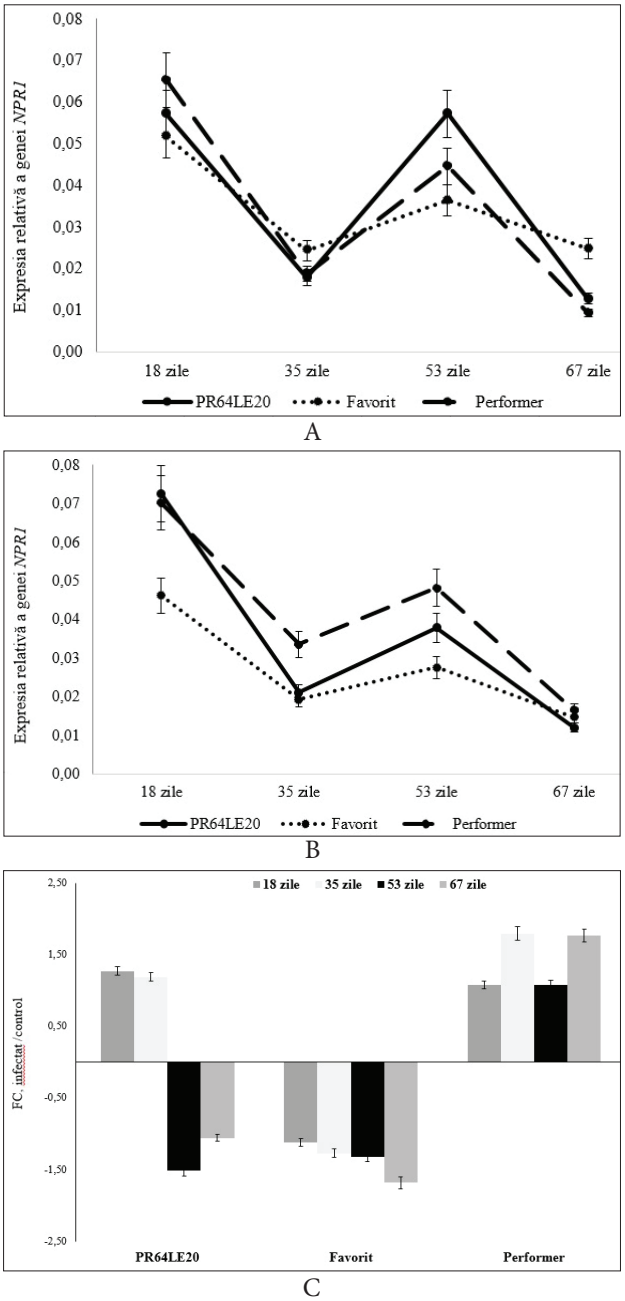


Figura 6. Expresia relativă a genei NPR1 la genotipurile cercetate cultivate în absența (A) și în prezența infecției (B) și valorile raportului de expresie a plantelor infestate *versus* plante neinfestate (C).

Diferențele evidențiate ar putea fi explicate prin tipul reacției defensive declanșate preferențial la un genotip sau altul. Astfel, pentru hibrizii Favorit și PR-64LE20, care conțin gene de rezistență majore (R), este caracteristică rezistența specifică rasei. În această situație, planta recunoaște agentul patogen și activează rapid răspunsul de apărare, de ex. un răspuns hipersensibil local (RH) care asigură stoparea răspândirii infecției prin inducerea morții celulare. În absența genelor specifice de rezistență agentul patogen este controlat printr-o serie de reacții nespecifice, precum și rezistența sistemică dobândită, care spre deosebire de RH este lentă și treptată [36; 37]. RSD e dependentă de acumularea AS și a proteinei *NPR1* care facilitează un răspuns sistemic. Mai mult, *NPR1* stimulează factorii de transcripție din familia *TGA* (*TGA2*, *TGA5*, *TGA6*) pentru a se lega la elementele promotoare ale genei PR și asigură expresia coordonată a unui set specific de gene codificatoare de proteine implicate în răspunsul defensiv [38].

Asocierea dintre *NPR1* și *TGA* a fost demonstrată inclusiv în cadrul prezentului studiu, constatându-se un grad înalt de convergență între datele de expresie a *TGA5* și *NPR1* la genotipul sensibil Performer, care răspunde la atacul patogenului prin creșterea nivelului de expresie relativă a acestor gene. Datele experimentale de expresie genică corelează și cu cele bioinformatice care au pus în evidență interacțiunea dintre acești doi factori cu funcții în reglarea proceselor de transcripție, precum și gradul mare de interacțiuni cu alte gene, în special la nivelul domenelor proteice comune.

CONCLUZII

Datele privind rezistența plantelor la patogeni și interacțiunile gazdă-parazit creează o bază fundamentală pentru înțelegerea mecanismelor patogenității și a căilor de semnalizare asociate cu rezistența.

Adnotarea și gruparea funcțională a FT a pus în evidență implicarea *TGA2* în *rezistență sistemică dobândită* și *răspunsul hipersensibil*, ceea ce demonstrează că acest FT este un element important în medierea expresiei genelor codificatoare de proteine asociate cu patogeneza și, respectiv, răspunsurile de apărare a plantelor față de agenții patogeni.

Analiza expresiei relative a factorilor de transcripție a permis relevarea caracterului oscilatoriu al modificării conținutului de transcripți în rădăcinile plantelor de floarea-soarelui infestate și neinfestate. Cel mai înalt nivel de expresie relativă a factorului *WHY1* a fost atestat în rădăcinile plantei gazdă în perioada de formare a lăstarilor aerieni ai patogenului (67 de zile), spre deosebire de unii FT din familia *TGA* care au prezentat valori minime ale expresiei relative la 67 de zile postinfecție.

În condiții de stres a fost relevată preponderent subexpresia genelor *WHY1*, *TGA2* și *TGA5* în rădăcinile genotipurilor rezistente de floarea-soarelui și supraexpresia activității transcripționale în rădăcinile genotipului sensibil.

În rețelele de gene ale FT, ponderea mai mare revine interacțiunilor de *coexpresie* în cazul *WHY1* (93,68 %) și ale celor determinate de *domene proteice comune* în cazul factorilor din familia *TGA* (70 %). De asemenea, au fost identificate asocieri dintre gena *NPR1* – un element-cheie în semnalizarea apărării plantelor cu *TGA2* (46 de conexiuni) și *TGA5* (33 de interacțiuni).

Reacția hibridului sensibil Performer la atacul cu lupoaie se manifestă prin intensificarea expresiei genei *NPR1* (de circa 1,8 ori), tendință ce pare să se mențină, cel puțin, pe întreaga perioadă de 67 de zile. Hibridul rezistent Favorit se caracterizează prin diminuarea treptată a conținutului de transcripți, valorile cele mai mici (FC= -1,682) fiind înregistrate peste 67 de zile de la cultivare. Al doilea hibrid rezistent, PR64LE20, nu prezintă devieri majore în profilul molecular, excepție constituind efectul de diminuare a expresiei NPR1 (FC=-1,511) la etapa de 53 de zile, care se atenuează la faza ulterioară.

BIBLIOGRAFIE

1. Abu Qamar S., et al. Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor, in: The Plant Journal, 2009, vol. 58, pp. 347-360.

2. Uwe C. Systemic Acquired Resistance, Plant Signaling & Behavior, 2006, vol. 1, nr. 4, pp. 179-184. doi: 10.4161/psb.1.4.3221

3. Despres C. et al. The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1, in: Plant Cell., 2003, nr. 15, pp. 2181-2191.

4. Gao Q.M., et al. Signal regulators of systemic acquired resistance, in: Frontiers in Plant Science, 2015, nr. 6, pp. 1-12, doi=10.3389/fpls.2015.0022

5. Audil G., et al. Biotic and abiotic stresses in plants, 2019, doi: 10.5772/intechopen.85832

6. Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. Salicylic acid-independent plant defence pathways, in: Trends in Plant Science. 1999, nr. 4, pp. 52-57, doi: 10.1016/S1360-1385(98)01364-8

7. Shah J. The salicylic acid loop in plant defense, in: Curr. Opin. Plant Biol., 2003, nr. 6, pp. 365-371, doi: 10.1016/S1369-5266(03)00058-X

8. Van Wees S.C.M., et al. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*, in: Proc Natl Acad Sci USA. 2000, nr. 97, pp. 8711-8716, doi: 10.1073/pnas.130425197

9. Thaler J.S., Owen B., Higgins V.J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles, in: Plant Physiology, 2004, nr. 135, pp. 530-538, doi: 10.1104/pp.104.041566

10. Von Dahl C.C., Baldwin I.T. Deciphering the role of ethylene in plant herbivore interactions, in: Journal of Plant Growth Regulation, 2007, nr. 26, pp. 201-209, doi: 10.1007/s00344-007-0014-4

11. Leon-Reyes A., et al. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling, in: Plant Physiology, 2009, nr. 149, pp. 1797-1809.

12. Durrant W.E., Dong X. Systemic acquired resistance, in: Annu Rev Phytopathol., 2004, nr. 42, pp.185-209, doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421

13. Meng X., Zhang S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling, in: Annu Rev Phytopathol, 2013, nr. 51, pp. 245-266.

14. Riechmann J.L., et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes, in: Science, 2000, nr. 290, pp. 2105-2110.

15. Kuhlmann M., et al. The alpha-helical D1 domain of the tobacco bZIP transcription factor BZI-1 interacts with the ankyrin-repeatprotein ANK1 and is important for BZI-1 function, both in auxin signaling and pathogen response, in: J. Biol. Chem., 2003, nr. 278, pp. 8786-8794.

16. Duvick J., et al. PlantGDB: a resource for comparative plant genomics, in: Nucleic Acids Res, 2008, nr. 36, pp. D959-965.

17. Jin J., et al. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors, in: Nucleic Acids Res, 2014, nr. 42, pp. D1182-1187.

18. Wray G.A., et al. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes, in: Mol Biol Evol, 2003, nr. 20, pp. 1377-1419.

19. Perez-Rodriguez P., et al. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database, in: Nucleic Acids Res 2010, nr. 38, pp. D822-827.

20. Pacureanu-Joita M., et al. Virulence and aggressiveness of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations in Romania, in: Helia, 2009, vol. 32(51), pp. 111-118.

21. Tabără O. Estimarea modificărilor fiziologice şi moleculare ale răspunsului defensiv în sistemul gazdă parazit (*Helianthus annuus* L. – *Orobanche cumana* Wallr.) autoref. tz. dr. în şt. biologice. Chişinău, 2020. 34 p.

22. Tabără O. Activitatea superoxid dismutazei la plantele de floarea-soarelui infestate artificial cu lupoaie, in: Buletinul AŞM. Ştiinţele Vieţii, 2019, nr. 1(337), pp. 106-111.

23. Dennis G., et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, in: Genome Biol, 2003, nr. 4, R60, pp. 1-11, doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-r60

24. Warde-Farley D., et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function, in: Nucleic acids research, 2010, vol. 38, W214-220. Web Server issue, pp. 1-7, doi:10.1093/nar/gkq537

25. The Arabidopsis Information Resource (TAIR), www.arabidopsis.org.

26. Nazar R., et. al. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress, in: South African Journal of Botany, 2015, vol. 98, pp. 84-94.

27. Zander M., et al. *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses, in: Plant J., 2010, nr. 61, pp. 200-210.

28. Chern M.S., et al. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*, in: Plant J., 2001, nr. 27, pp. 101-113.

29. Desveaux D. et al. A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*, in: Developmental Cell, 2004, vol. 6, nr. 2, pp. 229-240, doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00028-0

30. Maréchal A., et al. Whirly proteins maintain plastid genome stability in *Arabidopsis*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, vol. 106 nr. 34, pp. 14693-14698. doi: 10.1073/pnas.0901710106

31. Fernández-Ocaña A., et al. Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD, in: J. Plant Physiol., 2011, vol. 168, nr. 11, pp. 1303-1308.

32. Dong X., et al. Regulation of systemic acquired resistance by NPR1 and its partners, in: Novartis Found Symp., 2001, nr. 236, pp. 165-173, doi: 10.1002/9780470515778.ch12

33. Yoo H.H., et al. Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in *Arabidopsis*, in: Plant J., 2007 vol. 49, nr. 3, pp. 442-451, doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02974

34. Pieterse C.M., Van Loon L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways, in: Curr Opin Plant Biol., 2004, vol. 7, nr. 4, pp. 456-464, doi: 10.1016/j.pbi.2004.05.006

35. 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, vol. 30, nr. 4, pp. 685-691.

36. Balconi C., Stevanato P., Motto M., Biancardi E. *Breeding for Biotic Stress Resistance / Tolerance in Plants*, in: Crop production for agricultural improvement. Publisher: Springer, 2012, pp. 57-114.

37. Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, in: Annu. Rev. Phytopathol., 2006, vol. 44, pp. 135-162.

38. Carr J.P., et al. Signaling in Induced Resistance, in: Advances in Virus Research. Editors John P. Carr, Gad Loebenstein, Academic Press, 2010, vol. 76, pp. 57-121.

NOTĂ. Cercetările prezentate în lucrare au fost realizate în cadrul proiectului 20.80009.5107.01 *Studii genetico-moleculare şi biotehnologice ale florii-soarelui în contextul asigurării managementului durabil al ecosistemelor agricole.*