

Concluzii

Prin identificare macro- și microscopică a 488 de tulpini de funghi, izolate din fragmente ale părții bazale a tulpinii de grâu, cu simptome de boală, s-a constatat implicarea a 13..15 specii de funghi imperfecti în dezvoltarea putregaiului de rădăcină, rata fungilor *Fusarium* constituind 63,4 și 31,9%, respectiv, pentru a.2005-2006. Dintre speciile *Fusarium* cel mai reprezentativ a fost *F. oxysporum* var. *orthoceras* (15,9...32,3%).

Identificarea a 458 de tulpini de funghi, izolate din cariopse de grâu ce prezentau semne de șistăvire, înroșire, albire sau embrion negru a pus în evidență faptul că în afecțiuni au fost implicate 9...12 specii de funghi imperfecti, cele mai reprezentative specii în a.2005 fiind *Fusarium spp.* (34,2%) și *Cladosporium herbarum* (34,3%), iar în a.2006 – *Alternaria alternata* (41,0%), *Fusarium spp.* (28,0%) și *C. herbarum* (22,2%).

Condițiile umede crează posibilități pentru implicarea unui cerc mai larg de patogeni, în special a celor cu saprofitism pronunțat, în dezvoltarea bolilor de rădăcină și ale cariopselor (*A. alternata*, *Geotrichum candidum*, *Cylindrocarpon candidum*).

Bibliografie

1. Draper M.A., Stymiest C., Jin Y. Common Root and Crown Rot Diseases of Wheat in South Dakota. Plant Science, 2000, P.23-27
2. Ellis M.B. Dematiaceous hyphomycetes, England: The Eastern Press, 1971, 608 p.
3. Gonzales M.S., Trevathan L.E. Identity and Pathogenicity of Fungi Associated with Root and Crown Rot of Soft Red Winter Wheat Grown on the Upper Coastal Plain land Resource Area of Mississippi. Journal of Phytopathology, 2000, 148 (2), 77-85
4. Lupașcu G., Mereniuc Gh., Boincean B., Bugaciuc M. Particularități de interacțiune fond agrotehnic x grâu de toamnă x funghi – agenți ai putregaiului de rădăcină. Buletinul AȘM. Științele Vieții, 2007, 2 (302), 144-149
5. Билай В.И. Фузарии, Киев: Наукова думка. 1977, 422 с.
6. Жалиева Л.Д. Факторы формирующие комплекс возбудителей гнилей озимой пшеницы. Защита и карантин растений, 2005, 1, 26-27
7. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов, Л. Наука, 1967, 304 с
8. Пидопличко Н.М. Грибы – паразиты культурных растений. Том 1. Грибы совершенные, Киев: Наукова думка, 1977, 296 с.
9. Пидопличко Н.М. Грибы – паразиты культурных растений. Том 2. Грибы несовершенные, Киев: Наукова думка, 1977, 300 с.
10. Пидопличко Н.М. Грибы – паразиты культурных культурных растений. Том 3. Пикнидиальные грибы, Киев: Наукова думка, 1978, 230 с.

Articolul este prezentat de academicianul A. Jacotă

SUBFUNCTIONALIZAREA FACTORILOR TRANSCRIȚIONALI ÎN PROCESUL EVOLUȚIEI LA VERTEBRATE

Munteanu V., Levițchi A., Duca M.

Laboratorul Securitate Biologică, Universitatea de Stat din Moldova

Procesul de transcripție este unul crucial în expresia genelor, fiind reglat de proteine înalt specializate, secvențe specifice ale activatorilor sau supresorilor și de complexul proteic care asigură accesibilitatea la cromatină. Factorii proteici implicați în reglajul

transcripțional sunt foarte variați și au apărut în rezultatul evoluției moleculare a acestora prin duplicarea genelor și specializarea lor ulterioare. Evoluția genomului vertebratelor s-a realizat prin duplicarea completă, în urma poliploidizării, și a contribuit la creșterea cantitativă a genelor și a regiunilor paraloce [1]. Acest fenomen reprezintă un mecanism genetic semnificativ în formarea și evoluția familiilor de gene. Duplicările genomului au produs o sporire cantitativă și o diversificare a factorilor transcripționali prin mărirea numărului de gene și de proteine implicate în procesul de transcripție [2].

Posibil genomul actual al vertebratelor a conservat traseul acestor fenomene sub forma unei rețele de regiuni paraloce, în cadrul cărora toate perechile de gene duplicate au parcurs acest fenomen simultan. Regiunile duplicate deseori pot să suporte constrângeri funcționale, datorită efectului de canalizare a funcției ancestrale [1] sau se supun unor modificări mai largi, conducând potențial la o apariție de noi gene sau familii de gene [3].

În acest context s-a propus de a cerceta modul evoluției și structura unui grup de gene (*tbp*, *tbpl1*, *tbpl2*, *tlf-1*), ce codifică pentru factorii transcripționali de bază (*TATA box binding protein*, *TATA box binding protein like 1*, *TATA box binding protein like 2*, *TATA like factor 1*) la organisme filogenetic îndepărtate *Danio rerio* și *Chaenorhabditis elegans* cu următoarea poziție taxonomică (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, The NCBI Entrez Taxonomy):

<i>Chaenorhabditis elegans</i>	<i>Danio rerio</i>
Eukaryota	Eukaryota
Metazoa	Metazoa
Nematoda	Chordata
Chromadorea	Craniata
Rhabditida	Vertebrata
Rhabditoidea	Euteleostomi
Rhabditidae	Actinopterygii
Peloderinae	Neopterygii
Chaenorhabditis	Teleostei
	Ostariophysi
	Cypriniformes
	Cyprinidae
	Danio

Genele *tbp* și *tbpl2* a peștelui *D. rerio* codifică pentru proteinele **TATA box binding protein (TBP)** și **TATA box binding protein like 2 (TBP-like 2)** fiind componente a factorilor transcripționali de bază **TFIID** și **TFIIB** și sunt implicate în recunoașterea promotorilor și inițierea transcripției (fig. 1). Proteinele **TBP** și **TBP-like 2** leagă ADN-ul, inițiază transcripția de pe promotorii de tip ARN polimerază II și reglează sinteza ARN-ului, iar proteina **TBP-like 1**, codificată de gena *tbpl1*, este specializată în legarea la ADN-ului, inițierea și menținerea activității ARN polimerazei II [4].

Gena *tbp* de la *C. elegans* este ortoloagă genei *tbp* a peștelui cu produsul **TBP** și este implicată în inițierea și reglarea transcripției (fig. 1). Fiind componenta complexului **TFIID** ea se leagă specific la boxa **TATA** și interacționează în complex cu factori de bază în inițierea transcripției – **TFIIA** și **TFIIB**. Gena *tlf-1* (*C. elegans*) codifică pentru un factor multifuncțional **TATA like factor 1 (TLF)**.

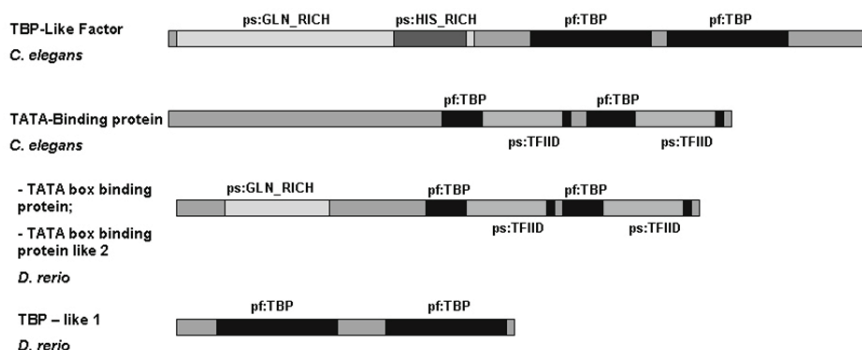


Fig. 1. Motivele proteinelor studiate pf:TBP – motivele proteinei de legare la boxa TATA; ps:TFIID – profilul regiunii repetitive a factorului de transcripție TFIID; ps: GLN_RICH – profilul regiunii bogate în glutamină; ps:HIS_RICH – profilul regiunii bogate în histidină.

Materiale și metode

În studiu s-au analizat cinci gene – *tbp*, *tbpl1*, *tbpl2* la peștele *D. rerio* și *tbp*, *tlf-1* la nematoda *C. elegans* și produsele lor *TBP*, *TBP-like1*, *TBP-like2* și, corespunzător, *TBP* și *TLF*.

S-au explorat bazele de date:

NCBI – National Center for Biotechnology Information;

ExPASy – Expert Protein Analysis System (SWISS-PROT).

Secvențele au fost extrase din NCBI: Gen Bank accession no. AAH55549 pentru TBP, Gen Bank accession no. AAI16554 pentru TBP-like 2, Gen Bank accession no. AAH85661 pentru TBP-like 1 la peștele *D. rerio* și Gen Bank accession no. AAA03582 pentru TBP și Gen Bank accession no. CAB41469 pentru TLFs la nematoda *C. elegans*.

Prelucrarea datelor s-a realizat cu ansamblul de metode și programe bioinformatică – **ClustalW** [5], **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) [6], **Dot-plot** [7], **ProScan** [8], **PhyloDraw** [9], cu utilizarea algoritmului *Neighbor-joining* [9, 10] – destinate analizei și vizualizării diverselor entități implicate în procesul expresiei, transmiterii și evoluției informației genetice, inclusiv modelarea (sistemele dinamice) și analiza (algoritmă și statistică) a mecanismelor evoluției filogenetice.

Rezultate și discuții

Detectarea și clasificarea genelor supuse unor selecții pozitive sau negative în procesul evoluției, precum și identificarea condițiilor, ce influențează asupra acestora s-a realizat prin analiza simultană a:

- secvențelor nucleotidice și
- secvențelor aminoacidice (AA),

care permit relevarea istoriei evoluției genomului și o mai bună înțelegere a organizării genomului actual.

Compararea secvențelor aminoacidice ale proteinei TBP cu secvențele nucleotidice ale tuturor genelor, disponibile în baza de date NCBI pentru peștele *D. rerio* și nematoda *C. elegans* s-a efectuat prin analiza **BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)

Blast.cgi). Rezultatele obținute în cadrul acestor cercetări au permis să constatăm, că proteina TBP (Gen Bank accession no. AAH55549, 302 AA) relevă cele mai semnificative similarități cu TATA box binding protein like 2 (Gen Bank accession no. AAI16554, 312 AA, 77% de identitate) și TATA box binding protein like 1 (Gen Bank accession no. AAH85661, 186 AA, 42% de identitate) la peștele *D. rerio* și TATA binding protein (Gen Bank accession no. AAA03582, 340 AA, 80% de identitate) și TATA like factor (Gen Bank accession no. CAB41469, 454 AA, 31% de identitate) cu factorii transcripționali ai nematodei *C. elegans*.

Este cunoscut că toate eucariotele posedă o regiune înalt conservativă de aproximativ 180 AA în C-terminal [11], care este necesară și suficientă pentru legare la boxa TATA. Cercetarea omologiei secvențelor AA cu ajutorul **programului ProScan** (www.expasy.ch) a permis să identificăm domenii similare ipotetice la cele trei proteine analizate (fig. 1, 2), fiind evidențiate două domenii conservative și repetitive de aproximativ 50 AA, care formează o simetrie intramoleculară, ce generează o structură **saddle-shaped** cu leagare înalt specifică la ADN [12], care și determină funcția specifică a proteinelor TBP și TBP-like 2 la *D. rerio* și TBP la *C. elegans*.



Fig. 2. Domeniile funcționale la proteinele TBP și TBP-like 2 la *Danio rerio* și TBP la *Chaenorhabdits elegans*.

Pentru o analiză mai profundă a similarității proteinelor s-a apelat la metoda grafică de comparare a secvențelor, realizată prin matricile **Dot-plot** [7]. **Dot-plot**-urile au relevat similarități semnificative pentru proteinele TBP (*D. rerio*) – TBP (*C. elegans*) (fig. 3, A) și TBP (*D. rerio*) – TBP-like 2 (*D. rerio*) (fig. 3, B). Analiza dată susține rezultatele obținute cu ajutorul **programului ProScan** și similar demonstrează că regiunea C-terminală ale acestor proteine este înalt conservativă, iar regiunea dublicată este implicată în generarea structurii simetrice **saddle-shaped** [12]. S-a relevat o similaritate semnificativă între proteinele nematodei *C. elegans* TBP și TLF cu două domenii repetitive implicate în recunoașterea și atașarea la boxa TATA (fig. 3).

Totodată, această analiză a evidențiat doar câte o scurtă regiune conservativă implicată în recunoașterea boxei TATA în cazul proteinelor TBP (*D. rerio*) – TBP like 1 (*D. rerio*) (fig. 3, C) și TBP (*C. elegans*) – TBP like 1 (*D. rerio*) (fig. 3, D) și lipsa similarității între proteinele TBP like 1 (*D. rerio*) – TLF (*C. elegans*) (fig. 3, E).

Aplicarea analizelor pe secvențele de aminoacizi în **BLAST**, **ClustalW** a dat un șir de rezultate care, fiind transferate în **programul PhyloDraw**, a permis generarea unei dendrograme care relevă gradul de similaritate și posibilul scenariu evolutiv pentru proteinele date (fig. 4).

Deosebiri ale structurii primare a proteinelor de interes au determinat diferențierea lor în două grupări: din prima fac parte proteinele TBP și TBPL2 a *D. rerio*, iar în cea de-a doua – proteina TBPL1 a *D. rerio* și proteinele TBP și TLF a *C. elegans*. Arborele filogenetic obținut a demonstrat că TBP-like 1 a *D. rerio* este mai apropiată proteinelor *C. elegans*. Astfel, observațiile date atestă viteza de evoluție diferită și presingul diferențiat al selecției naturale asupra structurii și funcțiilor proteinelor analizate.

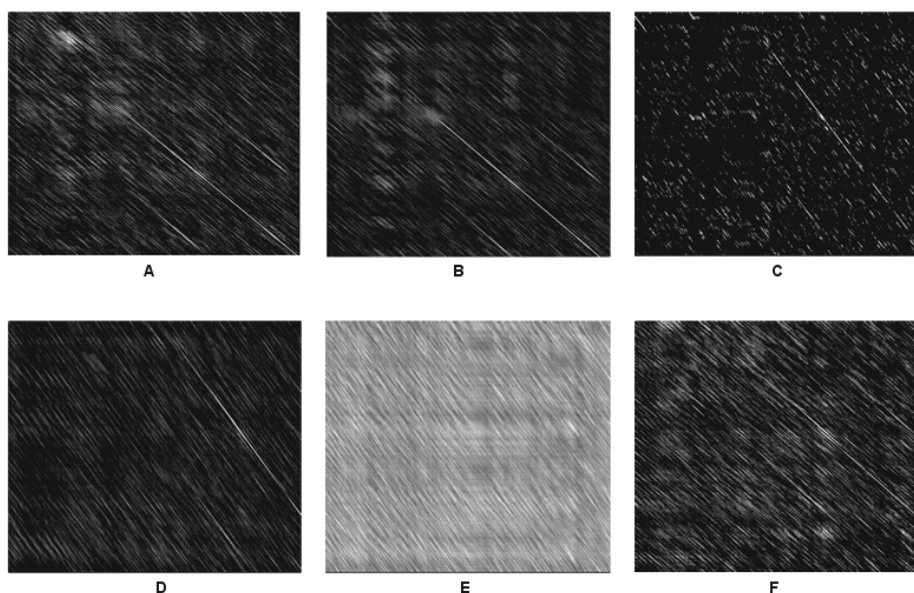


Fig. 3. Dot-plot-urile secvențelor aminoacidice ale proteinelor.

(A) TBP (*D. rerio*)-TBP (*C. elegans*), (B) TBP (*D. rerio*)-TBP-like2 (*D. rerio*), (C) TBP (*D. rerio*)-TBP-like1 (*D. rerio*), (D) TBP (*C. elegans*)-TBP-like1 (*D. rerio*), (E) TBP-like1 (*D. rerio*)-TLF (*C. elegans*), (F) TBP (*C. elegans*)-TLF (*C. elegans*).

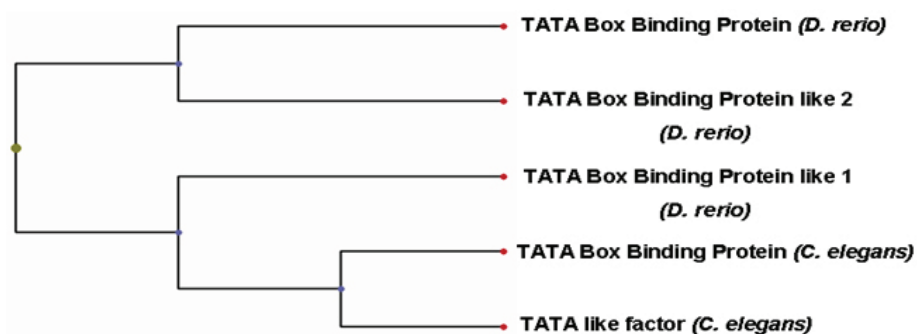
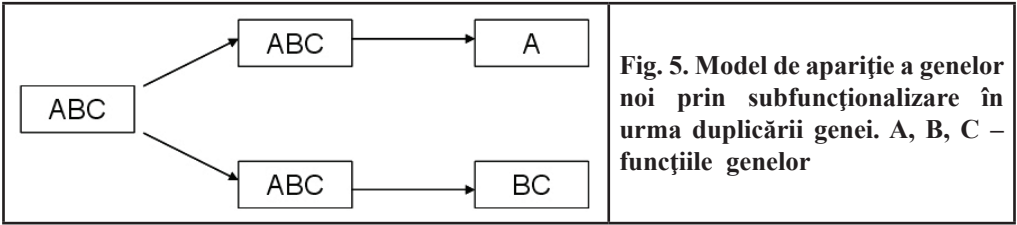


Fig. 4. Arborele filogenetic pentru factorii transcripționali

Probabil, formele actuale ale genelor *tbp* și *tbpl2* la *D. rerio* au apărut prin subfuncționalizarea presată de selecția stabilizatoare pentru gena *tbp* și selecția pozitivă pentru gena *tbpl2*, ceea ce a dus la o specializare mai „îngustă” a funcțiilor proteinelor acestor gene în procesul de transcripție. Această ipoteză este confirmată de unele studii recente care susțin evidența subfuncționalizării [13, 14, 15] genelor duplicate la pești, altele – sugerează apariția funcțiilor noi [16] (fig.5), precum și de funcțiile proteinelor codificate de genele omologe la diverse organisme situate la nivele diferite al evoluției (tab. 1).

Analizând funcțiile proteinelor TBP și TLF la nevertebrate (*C. elegans*), cu genomul până la duplicare, constatăm că ele sunt implicate în numeroase procese biologice complexe pe când proteinele TBP, TBP-like 1 și TBP-like 2 la vertebrate posedă funcții mai specializate [4, 17, 18].

Aceste specializări funcționale a factorilor transcripționali au influențat calitativ și cantitativ procesul de transcripție prin viteza transcripției, specificitatea transcripției (activarea promotorilor specifici), calitatea transcripției (numărul de erori mai mic în procesul transcripției) ș.a.



Tabelul 1. Funcțiile factorilor transcripționali anterior și după duplicarea genomului [4, 17, 18].

Funcțiile factorilor transcripționali la nevertebrate (<i>C. elegans</i>)	Funcțiile factorilor transcripționali la vertebrate (<i>D. rerio</i>)	
TBP	TBP	Celelalte funcții sunt preluate de alți factori transcripționali rezultați în urma duplicării genice sau genomiale
• dezvoltarea embrionară și larvară; • creștere; • reglarea pozitivă a ratei de creștere; • Inițierea și reglarea transcripției.	• inițierea și reglarea transcripției.	
TLF	TBP-like 1	
• morfogeneza capului; • dezvoltarea embrionară și larvară; • gastrulare; • reglarea pozitivă și negativă a transcripției; • fosforilarea proteinelor.	• recunoașterea și atașarea la ADN; • inițierea și reglarea transcripției.	

Posibil, pe parcursul evoluției nevertebratelor, gena *tbpl1* a peștelui *D. rerio* a apărut printr-o duplicare genică sau genomică. Prin căutare de similaritate în BLAST, gena respectivă a fost identificată la toate vertebratele actuale precum și la numeroase nevertebrate. Analiza Blast cu totalitatea proteinelor nematodei *C. elegans* a arătat maximum de similaritate cu proteina TBP (37%) și TLF (34%).

O trasătură generală observată la proteinele analizate (TBP, TBP-like1 și TBP-like2 la *D. rerio* și proteina TPB și TLF la *C. elegans*) este conservativitatea secvențelor în regiunea implicată în recunoașterea și atașarea la boxa TATA aflată la capătul C-terminal (fig.1, 3). Regiunea N-terminală este foarte variată la toate secvențele, fiind probabil implicată în interacțiunile cu alți factori transcripționali sau ARN polimeraza II. Aceasta ar indica la faptul că anume regiunea N-terminală este responsabilă de subfuncționalizarea proteinelor în timpul evoluției după duplicarea genelor.

Concluzii

Generalizarea rezultatelor evidențiază originea genei *tbpl1* în urma duplicării genomului în perioada timpurie a evoluției nevertebratelor. Totodată, aceste rezultate demonstrează că genele *tbp* și *tbpl2* provin dintr-o genă ancestrală comună în urma dublării informației genetice la peștii teleosteeni. Sub acțiunea selecției stabilizatoare

pentru gena *tbp* și selecției pozitive pentru gena *tbp12* s-a realizat specializare mai „îngustă” a funcțiilor proteinelor respective în procesul de transcripție. Astfel, rezultatele analizelor efectuate susțin ipoteza procesului de subfuncționalizare în urma duplicării factorilor transcripționali în evoluție.

Bibliografia

1. Mazet, F., Shimeld, S.M. Gene duplication and divergence in the early evolution of vertebrates. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2002, vol. 12, nr. 4, p. 393-396.
2. Zhang, J. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, vol. 18, nr. 6, p. 292-298.
3. Holland, P.W.H., Garcia-Fernandez, J., Williams, N.A., Sidow, A. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Development, Suppl.*, 1994, p. 125-133.
4. Jallow, Z., Jacobi, U.G., Weeks, D.L., Dawid, I.B., Veenstra, G.J. The TATA-binding protein regulates maternal mRNA degradation and differential zygotic transcription in zebrafish. *EMBO J*, 2007, vol. 26, nr. 17, p. 3945-3956.
5. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, nr. 22, p. 4673-80.
6. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, vol. 215, nr. 3, p. 403-410.
7. Junier, T., Pagni, M. Dotlet: diagonal plots in a web browser. *Bioinformatics*, 2000, vol. 16, nr. 2, p. 178-179.
8. Prestidge, D.S. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 1995, vol. 249, p. 923-932.
9. Choi, J.-H., Jung, H.-Y., Kim, H.-S., Cho, H.G. PyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics Application Note*, 2000, vol. 16, nr. 11, p. 1056-1058.
10. Duret, L., Abdeddaim, S. Multiple alignment for structural functional or phylogenetic analyses of homologous sequences. In: Higgins, D. and Taylor W. *Bioinformatics sequence structure and databanks*. 2000, Oxford, Oxford University Press.
11. Nikolov, D.B., Hu, S.-H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua N.-H., Roeder, R.G., Burley, S.K.. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature*, 1992, nr. 360, p. 40-46.
12. Kim, J.L., Burley, S.K. 1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG. *Nat. Struct. Biol.*, 1994, vol. 1, nr. 9, p. 638-653.
13. Bruce, A.E., Oates, Prince, V.E., Ho, R.K. Additional hox cluster in the zebrafish: divergent expression patterns belie equivalent activities of duplicate hox85 genes. *Evolution Development*, 2001, nr. 3, p. 127-144.
14. De Martino, S., Yan, Y.-L., Jowett, T., Postlethwaite, J.H., Varga, Z.M., Ashworth, A., Austin, C.A. Expression of *sox11* gene duplicates in zebrafish suggests the reciprocal loss of ancestral gene expression patterns in development. *Development Dynamics*, 2000, vol. 217, p. 279-292.
15. McClintock, J.M., Carlson, R., Mann, D.M., Prince, V. Consequences of Hox gene duplication in vertebrates: an investigation of zebrafish Hox paralogue group 1 genes. *Development*, 2001, vol. 128, p. 2471-2484.
16. Mazet, F., Shimeld, S. M. Gene duplication and divergence in the early evolution of vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 2002, 12:393-396.
17. Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 2000, vol. 408, nr. 6810, p. 325-330.
18. Mulder, N.J. et al. The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Res.*, 2003, vol. 31, nr. 1, p. 315-318.