

**INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 633.85:575(043.2)

NECHIFOR VICTORIA

**ACȚIUNEA GIBERELINEI ASUPRA
MICROSPOROGENEZEI LA FLOAREA-SOARELUI
(*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

162.01 GENETICĂ VEGETALĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2018

Teza a fost elaborată în cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor și laboratorul Genomică, Centrul Genetică Funcțională, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”

Conducător științific

DUCA Maria, academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

Referenți oficiali

PALII Andrei, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, membru corespondent

SALTANOVICI Tatiana, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Componența Consiliului științific specializat

MICU Vasile, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, *președinte*

COTENCO Eugenia, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, *secretar științific*

GRATI Vasile, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

LUPAȘCU Galina, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

ANDRONIC Larisa, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Susținerea tezei va avea loc la **8 august** 2018, ora **14⁰⁰** în ședința Consiliului științific specializat D 10 162.01 - 06 din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, MD 2002, str. Pădurii 20, or. Chișinău, Republica Moldova, tel.: +37322770447, fax: +37322556180, e-mail: institut.gtp@gmail.com

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică (Institut) „Andrei Lupan” (str. Academiei 5a, MD 2028, or. Chișinău) și pe pagina web a ANACEC (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat la ____ 2018.

Secretar științific al Consiliului științific specializat,

COTENCO Eugenia, dr. șt. biol., conf. cerc.

Conducător științific,

DUCA Maria, acad., dr. hab. șt. biol., prof. univ.

Autor

NECHIFOR Victoria

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei

Creșterea și dezvoltarea plantelor este determinată de factorii endogeni, un rol prioritar revenind reglării genetice și fitohormonale. Acțiunea acestor sisteme se manifestă în complex sau separat, provocând restructurări morfogenetice temporale și spațiale. Giberelinele (inclusiv AG₃) reprezintă unii dintre hormonii esențiali ai plantelor din clasa diterpeno-tetraciclice, care modulează dezvoltarea pe parcursul ciclului vital, determinând masculinizarea florilor și plantelor [16]. La alge, ciuperci și plantele superioare s-au stabilit anumite relații între conținutul acestui hormon și sterilitate precum și rolul esențial în reglarea androsterilității [17]. Astfel, tratarea exogenă cu gibereline restaurează androfertilitatea la plantele sterile [20] și anume aceste substanțe induc sterilitatea masculină (SM) la plantele fertile [36], dereglând derularea normală a programului genetic al microsporogenezei. În aspect practic inducerea androsterilității (ASI) se utilizează pentru determinarea capacității combinate generale și capacității combinate specifice a liniilor de floarea-soarelui, iar în aspect teoretic – pentru identificarea unor particularități fundamentale ale microsporogenezei.

Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemei

Întrucât mecanismele moleculare ale androsterilității citoplasmice (ASC) reprezintă rezultatul interacțiunii genice (nucleu), citoplasmice (mitocondrii) și fitohormonale, iar aplicarea AG₃ contribuie la inducerea sterilității masculine [36] ne-am propus să efectuăm o serie de cercetări citologice și genetico-moleculare asupra plantelor tratate exogen cu gibereline la toate fazele de dezvoltare a microsporilor la nivel structural, citogenetic și genetico-molecular.

La plantele superioare fitohormonii endogeni sunt implicați în evocație, sporogeneză și în manifestarea sexului [16] - atât la nivelul expresiei genelor, cât și la nivel de organism [37].

Acțiunea stimulatorie a giberelinei depinde de țesut și se manifestă după 2 ore din momentul tratării cu o durată de 7 zile, reflectându-se asupra creșterii și dezvoltării, unul dintre mecanismele de acțiune fiind metilarea ADN-ului prin intermediul ADN metilazei [11]. Locul de recepție al semnalelor acidului giberelic se consideră partea externă a plasmalemei. Tratarea cu gibereline provoacă creșterea mobilității electroforetice a cromatinei. Acidul giberelic stimulează transcripția acționând asupra ARN polimerazei II în nucleele izolate [6].

În plan mondial cercetările de până acum au clarificat o bună parte din problemele esențiale ale androsterilității citoplasmice la floarea-soarelui. În același timp, nu au fost determinate aspectele structurale și citogenetice comparative ale microsporogenezei la *Helianthus annuus* L. cu sterilitate masculină indusă de către giberelină și cea citoplasmică. De asemenea, informațiile științifice cunoscute, deocamdată nu au elucidat mecanismul de expresie a genelor implicate în acest fenomen.

La nivel național procesul de microsporogeneză este foarte puțin studiat, cercetări fiind realizate doar la porumb [4], tomate [2, 5] și triticales [40].

Cercetările respective pot rezolva pe viitor noi probleme concrete legate de studiul organizării moleculare a genelor, ce se exprimă diferențiat în procesul de reglare a microsporogenezei. Mai mult ca atât, sistemul de reproducere reprezintă o sursă bogată de transcripți specifici, care pot fi utilizați în calitate de markeri moleculari necesari pentru analiza moleculară a genomului diferitor plante de cultură, accelerând considerabil procesul de ameliorare.

Scopul prezentei lucrări constă în stabilirea rolului giberelinei (AG_3) în inițierea și reglarea diviziunii celulare în anterele de floarea-soarelui.

Obiectivele de cercetare:

- estimarea raportului de corelație a dimensiunii florilor tubulare și anterelor cu fazele microsporogenezei și microgametogenezei;
- determinarea particularităților histoanatomice de dezvoltare ale microsporangiumului la plantele de floarea-soarelui fertile, cu androsterilitate citoplasmatică și indusă;
- evidențierea indicilor morfo-fiziologici a meiocitelor și microsporilor la plantele tratate și netratate cu giberelină;
- elucidarea particularităților citogenetice a diviziunii meiotice la floarea-soarelui;
- studiul expresiei unor gene implicate în microsporogeneză la floarea-soarelui sub influența giberelinei.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată a fost evaluată activitatea transcripțională a genelor *PCNA1*, *CycD3*, *HIS1-3*, *H3.1*, *AHP2*, *MND1*, *DYAD*, *ASK1*, *EXPA1* și *GSL12* implicate în procesul de reproducere la floarea-soarelui, care a permis corelarea *pattern*-ului de expresie cu prezența aberațiilor cromozomiale, degradarea stratului tapetal, meiocite cu formă și structură degenerată, polen steril la plantele cu ASI. Studiile histoanatomice și citogenetice au evidențiat aspecte noi privind dezvoltarea diferențiată a țesuturilor microsporangiumului, pe parcursul microsporogenezei, la plantele cu androsterilitate indusă și cele cu androsterilitate citoplasmatică, comparativ cu plantele fertile. S-a demonstrat efectul gametocid al giberelinei prin scăderea dimensiunii anterelor, identificarea unui număr mare de aberații cromozomiale la plantele tratate și inhibarea totală a meiozei la plantele cu ASC.

Problema științifică importantă soluționată constă în *elucidarea* rolului giberelinei în inițierea și reglarea diviziunii celulare în antere de floarea-soarelui, într-un sistem model (plante fertile, cu androsterilitate citoplasmatică și androsterilitate indusă), *fapt ce contribuie* la identificarea *pattern*-urilor de expresie diferențiată a genelor implicate în microsporogeneză în dependență de tipul de sterilitate, stabilirea fazei în care a fost perturbată meioza la plantele cu ASI ce a favorizat formarea grăuncioarelor de polen sterile și lipsa acestora la plantele cu ASC, *ceea ce duce* la clarificarea mecanismelor de inducere a androsterilității.

Importanța teoretică a lucrării. Rezultatele prezentate aprofundează cunoștințele existente despre mecanismele histoanatomice și citologice ale tranziției de la sporofitul diploid la gametofitul haploid al plantelor de floarea-soarelui cu sterilitate masculină indusă și citoplasmatică. Cercetările vizează fundamentarea informațiilor despre acțiunea giberelinei asupra gradului de fertilitate la floarea-soarelui și a microsporangiumului la plantele fertile și cu androsterilitate citoplasmatică și modelarea unei scheme ipotetice, care descrie elementele de bază în inducerea sterilității masculine la diferite etape de dezvoltarea a celulelor mamă polen.

Valoarea aplicativă. Au fost implementate metodele de microscopie fonică și ultramicrotomare în Laboratorul de Genomică, care permit eficientizarea cercetării unor procese sau mecanisme corelate cu studiile moleculare. Studiul bioinformatic și molecular realizat prin metoda Real-Time PCR a permis identificarea unor gene implicate în microsporogeneză cu rol prioritar și potențial în androsterilitatea la floarea-soarelui.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere.

- Estimarea raportului de corelație a dimensiunii florilor tubulare și a anterelor cu fazele microsporogenezei, în vederea stabilirii unor criterii indirecte pentru determinarea stadiului de dezvoltare a microsporilor.
- Determinarea particularităților histoanatomice, reprezentate prin modificarea distructivă a țesuturilor microsporangiumului la plantele cu androsterilitate indusă și cu androsterilitate citoplasmatică comparativ cu plantele fertile.
- Evidențierea efectului gametocid asupra instabilității meiozei, prin depistarea aberațiilor cromozomiale și a produselor post-meiotice anormale asociate cu sterilitatea polenului la plantele cu ASI.
- Identificarea acțiunii giberelinei asupra activității transcripționale a genelor prin inducerea expresiei diferențiate a factorilor ereditari implicați în diverse etape ale microsporogenezei la plantele cu ASI și ASC.

Aprobarea rezultatelor

Rezultatele expuse în teză au fost prezentate, discutate și aprobate la Ședințele Consiliului Științific al IGFP și Consiliul Științific al Centrului de Genetică Funcțională, UnAȘM, precum și în cadrul următoarelor întruniri științifice: 16-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 16-21 апреля 2012); Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Пушино, 30 июля – 3 августа 2012); IX International Scientific Conference for students and PhD students “Youth and progress of biology” (Lviv, 16 – 19 April 2013); 17-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 21-26 апреля 2013); ”European Biotechnology Congress” (Bratislava, 16 – 18 May 2013); International Plant Breeding Congress (Antalya, Turkey, 10-14 November 2013). Simpozionului Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective” consacrat aniversării de 80 de ani de la Înființarea Universității Agrare de Stat din Moldova (Chișinău, 09-11 octombrie 2013). International Plant Breeding III Congress, Kyrenia, Cyprus (15 – 19 october 2017), International Congress on oil and Protein Crops, Chisinau, Republic of Moldova (May 20 – 24, 2018).

Publicații la tema tezei. Rezultatele obținute sunt reflectate în 12 lucrări științifice (inclusiv 4 fără coautori), dintre care 4 articole în reviste recenzate naționale și 8 comunicări în cadrul unor manifestări științifice internaționale.

Volumul și structura tezei. Teza include introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 299 surse, volumul total de 132 pagini, 11 tabele, 42 figuri.

Cuvinte cheie: *Helianthus annuus L.*, microsporogeneză, androsterilitate citoplasmatică, giberelină, expresia genelor.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Introducere** se argumentează actualitatea și importanța problemei abordate, sunt formulate scopul și obiectivele tezei, sunt expuse noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor și sumarul compartimentelor tezei.

1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND CERCETAREA MICROSPOROGENEZEI LA PLANTE

Compartimentul include sinteza celor mai recente date din literatura de specialitate, atât la nivel național, cât și mondial, dar și expunerea sugestiilor privind particularitățile morfo-fiziologice și genetice în microsporogeneză și rolul fitohormonilor în inducerea sterilității la plante. Înțelegerea profundă a funcționării genelor implicate în meioză și în post – meioză la plante va facilita elaborarea strategiilor eficiente de ameliorare. În cadrul capitoului, o atenție deosebită a fost acordată studiului microsporogenezei la nivel molecular și acțiunea giberelinelor asupra acestui proces.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Obiectul de studiu, caracteristica generală. Pentru investigarea particularităților microsporogenezei la plantele de floarea-soarelui fertile și cu androsterilitate citoplasmatică, inclusiv efectul acțiunii giberelinei asupra dezvoltării gametofitului masculin au fost luate în studiu două linii de *H. annuus* ($2n=34$), din colecția de germoplasmă a asociației A.M.G Agroselect, or. Soroca:

- **SW501** (linia izogenă B, menținătoare de sterilitate);
- **SW501 ASC** (linia izogenă A, cu citoplasma sterilă *H. petiolaris* Nutt.).

Obținerea și cultivarea plantelor cu androsterilitate indusă de gibereline (ASI). Analiza efectului de inducere a sterilității masculine s-a realizat pe un număr de 50 - 55 de plante din fiecare variantă de studiu (linie) tratată prin pulverizare cu soluție apoasă de acid giberelic (Sigma) în concentrație de 0,01% (dizolvat preventiv în cantitate minimă de alcool etilic - 10 μ L) direct pe inflorescența în faza de butonizare R-2 [33] în raport cu un număr similar de plante – martor (stropite cu apă distilată).

Colectarea materialului. Butonii florali, cu lungimea de 1,0 mm – 4,0 mm au fost selectați și înlăturați manual. Butonii florali și anterele (cinci antere per buton), au fost măsurate cu șublerul digital. Zece muguri au fost luați în considerare pentru fiecare interval utilizat. Pentru muguri, măsurătorile au fost efectuate de la punctul de inserare a ovarului până la vârful mugurelui. Pentru antere, s-a măsurat de la începutul filamentului (sfârșitul bazal), până la vârful anterei (sfârșitul apical).

Metode de cercetare. Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost utilizate următoarele metode: macroscopice, prelevare și preparare a probelor experimentale, microscopie fonică [2], extragerea ARN-ului cu TRI Reagent, cuantificarea acizilor nucleici prin spectrofotometrie, electroforeza în gel de agaroză, reverstrascriptie, PCR cantitativ [3], metode bioinformatică și statistice de prelucrare a datelor.

3. PARTICULARITĂȚILE MICROSPOROGENEZEI LA LINIILE IZOGENE DE FLOAREA-SOARELUI

Microsporogeneza este un proces important în reproducerea plantelor, care include mai multe etape de dezvoltare, de la celulele sporogene la microspori. Dezvoltarea țesuturilor anterei, morfologia meiocitelor și stabilitatea meiozei reprezintă particularitățile ce stau la baza formării grăuncioarelor de polen fertile.

3.1. Identificarea fazelor microsporogenezei și microgametogenezei

Formarea microsporilor și ulterior a grăuncioarelor de polen se realizează concomitent cu creșterea anterei și butonului floral, evidentă fenotipic prin modificări ale dimensiunii, formei și culorii [34]. Relevarea acestor transformări reciproce este esențială în identificarea unor markeri morfologici vizibili, pentru a pune în evidență etapele de dezvoltare a microsporilor fără deteriorarea acestora. Astfel, pentru a stabili dimensiunea butonului floral și a anterei, corelate cu etapa de diferențiere a microsporilor au fost studiate ambele diviziuni meiotice, hetero- și homotipică, la anterele izolate în diferite stadii de dezvoltare din florile tubulare a două linii izogene SW501 cu analogul androsteril SW501ASC. În calitate de criteriu de referință în caracterizarea gametofitului masculin au servit etapele descrise de Horner (1977) [18].

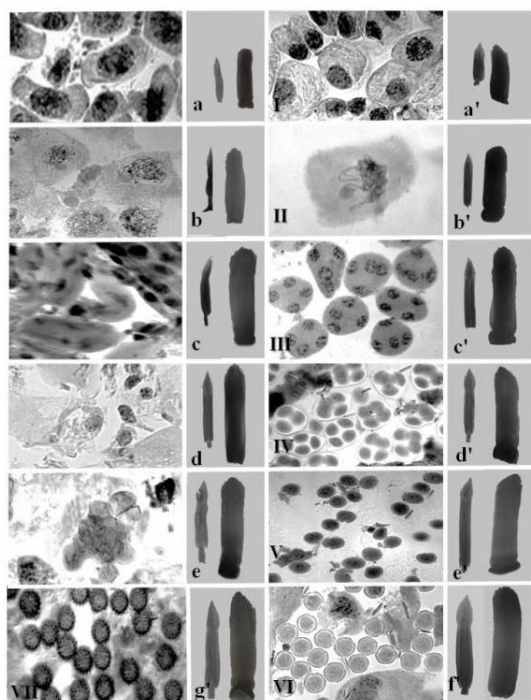


Fig. 3.1. Dimensiunea butonilor florali (X 64) și anterelor de floarea-soarelui asociată cu fazele de dezvoltare a microsporocitelor și polenului (X 640).

Notă: I – leptoten; II – pachiten; III – diviziuni; IV – tetrade; V – microspor tânăr; VI – polen uninucleat. Linia SW501 – ASI: a – e; linia SW501ASC: a' – e', g și f

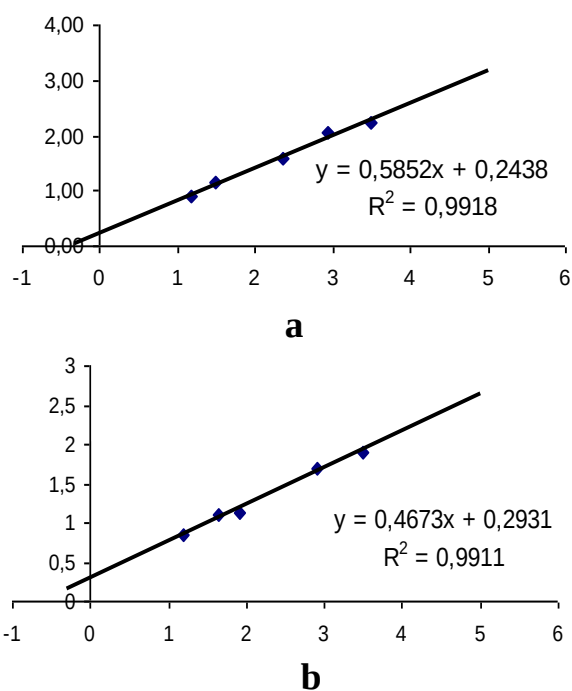


Fig. 3.2. Corelația liniară dintre ritmul de creștere și dezvoltare a anterelor și butonului floral

Notă: a – linia SW501, b – linia SW501ASC
Axa ordonatelor – lungimea anterei, mm; axa absciselor – lungimea butonului floral, mm.

Analiza preparatelor citologice a pus în evidență fazele de diferențiere a meiocitelor până la grăunciorul de polen în cazul plantelor fertile sau până la etapa de degradare a acestora (pachiten) la cele sterile (Figura 3.1). Conform datelor obținute, fazele de formare a meiocitelor pot fi depistate în florile masculine atunci când acestea au următoarele dimensiuni: < 1,0 mm – premeioză; 1,0 - 1,5 mm – leptoten; 1,5 - 2,5 mm – pachiten; 2,5 - 3,0 mm – diviziuni (anafaza I până la telofaza II); 3,0 și 3,5 tetrade; > 3,5 mm – microspor. Valorile numerice la liniile izogene SW501 și SW501ASC puse în evidență în cadrul studiului, corespund cu cele stabilite de alți autori la alte genotipuri fertile de floarea-soarelui [7, 22, 35].

Un alt aspect ce ține de optimizarea schemei experimentale (prelevarea materialului biologic, calitativ și în cantități suficiente, de ex. în condiții de câmp) constă în stabilirea gradului de corelație dintre dimensiunile anterei și butonului floral pentru genotipurile de interes. Astfel, măsurările liniare efectuate sub obiectivul microscopului fonic ($\times 64$) demonstrează o relație de linearitate buton floral-anteară, cu valori pozitive înalte ale coeficientului de corelație (r) mai mari de 0,97 și ale coeficientului de regresie liniară (R^2) mai mari de 0,95 (Figura 3.2). Rezultatele denotă un nivel înalt de corespundere a dreptei de regresie cu datele reale, ceea ce indică asupra acurateței în estimarea gradului de asociere liniară. Ritmul de creștere al anterei este asociat cu cel al florilor tubulare. Astfel, estimarea dimensiunii anterei corespunzătoare fazei meiotice este posibilă dacă se cunoaște dimensiunea butonului floral [12].

Identificarea și descrierea/stabilirea caracterelor morfologice ale organelor reproductive în calitate de indicator pentru determinarea stadiului de dezvoltare al microsporului a fost descrisă și pentru astfel de culturi, ca tomatele [31], ardei iute [28] și soia [19].

În cadrul cercetărilor noastre, primele evenimente de apoptoză observate în preparatele citologice la plantele cu ASC s-au constatat în pachiten. Aceste particularități genetice argumentează realizarea asocierii dintre dimensiunea florilor tubulare/anterei și faza microsporogenezei/gametogenezei, care trebuie să fie verificată pentru fiecare genotip homo- sau heterozigot, cu diferit tip de androsterilitate etc.

3.2. Histoanatomia microsporangiului la plantele de floarea-soarelui

Pornind de la constatarea, că orice deviere de la normă se reflectă în modificări de formă, structură și respectiv – funcție, s-a urmărit dezvoltarea straturilor parietale și a țesutului sporogen, prin analiza secțiunilor transversale și a preparatelor citologice, obținute din antere în diferite faze ale dezvoltării microsporilor.

Carcateristica histoanatomică a anterelor la plantele fertile, cu androsterilitate indusă și androsterilitate citoplasmatică. Analiza secțiunilor microscopice, ale anterelor colectate de la plantele liniei fertile, a pus în evidență structura diferențiată, tipică a peretelui anterei format din patru straturi. Epidermul, endoteciul, stratul median și tapetul rămân distincte pe întreaga perioadă a meiozei (Figura 3.3, a-c). Meiocitele generate din celulele țesutului sporogen se individualizează prin formarea unui perete calozic fin, ulterior în rezultatul diviziunilor hetero- și homotipice se obțin microspori bine conturați, care evoluează post-

meiotic prin formarea exinei și echinulațiilor corespunzător speciei, fiind pusă în evidență dezintegrarea treptată, sincronizată a țesutului tapetal.

Tratarea cu AG₃ a inflorescențelor plantelor fertile în faza de butonizare a determinat modificări structurale ale țesuturilor la nivelul întregului lob al anterei. Particularitățile structurale anormale, caracteristice sterilității masculine au fost evidențiate la toate etapele microsporogenezei, stabilite prin asociere cu dimensiunea florilor tubulare, similar plantelor control.

Astfel, straturile epidermic și endoteciul au prezentat deformații cu diferit grad de severitate, iar statul tapetal a manifestat o formă distorsionată cu semne de colaps prematur. Populațiile heterogene de meiocyte, unele cu dezvoltarea inhibată în premeioză, iar altele în diferite faze ale meiozei, inclusiv tetrade, cu semne de degradare precoce, demonstrează efectul gametocid al giberelinei. Caracteristicile semnificative post-meiotice, constatate în cazul androsterilității induse, sunt: microspori plasmolizați fără o structurare adecvată a peretelui celular, conglomerate de membrane calozică și nuclee aglutinate, incapacitatea de a menține o activitate metabolică înaltă a citoplasmei.

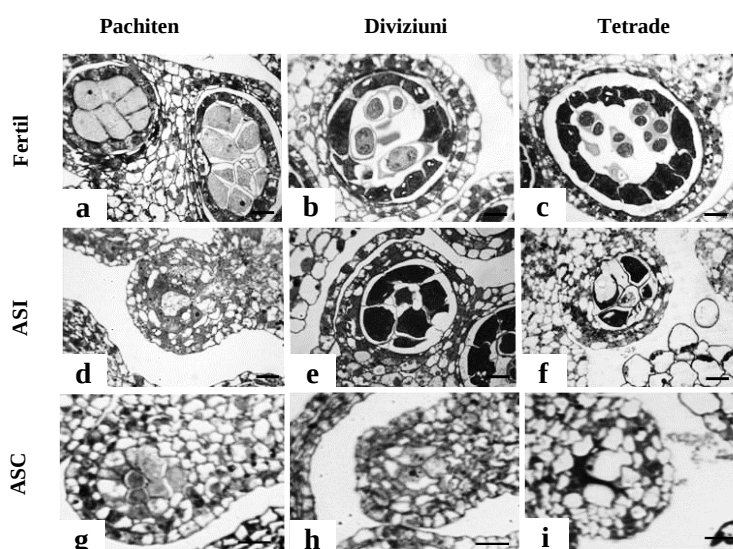


Fig. 3.3. Secțiune transversală a anterelor de floarea-soarelui a liniei SW501 și SW501ASC.

Notă: a – stadiul pachiten la linia SW501; b – celulele mamă polinice (CMP) în faza de diviziuni la plantele martor; c – loculi anterei în stadiul de tetrade; d – stadiul de pachiten la plantele tratate; e – stadiul de diviziuni la plantele tratate; f – anterele plantelor cu androsterilitate indusă în stadiul de tetrade; g – faza pachiten - linia SW501ASC; h – etapa de diviziuni; i – faza de tetrade. Scara: 50 μ m.

La linia cu androsterilitate citoplasmică SW501ASC au fost relevate disfuncționalități evidente în pachiten. În majoritatea celulelor mamă polinice, meioza este inițiată și decurge normal până la faza leptoten, însă doar un număr mic de celule ajung în faza pachiten. Spre deosebire de analogul fertil, la liniile cu sterilitate citoplasmică numărul celulelor sporogene implicate în diviziune este mult mai mic. Creșterea în dimensiuni a florilor tubulare este asociată cu deteriorarea morfologică progresivă atât a meiocitelor, cât și a celorlalte țesuturi ale anterelor. Astfel, se constată un proces intens de vacuolizare anormală și hipertrofie, în special a tapetului, asociat și cu alte efecte distructive, precum polarizarea materialului citoplasmatic, degradarea pereților, care devin în unele cazuri mai puțin distincți între celulele adiacente (Figura 3.3, h, i, j).

La plantele cu ASC, AG₃ a inhibat dezvoltarea post-histogeneză a ţesuturilor microsporangiumului, inclusiv a celui sporogen, astfel încât în meiocite nu a fost iniţiată meioza. Ulterior, chiar în faza de pachiten ţesutul tapetal este puternic hipertofiat, cu particularităţi apoptotice accentuate, caracteristice şi celorlalte straturi ale anterei.

Aspectele histoanatomice ale microsporogenezei au fost studiate la un şir de plante sterile şi fertile (petunie [46], rapiţă [25], orz [23], ceapă [41], soie [19]). La unele linii şi hibrizi de floarea-soarelui, de asemenea au fost descrise particularităţile pereţilor anterelor şi originea procesului abortiv al polenului [18, 29]. Studiul histoanatomic comparativ al microsporangiumului de floarea-soarelui la linia izogenă fertilă, cu androsterilitate indusă prin aplicarea exogenă a giberelinei şi sterilă reprezintă o premieră. Astfel, zonalitatea histoanatomică a microsporangiumului exprimată prin: epidermă, endoteciu, straturile median şi tapetal confirmă principiul identităţii anterelor fertile.

La plantele sterile au fost evidenţiate transformările selective şi succesive ale anterelor. Astfel, la plantele cu ASI straturile epidermic şi endoteciu au prezentat deformaţii cu diferit grad de severitate în profaza I, faza de diviziuni şi tetrade, iar statul tapetal a manifestat o formă distorsionată cu semne de colaps prematur incompatibile cu fertilitatea polenului. La plantele cu ASC efectul pronunţat de accelerare a degenerării ţesuturilor microsporangiumului s-a evidenţiat începând cu faza timpurie, iar în faza de tetrade au manifestat o tendinţă accentuată de aglutinare, iar tapetul a fost exagerat de hipertofiat cu grad sporit de poliploidizare.

3.3. Profilul citologic al diviziunii meiotice la liniile izogene de floarea-soarelui

Anomaliile de structură constatate în procesul dezvoltării ţesuturilor anterelor la plantele cu ASI-AG₃ şi ASC demonstrează fără echivoc faptul că diferenţierea celulelor meiotice necesită interacţiuni intra- şi intertisulare, fiziologic coordonate, iar orice deficienţă în asigurarea spaţio- temporală a acestora afectează gradul de fertilitate. Din acest considerent, se justifică un alt obiectiv al investigaţiilor – examinarea profilului citologic al diviziunii meiotice la plantele de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă în comparaţie cu cele fertile, în vederea identificării prezenţei/absenţei aberaţiilor cromozomiale, tipului şi frecvenţei acestora.

Întrucât la plantele cu androsterilitate citoplasmatică meiocitele încep să manifeste semne de degradare din pachiten, iar la cele cu ASC tratate cu giberelină meiocitele sunt blocate în premeioză, măsurările morfometrice şi identificarea aberaţiilor cromozomiale nu au putut fi realizate.

Caracteristici morfometrice ale celulelor sporogene la plantele cu ASI. Concomitent cu evaluarea microscopică a morfologiei dezvoltării anterei a fost posibil şi studiul morfometric computerizat al imaginilor ce a vizat identificarea unor parametri dimensionali ai meiocitelor şi microsporoeciilor: *aria, perimetrul şi lungimea*.

Până în prezent analize morfometrice s-au realizat în special la celulele umane, care pot servi drept indicatori prognostici pentru diagnosticul clinic şi patologic. La plante, spre deosebire de regnul animal, există foarte puţine informaţii referitor la analiza morfometrică a celulelor sexuale. Astfel de cercetări au fost realizate în scopul asocierii formei şi dimensiunii tetradelor şi grăuncioarelor de polen cu gradul de fertilitate [30]. Considerăm că abordarea descriptivă completată cu parametrii selectaţi sporesc relevanţa caracterizării microsporogenezei

la plantele cu ASI în raport cu cele fertile, oferind criterii cuantificabile, care pot susține o diferențiere a anomaliei în analiza citologică.

Aria celulelor la plantele martor este de $1106,9 \mu\text{m}^2$ în leptoten și de $1110,6 \mu\text{m}^2$ în pachiten. Aplicarea exogenă a giberelinei a determinat micșorarea suprafeței celulare în fazele timpurii ale meiozei, astfel încât, la varianta tratată aria a fost de $955,9 \mu\text{m}^2$ în leptoten și $965,3 \mu\text{m}^2$ în pachiten. În faza de diviziuni, meiocitele la varianta martor, indică valori mai mari ale acestui parametru ($1256,9 \mu\text{m}^2$), care ulterior se micșorează ne semnificativ până la $1193,8 \mu\text{m}^2$, datorită transformărilor morfo-fiziologice care au loc la formarea tetradelor. Similar fazelor precedente, la plantele cu ASI se păstrează o tendință de micșorare a valorilor pentru arie în faza de diviziuni – $1153,5 \mu\text{m}^2$ și în faza de tetrade – $1145,6 \mu\text{m}^2$. Microsporii tineri, eliberați din tetrade au prezentat o suprafață de $311,8 \mu\text{m}^2$ la varianta martor și comparativ mai mică - $291,5 \mu\text{m}^2$, la cea tratată cu AG₃.

Un alt parametru analizat este perimetrul celulei, valorile căruia la plantele control în decursul celor două divideri meiotice (leptoten $120,3 \mu\text{m}$ și tetrade $128,4 \mu\text{m}$) până la faza de microspor, variază foarte puțin (cu doar $8 \mu\text{m}$), indicând o tendință de creștere treptată, similară celei determinate la măsurarea ariei celulelor analizate. La plantele tratate, datorită efectului gametocid al giberelinei, care induce modificări în morfologia celulelor, datele obținute pentru perimetrul celulelor în decursul celor două diviziuni sunt situate în intervalul $95,8 \mu\text{m}$ (leptoten) și $115,2 \mu\text{m}$ (tetrade). În cazul microsporilor la plantele control perimetrul a înregistrat valori de $55,2 \mu\text{m}$, iar la varianta tratată – cu $7 \mu\text{m}$ mai puțin.

Al treilea indice analizat este lungimea, care a variat neesențial în primele faze ale microsporogenezei, (leptoten $41,8 \mu\text{m}$ – tetrade $47,3 \mu\text{m}$) la plantele control. Similar celorlalți parametri analizați la plantele cu ASI, lungimea celulelor a fost mai mică, astfel că în faza leptoten, celulele mamă polinice au avut $34,7 \mu\text{m}$, iar tetradele $44,3 \mu\text{m}$. În următoarea fază a microsporogenezei micșorarea diametrului microsporilor de la $21,1 \mu\text{m}$ la varianta martor până la $16,4 \mu\text{m}$ la cea tratată a fost asociată cu inducerea androsterilității și formarea polenului steril.

Generalizând datele obținute în studiu se poate constata că celulele cu cele mai reduse valori ale indicilor studiați față de control au fost observate în primele două faze ale meiozei. Astfel în leptoten, aria s-a micșorat cu 13%, perimetrul – cu 20% și lungimea – cu 17%, iar în faza pachiten cu 13, 25% și, respectiv cu 19% (Figura 3.4).

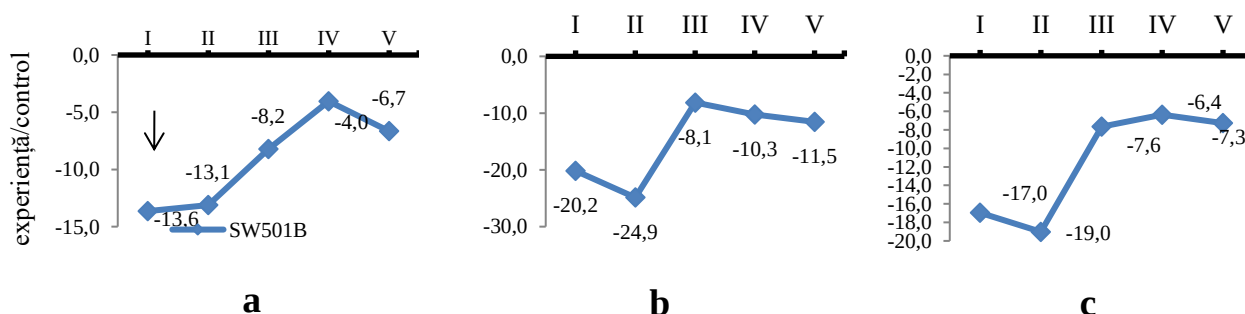


Fig. 3.4. Analiza comparativă a diferenței valorilor parametrilor morfometrici ai meiocitelor și microsporilor la plantele cu ASI-AG₃ în raport cu cele fertile (control).

Notă: a – aria, μm^2 ; b – perimetru, μm ; c – lungimea, μm . Axa ordonatelor: diferența experiență-control, unde controlul este considerat 100%. Axa absciselor: fazele microsporogenezei I – leptoten; II – pachiten; III – diviziuni; IV – tetrade; V – microspor.

Este important de menționat faptul că între acești trei parametri este o relație de interdependență puternică, coeficientul de corelație (r) dintre valorile procentuale ale diferențelor față de martor fiind 0,85 în cazul arie : perimetrul, 0,94 – arie : lungime și 0,97 pentru perimetru : lungime. Modificările anormale în fenotipul celulelor mamă polinice sunt evidente și din valorile mai mici ale coeficientului de corelație dintre arie și perimetru. Acest fapt, indică asupra unui contur al meiocitelor, cu invaginări, reprezentând astfel, anomalii de formă și volum cauzate de acțiunea negativă a giberelinei.

Astfel, analiza morfometrică comparativă a meiocitelor și microsporocitelor la linia tratată cu giberelină a evidențiat efectul gametocid exprimat prin modificarea anormală a conturului/formei și volumului celulelor, ceea ce presupune prezența unor deficiențe atât în integritatea/rigiditatea și, respectiv în funcționalitatea peretelui celular, cât și în proprietățile fizice ale protoplasmei.

Aberații cromozomiale în meioza I și II. Investigațiile citogenetice asupra plantelor fertile de floarea-soarelui au pus în evidență aberațiile cromozomiale în faza de diviziuni cu un procent foarte redus – 0,82 % (cromozomi retardatari, expulzați din celulă, picnotici, aglutinări cromatice, cromozomi lipicioși, corpuri și fragmente cromatice, punți, micronuclei etc) (Tabel 3.1). Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele prezentate de alți cercetători, care argumentează apariția unor anomalii cu o frecvență mică (până la 5%) la formele complet fertile de floarea-soarelui, fiind condiționate de disjuncția secvențială și nu simultană a bivalentilor în anafaza I [43].

Tabel 3.1.

Ponderea aberațiilor cromozomiale în anterele plantelor fertile în normă și tratate cu AG₃

Faza meiozei	Tipuri de aberații cromozomiale	SW501	SW501+AG ₃	
		meiocyte		
		analizate (nr.)	cu anomalii (%)	analizate (nr.) cu anomalii (%)
Total, meocyte analizate la diferite faze ale meiozei		2175,86±5,13	0,82±0,04	1062,26 ± 2,70 64,00 ± 0,27
Metafaza I	<i>Cromozomi neorientați</i>	302,46 ± 0,54	1,76 ± 0,17	155,00 ± 0,83
	<i>Cromozomi lipicioși</i>		-	25,95 ± 0,53
Anafaza I	<i>Cromozomi retardatari</i>	312,73 ± 1,33	0,68 ± 0,16	140 ± 0,93 52,19 ± 2,41
Telofaza I	<i>Micronuclei</i>	323,40 ± 1,48	-	150,83 ± 2,55 64,90 ± 0,39
Profaza II	<i>Micronuclei</i>	299,20 ± 2,41	2,58 ± 0,19	151,00 ± 2,81 67,65 ± 2,83
Metafaza II	<i>Migrare cromozomială precoce</i>	305,40 ± 1,00	0,69 ± 0,16	154,93 ± 0,90
	<i>Cromozomi lipicioși</i>		-	32,53 ± 0,41
Anafaza II	<i>Cromozomi retardatari</i>	315,40±1,00	-	155,26 ± 0,82
	<i>Punți cromozomale</i>		-	59,12 ± 0,60 13,52 ± 0,52
Telofaza II	<i>Micronuclei</i>	317,26±0,36	-	154,73 ± 0,74 43,08 ± 0,60

Notă: diferențele față de martor sunt semnificative la $p \leq 0,05$

În preparatele citologice obținute din anterele plantelor SW501-AG₃, frecvența aberațiilor observate a fost mult mai mare, fiind de 64,00%. Cel mai des întâlnite au fost meiocitele cu micronuclei, în special în telofaza I și pachiten (Figura 3.5, c, g). Cromozomii lipicioși observați în metafază sunt evenimente, care ar putea continua până în telofază, cauzând fenomenul de inversie, iar apariția de cromozomi izolați în metafaza I și întârziți în anafaza I reprezintă cel mai adesea cromozomi univalenți, neîmperecheați, în curs de expulzare [43].

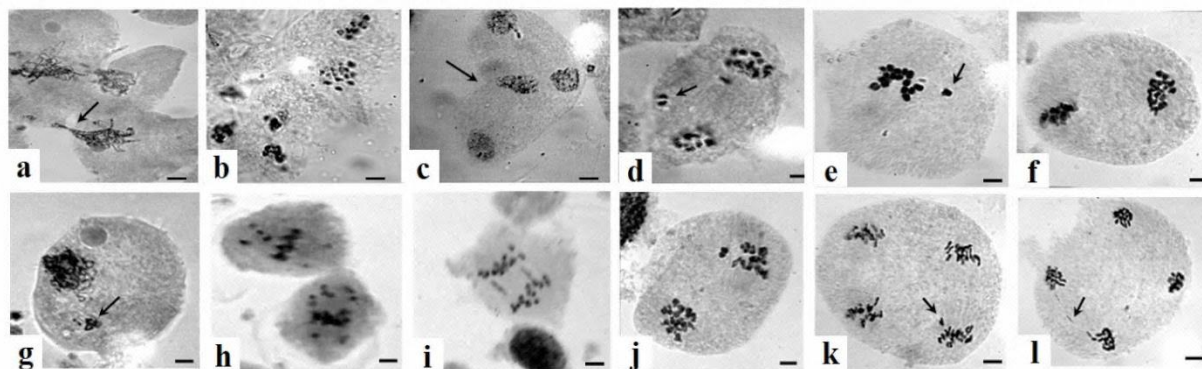


Fig. 3.5. Aberații cromozomiale în meioză la plantele de floarea-soarelui cu ASI-AG₃.

Notă: a – transferul cromatinei între două celule mamă polinice în pachiten; b – picnoza; c – telofaza II cu poziție irregulară a nucleilor; citoplasma în proces de dividere/citochineză asimetrică /inegală formând celule cu unu și trei nucleii; d – micronuclei în telofaza I; e – cromozomi neorientați în metafaza II (săgeată); f – asincronizare în diviziunea celulară, cu cromozomii la un pol în metafaza II și la celălalt în anafaza II; g – dezorganizarea cromatinei în pachiten (săgeata); h – migrare precoce a cromozomilor la poli în metafaza I; i – cromozom retardat în anafaza I; j – cromozomi lipicioși în anafaza II; k – cromozom retardat în anafaza II; l – punte meiotică în anafaza II; Bara: 15 μ m (a,b,c, e, f, g, j); 5 μ m (d, h, i, k, l).

Destabilizarea meiozei prin apariția aberațiilor cromozomiale la aplicarea giberelinei a fost descrisă la plantele sterile de *Brassica campestris* și *Crocus sativus* [21].

Analiza studiului citologic a demonstrat că meioza la plantele fertile decurge în mod normal, ca rezultat formându-se polen viabil. Odată cu tratarea plantelor, începând cu faza de leptoten se evidențiază modificări structurale ale meiocitelor, aceste anomalii se păstrează până la faza de microsporociți când aceștia manifestă particularități de degradare.

La linia sterilă meioza are un început fără abateri de la normă, pachiten-ul fiind prima etapă în care devin evidente modificări în dimensiunile meiocitelor acestea ajungând până la faza de diviziuni degradate și foarte aglutinate. La plantele sterile tratate cu giberelină avortarea meiocitelor are loc în faza de premeioză, astfel la aceste variante nu are loc formarea polenului.

Anomalii ale tetradelor și viabilitatea polenului. În urma studiului citologic, la linia fertilă SW501 în anterele de 3,0 mm – 3,5 mm au fost depistate tetrade normale cu microspori fertili (Figura 3.6, a). Tetradele au fost considerate ca fiind normale atunci când au prezentat patru microspori cu dimensiuni egale și fără micronuclei.

De asemenea, la această fază de dezvoltare a microsporului au fost depistate PPM (produse post – meiotice) cu abateri de la normă într-un număr foarte mic (1,19%) ceea ce ne permite să presupunem că acest fenomen nu a influențat gradul de fertilitate a polenului.

Iregularitățile, care au loc în fibrele axului de diviziune sunt responsabile pentru formarea produselor post-meiotice anormale cum ar fi monadele, diadele, triadele și poliadele. Examenul microscopic realizat la linia fertilă SW501 + AG₃ a permis evidențierea produselor post-meiotice atipice (monade, diade, triade și poliade) (Tabel 3.2, Figura 3.6).

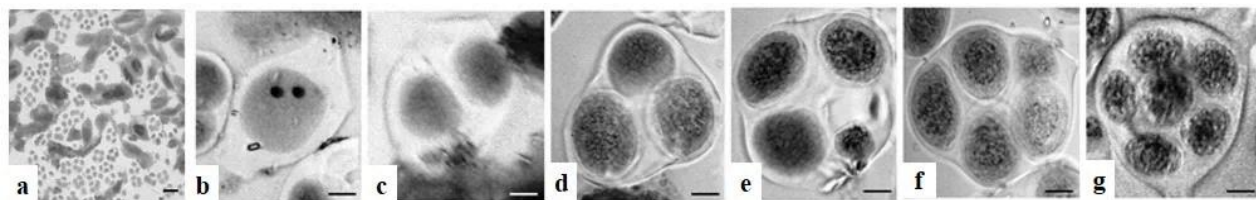


Fig. 3.6. Faza de tetrade în antere la linia SW501.

Notă: a – varianta martor, tetrade normale; b-g varianta tratată, b – monadă cu micronuclei; c – diadă; d – triadă; e – tetradă cu microcit; f – pentadă; g – poliadă. Scara= 20 μ m (b-g), 10 μ m (a).

Astfel, la varianta tratată cu giberelină în urma studiului citogenetic au fost depistate 71,31% de PPM atipice. Produsele post-meiotice așa ca diadele pot produce gameți nereduși (2n), în timp ce triadele generează gameți dezechilibrați. În urma analizei citologice la plantele de floarea-soarelui, a liniei SW501 tratate cu giberelină, au fost determinate 6,89% de diade și 10,35% triade (Figura 3.6 c, d). Rezultate similare au fost raportate și pentru unele linii de porumb cu sterilitate masculină parțială, la unele populații de triticale cu sterilitate masculină și la hibridii interspecifici de *Vasconcellea pubescens* [47], *Carica papaya* și *Vasconcellea monoica* [10]. Aberațiile meiotice, așa ca micronucleii se formează ori de câte ori un cromozom sau un fragment al unui cromozom este încorporat într-unul dintre nucleele fiice în timpul diviziunii celulare. Astfel, la variantele martor au fost depistate tetrade cu micronuclei, însă acest nivel a fost foarte mic (0,40%), comparativ cu plantele tratate (9,91%) (Tabel 3.2). Acest fapt reprezintă o dovadă a acțiunii gametocide a fitohormonului și a instabilității cromozomiale.

Tabel 3.2.

Ponderea produselor post-meiotice cu anomalii în anterele plantelor fertile și cu ASI

Variante	PPM atipice	Tetrade cu:		Monade	Diade	Triade	Poliade
		micronuclei	microciți				
SW501	1,19 $\pm$ 0,08	0,40 $\pm$ 0,08	-	-	0,37 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,05	-
SW501+AG ₃	71,31 $\pm$ 4,06	9,91 $\pm$ 1,11	20,04 $\pm$ 1,57	9,12 $\pm$ 1,49	9,12 $\pm$ 1,49	10,35 $\pm$ 1,31	14,10 $\pm$ 1,41

Notă: Datele reprezintă valoarea medie a 15 antere. Diferența dintre varianta martor și tratată cu AG₃ sunt semnificative ($p \leq 0,05$).

Este important de menționat faptul că procentul produselor post-meiotice neregulate este mult mai mic comparativ cu cel al aberațiilor cromozomiale, ceea ce ne permite să presupunem că formarea tetradelor ca proces în sine nu a fost perturbat esențial la variantele studiate.

Întrucât microsporogeneza la plantele control a liniei SW501 a decurs fără devieri de la normă, polenul a fost fertil în proporție de 99,21%, estimat după aspectul morfologic, caracteristic speciei și testul de culoare cu aceto-carmin – pozitiv (Figura 3.7, a).

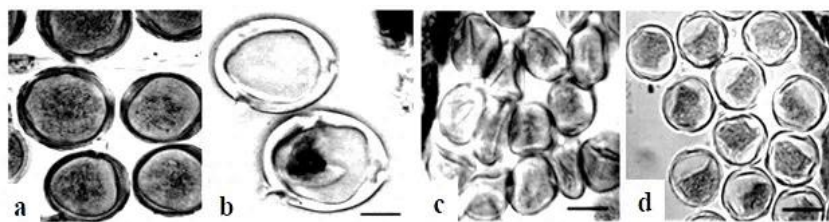


Fig. 3.7. Aspectul morfologic al grăuncioarelor de polen.

Notă: a – grăuncioare de polen fertile, linia SW501; b – grăuncioare de polen sterile (goale); c – grăuncioare de polen sterile stafidate; d – grăuncioare de polen parțial goale, linia SW501 + AG₃. Scara = 20 μ m

Analiza gradului de fertilitate a polenului în anterele atrofiat de acțiunea AG₃ la linia SW501 a evidențiat valori foarte mici - 12,31% de polen aparent fertil. Caracterul discriminativ în dezvoltarea polenului steril comparativ cu cel fertil a servit testul de culoare cu carmin acetic, care a fost negativ, conturul distorsionat al microsporului conferind un aspect de "stafidă" (Figura 3.7, c), lipsa sau degenerarea materialului genetic și grăuncioare de polen goale (Figura 3.7, b), plasmolizare intensă, cu formarea spațiilor libere între membrană și citoplasmă, lipsa echinulațiilor caracteristice la maturitate și alte aspecte.

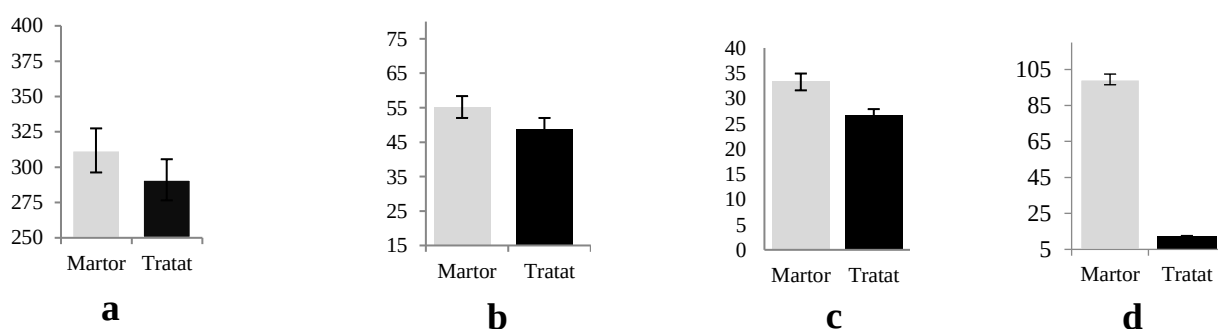


Fig. 3.8. Parametrii dimensionali ai grăuncioarelor depolen și gradul de fertilitate (%)

Notă: a – aria, μm^2 ; b – perimetru, μm ; c – diametru, μm ; d – gradul de fertilitate, %

Asemenea modificări de la normă ale grăuncioarelor de polen au fost descrise și la alte specii de plante, ca de ex., la formele sterile de bumbac [45] și la formele cu sterilitate indusă de către agentul chimic de hibridizare SQ-1 la grâu [44].

Un alt criteriu de apreciere a sterilității grăuncioarelor de polen, poate fi modificarea în dimensiuni a acestora în raport cu valorile caracteristice speciei/genotipului. Astfel, grăuncioarele de polen la plantele androfertile linia SW501 (buton floral 3,5 – 4,0 mm) din varianta control au măsurat în diametru valori de $33,27 \pm 0,36 \mu\text{m}$. În variantele tratate chimic acest parametru s-a micșorat cu 3% (figura 3.8). În cazuri separate au fost observați un număr mic, nereprezentativ, de microspori sterili cu vacuole exagerat de mari, condiționând astfel și un diametru mai mare comparativ cu martorul.

Gradul de fertilitate foarte mic (12,31%) asociat cu procentul înalt de anomalii cromozomiale (64,00%) în diferite faze ale procesului de microsporogeneză a plantelor tratate demonstrează efectul gametocid al giberelinelor.

4. ACTIVITATEA TRANSCRIȚIONALĂ A UNOR GENE CU ROL ESENȚIAL ÎN MICROSPOROGENEZĂ LA FLOAREA-SOARELUI

În cunoașterea morfo-anatomiei dezvoltării gametofitului masculin, microscopia, a avut și continue să exercite, de-a lungul timpului, o contribuție semnificativă, însă pentru a elucidă bazele genetice ale acestui proces fiziologic, este necesar studiul entităților moleculare cu rol de supresie și/sau stimulare a diferitelor evenimente celulare.

În această ordine de idei, prezintă interes investigarea activității transcripționale a genelor implicate în reglarea, inițierea și realizarea proceselor de recombinare cromozomială (*coeziunea cromatidelor surori, formarea sinapsei, a bivalenților, segregarea cromozomilor omologi etc.*) din ambele diviziuni meiotice, precum și în dezvoltarea morfologică a meiocitelor, sincronizată cu cea a țesuturilor somatice ale anterei.

Grupul de gene selectat (zece) a fost utilizat în calitate de secvență-test în stabilirea similarității nucleotidice la floarea-soarelui prin alinierea multiplă realizată cu instrumentul bioinformatic BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) în toate variantele sale (blastn, blastx, tblastn tblastx etc.). Astfel, analiza *in silico* la floarea-soarelui a pus în evidență o singură genă cu secvența nucleotidică completă *HaCyclin D3*: AY033440.1. Alte secvențe genice adnotate, cu referință strictă la ciclul celular, în special la diviziunile meiotice lipsesc.

Din acest considerent, s-a decis de a analiza EST-urile (Expressed Sequences Tag) din diferite colecții de ADNc la *Helianthus annuus* (DNAC libraries) [38] în vederea prognozării unei funcții similare cu cele ale secvențelor genice de la alte plante, care au indicat cel mai înalt grad de omologie.

4.1. Gene implicate în procese de organizare a cromozomilor și reglarea metabolismului ADN

În rezultatul analizei bioinformatic, pentru investigarea profilului transcripțional asociat proceselor de formare și dezvoltare a microsporilor la floarea-soarelui, au fost selectate următoarele gene/EST-uri: *PCNA1* (implicată în controlul ciclului celular, repararea și replicarea ADN-ului), *Cyclin D3* (favorizează tranziția de la faza G1 la faza S), *HIS1-3* și *H3.1* (fac parte din componența cromatinei și participă la replicarea ADN-ului).

Pentru investigarea rolului acestor gene la floarea-soarelui s-a evaluat nivelul de expresie în pachiten, faza de diviziuni, tetrade și microspor.

Analiza expresiei genice a relevat faptul că gena histonă *HIS1-3* a avut o activitate transcripțională mai înaltă la toate fazele studiate, însă a înregistrat diferențe semnificative de exprimare între linia fertilă SW501 și cea sterilă SW501ASC, în dependență de faza de dezvoltare a microsporului. În același timp, gena histona *H3.1* a arătat un nivel scăzut al expresiei genice, ceea ce indică deosebiri funcționale între tipurile de histone. Evaluarea nivelelor de expresie pentru genele implicate în reglarea meiozei a arătat că gena *CycD3* a avut cel mai mic nivel de expresie, atât în funcție de linie, cât și de fază studiată. Conform cercetărilor realizate la *Brassica napus* expresia genei *CycD3* prezintă valori mai scăzute în celulele aflate în diviziune la liniile cu androsterilitate citoplasmatică [39].

Rezultatele obținute în urma analizei RT-PCR au fost considerate semnificative pentru toate genele cu un nivel de expresie *fold change* (FC) cuprins între -1.5 și 1.5, fapt ce a demonstrat

diferențe privind activitatea transcripțională în funcție de fenotipul steril și faza microsporogenezei.

Pentru gena *CycD3* nivelul de expresie genică, a variat în dependență de faza analizată de la FC 2,0 până la 8,8 (Figura 4.1,a). Astfel, la linia izogenă SW501 tratată cu AG₃ gena *CycD3* a fost subexpresată în pachiten, fără a atinge pragul semnificației statistice, și supraexpresată în faza de diviziuni (FC=7,1), tetrade (FC=2,7) și microspor (FC=8,8) ($p<0,05$). La linia SW501ASC în faza de diviziuni și microspor s-a evidențiat supraexpresia genei date comparativ cu plantele fertile, iar la celelalte două faze activitatea transcripțională a fost în limita martorului.

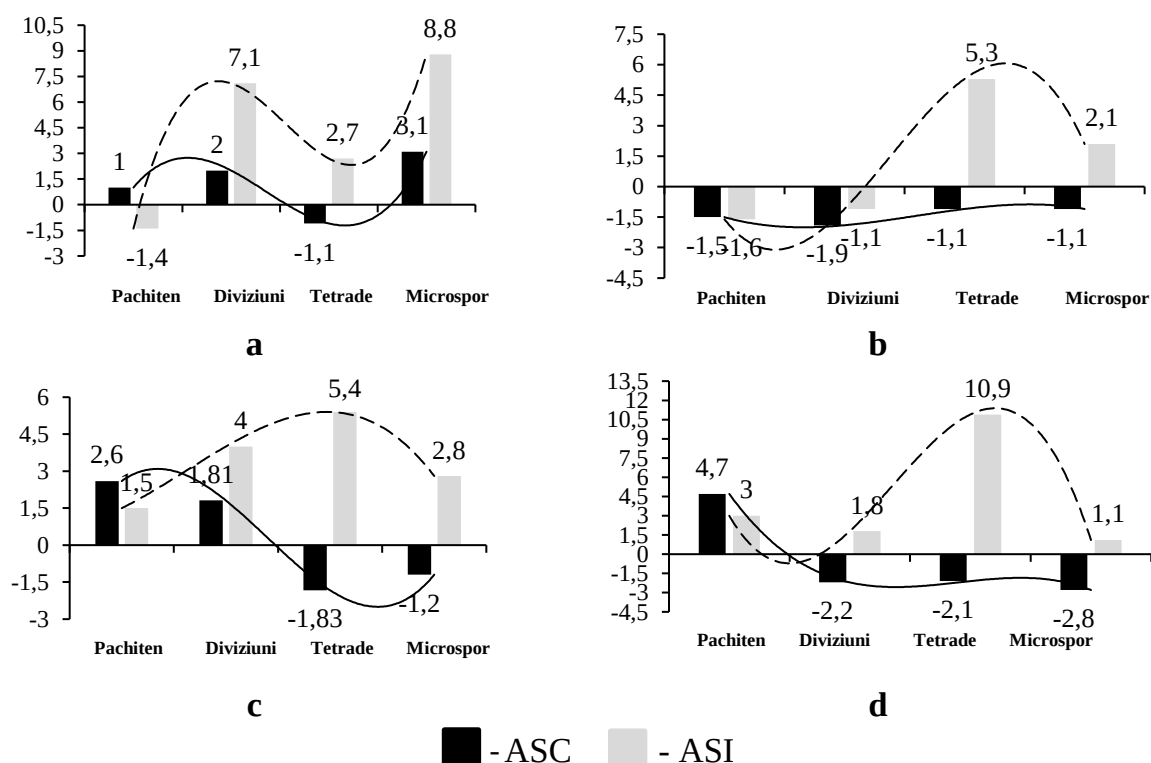


Fig. 4.1. Modificarea activității transcripționale experiență/control (*fold change*) a genelor implicate în organizarea cromozomilor și reglarea metabolismului ADN la linia SW501ASC și SW501ASI în diferite faze ale microsporogenezei.

Notă: a – *CycD3*; b – *PCNA*; c – *HIS1-3*; d – *H3.1*.

Gena *PCNA* (genă implicată în multe procese celulare, precum: replicarea, repararea ADN-ului și reglarea ciclului celular) la linia cu ASC a fost subexpresată în pachiten și faza de diviziuni, iar în următoarele faze ale ontogenezei microsporului nu a manifestat diferențe statistic semnificative, față de plantele fertile. La plantele cu ASI, de asemenea gena *PCNA* a fost subexpresată în pachiten, iar în faza de tetrade (FC=5,3) și microspor (FC=2,1) s-a estimat o creștere semnificativă ($p<0,05$), comparativ cu plantele fertile (Figura 4.1, b).

În studiul de față am obținut un *pattern* de expresie diferit al genelor histone cercetate în dependență de tipul de sterilitate. Astfel, la plantele cu androsterilitate indusă de aplicarea exogenă a giberelinei a plantelor fertile s-a obținut un profil similar de expresie a genelor *HIS1-3* și *H3.1* de supraexprimare la toate fazele microsporogenezei (Figura 4.1, c, d), cu cel

mai mare efect în faza de tetrade (*HIS1-3* – FC=5,4; *H3.1* – FC=10,9, $p<0,05$). Fapt ce ar sugera că acțiunea giberelinei perturbă cantitatea de transcript și induce dezechilibrul prin sinteza abundentă a histonelor și replicarea ADN-ului, care menține compactizarea corectă în cadrul cromozomilor.

La plantele cu ASC în primele două faze analizate (pachiten, diviziuni) gena *HIS1-3* a fost supraexpresată, iar în următoarele faze (tetrade, microspor) a fost subexpresată. Gena *H3.1* la plantele cu ASC asemănător celeilalte histone, în pachiten a avut un nivel al expresiei crescut semnificativ ($p<0,05$), comparativ cu plantele fertile, iar în următoarele faze ale dezvoltării microsporului gena dată a fost subexpresată.

Rezultatele obținute arată că în faza de pachiten setul de gene implicat în organizarea cromozomilor și reglarea metabolismului ADN, prezintă aceeași activitate transcripțională la ambele linii cu fenotip steril, și anume *CycD3* a manifestat o expresie în limita martorului, gena *PCNA* a fost subexpresată, iar histonele *HIS1-3* și *H3.1* – supraexpresate. Un caz aparte a fost supraexpresia celor patru gene la faza de tetrade la plantele cu androsterilitate indusă. O tendință comună în nivelurile de expresie la plantele cu ASI a fost observată la genele *PCNA* și *H3.1*.

Din totalul variantelor analizate (patru gene și patru faze ale microsporogenezei) la plantele cu ASC genele au manifestat 31,25% supraexprimare, 37,5% subexprimare și au avut efect nesemnificativ 31,25%, iar la plantele cu ASI profilul de expresie a indicat 75% supraexpresie, 6,25% subexpresie și cu efect nesemnificativ 18,75%, comparativ cu plantele fertile. Fapt ce ar demonstra formarea grăuncioarelor de polen sterile la linia SW501ASI și lipsa acestora la linia SW501ASC.

Ca orice organism viu, plantele trebuie să perceapă și să răspundă la o gamă largă de semnale biotice și abiotice, cu scopul de a optimiza creșterea și dezvoltarea lor. Una dintre cele mai importante provocări pentru celula vegetală este răspunsul la hormonii vegetali, un proces care implică reglarea corespunzătoare a funcției cromatinei și expresia genelor.

4.2. Studiul expresiei genelor cu rol în segregarea cromozomilor *MND1*, *AHP2*, *ASK1*, *DYAD*

Segregarea cromozomială în meioză este esențială pentru stabilitatea ploidiei asupra ciclurilor de viață reproductive. La plante, segregarea defectuoasă a cromozomilor provocată de mutații genetice sau de alți factori conduce la formarea gameților neechilibrați sau reduși, creând, respectiv, descendenți aneuploizi sau poliploizi.

În efortul de a descoperi noi principii care guvernează expresia genelor *AHP2* (necesară pentru formarea bivalentilor), *MND1* (cu rol important în formarea sinapsei și reparare ADN-ului în momentul recombinării meiotice), *DYAD* (implicată în coeziunea cromatidelor) și *ASK1* (necesară pentru separarea cromozomilor omologi) cu rol în segregarea cromozomilor, au fost integrate și analizate datele obținute la diferite faze de dezvoltare a microsporului la plantele cu androsterilitate citoplasmatică (ASC) și cu androsterilitate indusă (ASI).

Conform datelor din literatură, gena *MND1* este implicată în împerecherea cromozomilor și repararea structurii dublu-helix. Astfel, datele obținute în urma cuantificării genei date la plantele de floarea-soarelui, ar sugera că mecanismele de reglare responsabile

de inhibarea genei *MND1* în pachiten și faza de tetrade la ambele linii cu androsterilitate pot fi asociate cu distrugerea structurii ADN-ului, ulterior cu fragmentarea cromozomilor ce duc la sterilitatea masculină (Figura 4.2, a). Mai mult ca atât profilul de expresie al genei *MND1* a fost similar la plantele cu ASC și cele cu ASI, subexpresie în pachiten, tetrade și supraexpresie în faza de diviziuni, microspor.

Activitatea transcripțională pentru gena *AHP2* a fost similară pentru plantele cu ASC și ASI în pachiten (subexprimare) și în faza de diviziuni (supraexprimare, $FC=1,2$, care a fost considerat expresie în limita martorului pentru linia ASC), iar în fazele următoare profilul de expresie a fost diferit în dependență de tipul de sterilitate, astfel că la plantele cu ASC gena *AHP2* a fost subexpresată ($FC=-3,3$ – tetrade, $FC=-5,4$ – microspor, $p<0,05$), iar la plantele cu ASI aceasta a manifestat supraexpresie ($FC=2,4$ – tetrade, $FC=1,5$ – microspor, $p<0,05$), comparativ cu plantele fertile (Figura 4.2, b).

Analizând datele din literatură cu datele obținute în studiul dat putem sugera că supraexpresia genei *AHP2* la plantele cu ASI duce la apariția aberațiilor cromozomiale, ulterior la formarea polenului neviabil.

Studiul activității transcripționale a genei *ASK1* la floarea-soarelui la plantele cu ASC a evidențiat un nivel de expresie statistic nesemnificativ în faza de diviziuni, tetrade și microspor, însă în pachiten a fost remarcată o creștere de 1,6 ori ($p < 0.05$) comparativ cu plantele fertile (Figura 4.2, c).

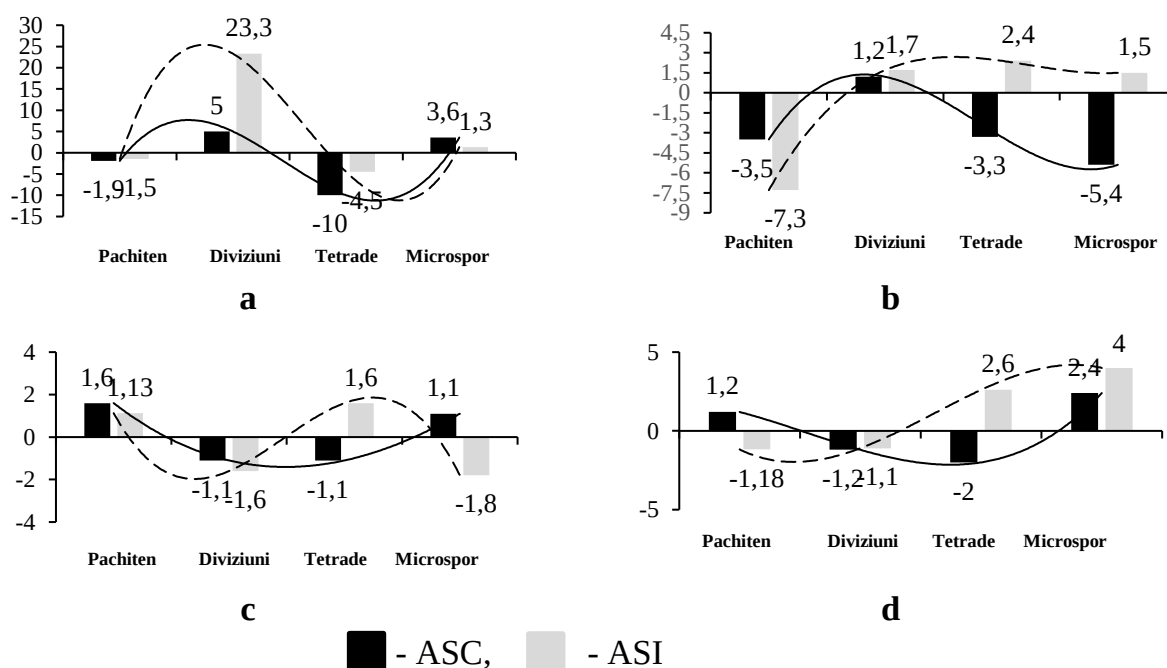


Fig. 4.2. Modificarea activității transcripționale experiență/control (*fold change*) a genelor în segregarea cromozomilor la linia SW501ASC și SW501ASI în diferite faze ale microsporogenezei.

Notă: a – *MND*; b – *AHP2*; c – *ASK1*; d – gena *DYAD*.

Aplicarea exogenă a giberelinei asupra plantelor fertile nu a modificat expresia genei *ASK1* în pachiten, însă în faza de diviziuni tratarea cu AG_3 a redus semnificativ expresia genei de 1,6 ori ($p<0.05$) (Figura 4.2, c), ceea ce ar fi putut perturba structura cromozomului și formarea ulterioară a grăuncioarelor de polen sterile.

O altă genă implicată în organizarea cromozomilor este gena *DYAD*, izolată la *Arabidopsis* necesară pentru finisarea procesului meiotic [24]. Studiile efectuate de către Agashe și colab., sugerează că gena *DYAD* acționează în mod specific în meioză având funcția în coeziunea cromatidelor [1].

Gena *DYAD*, implicată în coeziunea cromatidelor, în primele două faze ale microsporogenezei plantelor de floarea-soarelui cu sterilitate citoplasmatică și indusă, a manifestat o expresie care nu au depășit pragul semnificației statistice. În următoarea fază profilul de expresie a fost diferit în funcție de linie analizată, astfel că la linia SW501ASC gena *DYAD* a fost subexpresată ($FC=-2$, $p<0,05$), iar la linia SW501 tratată cu giberelină a fost supraexpresată ($FC=2,6$, $p<0,05$). Rezultatele obținute, la faza de microspor, au arătat nivelul de expresie a genei analizate crește semnificativ ($p<0,05$), atât la plantele cu androsterilitate indusă cât și cele cu androsterilitate citoplasmatică, acesta fiind de 4,0 și respectiv 2,4 ori mai mare decât nivelul detectat la plantele fertile (Figura 4.2, d).

Generalizând rezultatele obținute pentru activitatea expresiei genelor implicate în segregarea cromozomilor, s-a identificat un *fold change* între -10 și 23,3 ($p<0,05$). Cel mai mare efect s-a obținut la gena *MND1* în faza de diviziuni la plantele cu ASI ($FC=23,3$). La plantele cu androsterilitate citoplasmatică a fost observată o tendință similară de expresie a genelor *ASK1* și *DYAD* în toate fazele microsporogenezei.

Din totalul variantelor analizate (patru gene și patru faze ale microsporogenezei) la plantele cu ASC genele au manifestat 25,0% supraexpresie, 37,5% subexprimare și au avut efect nesemnificativ 37,5%, iar la plantele cu ASI profilul de expresie a indicat 43,75% supraexpresie, 31,25% subexpresie și cu efect nesemnificativ 25,0%, comparativ cu plantele fertile.

4.3. Evaluarea nivelului de expresie a genelor cu funcții în formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare

Pereții celulari la plante funcționează ca un suport structural, ce determină forma celulei și protejează celula împotriva stresului biotic și abiotic extern. Pe lângă menținerea integrității structurale prin rezistența la presiunea hidrostatică internă, peretele celular oferă flexibilitate pentru a susține diviziunea celulară, o barieră biochimică care permite diferențierea și una patologică și de mediu care apără împotriva stresului [32, 41].

Analiza expresiei genei *GSL12* la floarea-soarelui, implicată în biosinteza calozei, a pus în evidență o creștere statistic semnificativă ($p<0,05$) la plantele cu ASC, față de plantele fertile. Astfel, la plantele sterile determinate de prezența genei *orfH522*, gena *GSL12* a fost supraexpresată la toate fazele de dezvoltare a celulelor mamă polinice. Reieșind din faptul că la linia SW501ASC în preparatele citologice au fost identificate conglomerate de caloză în toate fazele microsporogenezei, aceasta ar explica supraexpresia genei *GSL12* la plantele cu androsterilitate citoplasmatică. Comparând datele din literatură cu rezultatele obținute în studiul dat, putem deduce că subexpresie genei *GSL12* în pachiten ($FC= -14,1$; $p<0,05$), faza de diviziuni ($FC= -2,5$; $p<0,05$) și tetrade ($FC= -2,3$; $p<0,05$) la plantele cu androsterilitate indusă de aplicarea exogenă a giberelinei duce la degradarea peretelui calozic și la formarea polenului steril (Figura 4.3, a).

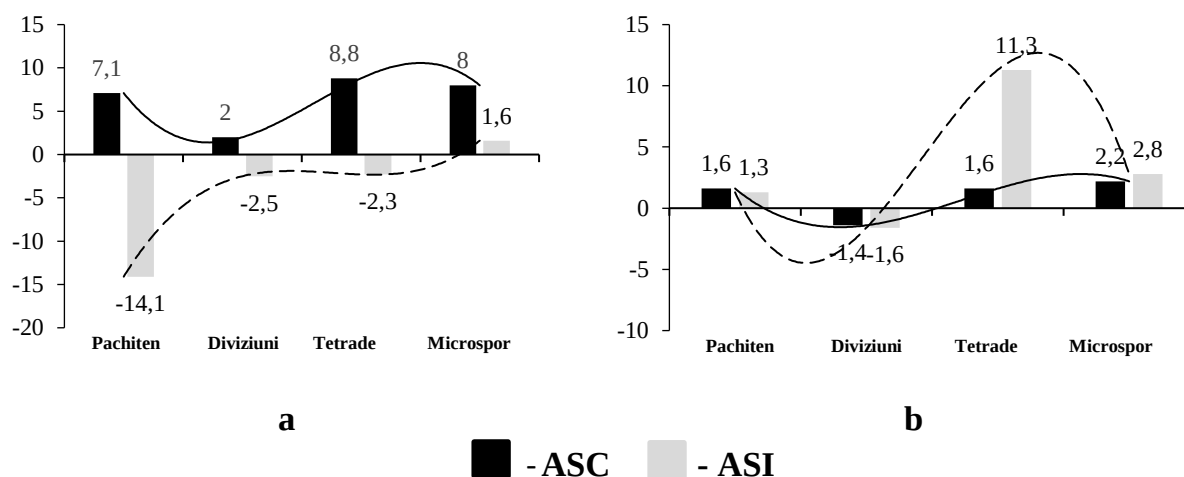


Fig. 4.3. Modificarea activității transcripționale experiență/control (*fold change*) a genelor în formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare la linia SW501ASC și SW501ASI în diferite faze ale microsporogenezei.

Notă: a – *GSL12*; b – *EXPA1*.

Generalizând aceste rezultate, putem confirma că la linia SW501ASC caloza nu se consumă din lipsa meiocitelor normale de aceea gena ce răspunde de biosinteza calozei este supraexpresată, iar la linia SW501+AG₃ inhibarea genei *GSL12* duce la formarea meiocitelor anormale din lipsa de sinteză a calozei. Cu toate acestea, nu se știe dacă acesta este singurul factor care contribuie la apariția androsterilității. Prin urmare, inducerea sterilității masculine la floarea-soarelui, oferă numai dovezi circumstanțiale că peretele calozic are o funcție vitală în microsporogeneză.

Rezultatele obținute în studiul dat, prezentate în figura 4.3b evidențiază similaritate totală a modificării activității transcripționale a genei *EXPA1* la plantele de floarea-soarelui cu ASC și ASI comparativ cu plantele fertile. Astfel, în pachiten, faza de tetrade și microspor gena dată a fost supraexpresată, însă în faza de diviziuni aceasta s-a inhibat. Cu toate acestea, la linia SW501ASC în pachiten și la linia SW501+AG₃ în faza de diviziuni, nivelul de expresie nu a atins pragul semnificației statistice ($p < 0,05$).

Conform datelor obținute de către alți autori, supraexpresia genei *EXPA1* la *Arabidopsis* duce la formarea plantulelor cu frunze mai mici și rădăcini mai scurte. Rezultatele noastre arată că la plantele de floarea-soarelui tratate cu AG₃ și cele cu androsterilitate citoplasmatică, de asemenea s-a indus activitatea transcripțională a genei date, care fenotipic prezentau antere mai mici și mai subțiri, comparativ cu plantele fertile. Astfel, s-ar putea explica faptul că nivelul de expresie mărit al genei *EXPA1* perturbă organizarea peretelui celular și duce la reducerea creșterii, nu la dezvoltare [15].

Luate împreună, datele noastre sugerează că, din totalul variantelor analizate (două gene și 4 faze ale microsporogenezei), la plantele cu ASC supraexpresie s-a manifestat în 87,5% din cazuri și statistic nesențificative au fost 12,5%, iar la plantele cu ASI 37,5% a fost supraexpresie, 50% – subexpresie și 12,5 – statistic nesemnificativ ($p < 0,05$). La plantele cu ASI ambele gene au manifestat tendință similară de expresie.

Sinteza rezultatelor obținute

În urma analizei comparative a rezultatelor obținute la nivel molecular și citologic au fost identificate diferite niveluri de expresie a genelor, care au fost corelate cu prezența aberațiilor cromozomiale, degradarea stratului tapetal, meiocite cu formă și structură degenerată și polen steril la plantele tratate cu AG₃.

În baza datelor obținute și a celor din literatura de specialitate a fost elaborată o schemă ipotetică, care descrie unele elemente de bază în implicarea genelor meiotice asupra inducerii androsterilității la floarea-soarelui (Figura 4.4).

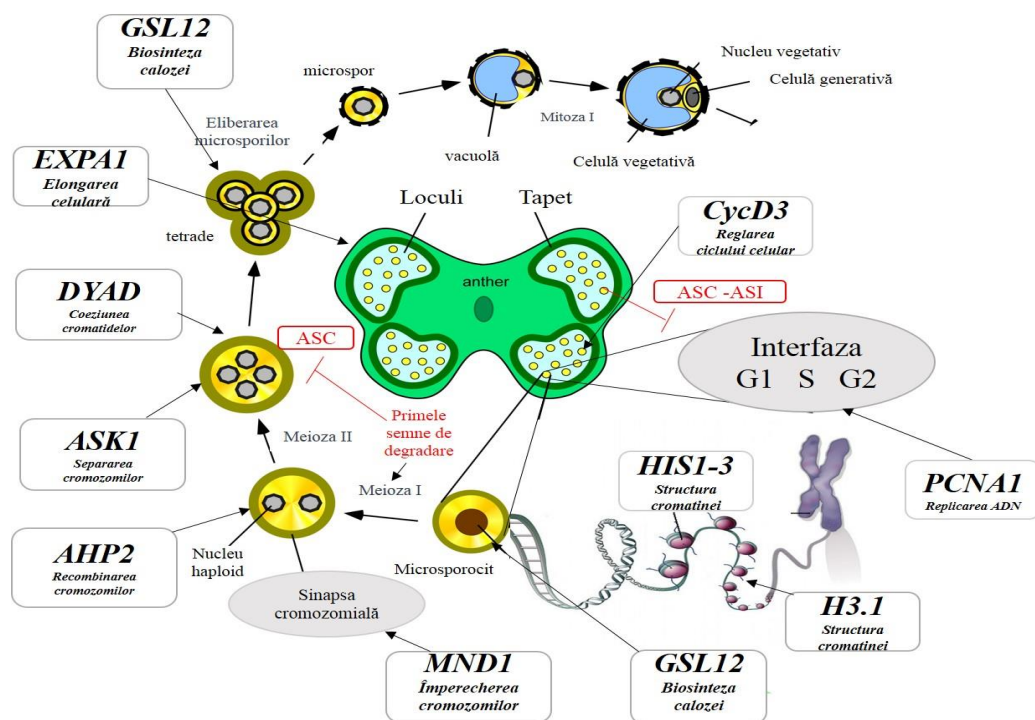


Fig. 4.4. Gene implicate în reglarea ciclului celular, segregarea cromozomilor și inducerea androsterilității la floarea-soarelui.

Supraexpresia unor gene la plantele tratate cu AG₃ la toate fazele studiate poate fi interpretată ca fiind:

- răspunsul organismului la înmulțirea erorilor de replicare asociate cu sterilitatea masculină la plante;
- rezultatul mutațiilor genice care mărește/diminuează sinteza proteinelor, în urma cărora se formează grăuncioare de polen neviabili sau lipsa acestora la liniile sterile.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu reprezintă un aspect de noutate și originalitate, deoarece conform datelor disponibile pentru genele *PCNA1*, *Cyclin D3*, *HIS1-3*, *H3.1*, *AHP2*, *MND1*, *SWI1/DYAD*, *ASK1*, *EXPA1* și *GSL12* din bazele de date NCBI și HeliaGene, nu sunt raportate asocieri între genele studiate și androsterilitatea indusă la floarea-soarelui.

Datele experimentale obținute confirmă ipoteza asocierii genelor care participă la reglarea meiozei, organizarea și formarea cromozomilor și activitatea peretelui/membranelor celulare, cu sterilitatea masculină la floarea-soarelui ca răspuns la acțiunea exogenă a giberelinei.

CONCLUZII GENERALE

Cercetările fenologice, histoanatomice, citogenetice și moleculare au pus în evidență efectul gametocid semnificativ al giberelinei (AG₃), manifestat prin inducerea fenotipică a androsterilității la floarea-soarelui, determinată de dereglarea procesului de microsporogeneză și microgametogeneză la diferite nivele de organizare.

1. Studiile histoanatomice ale plantelor fertile, cu androsterilitate citoplasmatică și androsterilitate indusă au evidențiat transformări selective și succesive ale dezvoltării gametofitului masculin în funcție de tipul de sterilitate. Astfel, la plantele cu ASI straturile epidermic și endoteciu au prezentat deformații cu diferit grad de severitate, iar statul tapetal a avut o formă distorsionată cu semne de colaps prematur. La plantele cu ASC efectul pronunțat de accelerare a degenerării țesuturilor microsporangiumului s-a evidențiat începând cu faza timpurie, iar în faza de tetrade au manifestat tendință accentuată de aglutinare, stratul tapetal a fost foarte hipertrofiat [49].
2. Investigațiile citogenetice ale plantelor cu ASI au relevat apariția unui număr sporit al aberațiilor cromozomiale (64%) și un conținut înalt (71,31%) de produse post-meiotice atipice precum monade, diade, triade și poliade cu efecte negative asupra gradului de fertilitate a polenului. La plantele cu ASC meiocitele au prezentat semne evidente de deteriorare în faza de pachiten cu degradare totală în următoarele faze studiate [12].
3. Analiza citologică a pus în evidență un grad înalt de sterilitate (88%) și prezența grăuncioarelor de polen goale, plasmolizate, cu aspect membranos și neuniform la plantele cu androsterilitate indusă și lipsa totală a polenului la plantele cu androsterilitate citoplasmatică ereditară [26].
4. Trei grupuri de gene implicate în microsporogeneză au manifestat 47,5% supraexpresie, 27,5% subexpresie și 25% efect nesemnificativ la plantele cu ASC și ASI, comparativ cu plantele fertile. A fost stabilită o tendință similară de expresie a genelor *CycD3*, *MND1* și *EXPA1* pe tot parcursul dezvoltării microsporului la ambele tipuri de sterilitate, a genelor *PCNA* și *H3.1* – la plantele cu ASI și a genelor *ASK1* și *DYAD*, *GSL12* și *EXPA1* – la plantele cu ASC.
5. Studiul profilului de expresie al genelor cu rol în organizarea cromozomilor și reglarea metabolismului ADN la plantele cu ASC a elucidat o dinamică aproximativ egală a activității transcripționale (supraexpresie 31,25%, subexpresie 37,5% și expresie neschimbată 31,25%), în timp ce la plantele cu ASI, 75% dintre genele menționate au manifestat un nivel semnificativ de supraexpresie, ceea ce a dus la destabilizarea echilibrului între sinteza abundentă a produselor de expresie și menținerea replicării ADN-ului pentru compactizarea corectă a cromozomilor.
6. Analiza comparativă a profilurilor de expresie a genei implicate în biosinteza calozei (*GSL12*), a permis identificarea supraexpresiei în toate fazele microsporogenezei la plantele cu ASC, care este corelată cu identificarea conglomeratelor de caloză în preparatele citologice, iar la plantele cu ASI formarea polenului steril poate fi asociată cu sinteza insuficientă a calozei prin inhibarea genei date în primele trei faze. În cazul genei *EXPA1* activitatea transcripțională sporită față de plantele fertile, a condus la remodelarea peretelui celular și modificarea dimensiunilor anterelor la plantele cu ASC și ASI [13].

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Datele obținute și expuse în teză sunt recomandate pentru a fi implementate în curriculumul universitar pentru studii superioare de licență (ciclul I) la disciplina Biologie celulară și Biologie moleculară la Departamentul Științe Biologice și Geonomice a Facultății Științe ale Naturii, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir” [12, 13, 14, 26, 27].
2. Primerii elaborați pentru determinarea nivelului de expresie a genelor implicate în procesul de microsporogeneză și androsterilitate citoplasmatică se recomandă spre utilizare în cercetările genetico-moleculare [13].

BIBLIOGRAFIE

1. Agashe B., Prasad C.K., Siddiqi I. Identification and analysis of *DYAD*: a gene required for meiotic chromosome organization and female meiotic progression in *Arabidopsis*. In: Development, 2002, vol. 129, p. 3935-3943.
2. Andronic L. Evidence of meiotic recombination in virus infected tomato. In: Buletinul AȘM, 2010, vol. 2(311), p. 8-15.
3. Arisha M.H., Shah S.N., Gong Z.H., et al. Ethyl methane sulfonate induced mutations in M2 generation and physiological variations in M1 generation of peppers (*Capsicum annuum* L.). In: Front Plant Science, 2015, vol. 6, p. 1-11.
4. Barbacaru N., Belousova G. Identificarea la porumb a unor transcripți specifici în profaza I care manifestă omologie cu gene de la drojdii. In: Cercetări de genetică animală și vegetală, 2000, vol. 5, p. 289 - 296.
5. Barbacaru N., Zamorzaeva I., Baca I., Chirvas A. Identificarea și analiza nivelului de expresie a genelor specific anterelor de tomate. In: Cercetări de genetică animală și vegetală, 2000, vol. 6, p. 275 - 282.
6. Bouquin T., Meier C., Foster R., et al. Control of Specific Gene Expression by Gibberellin and Brassinosteroid. In: Plant Physiology, 2001, vol. 127(2), p. 450-458.
7. Çetinbaş A., Ünal M. Anther Ontogeny and Microsporogenesis in *Helianthus annuus* L. (*Compositae*). In: Not. Sci. Biol., 2015, vol. 7(1), p. 52-56.
8. Cucereavii Aliona, **Nechifor Victoria**, Angela Port, Maria Duca. Expression of *CYCD3* gene in meiosis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Current Opinion in Biotechnology, Vol. 24, Supplement 1, (2013), S132.
9. Dafni A., Firmage D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. In: Plant Systematics and Evolution, 2000, vol. 222, p. 113-132.
10. Damasceno P.C., Pereira T.N.S., Freitas M., Pereira M.G. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. In: Caryologia, 2010, vol. 63, p. 229-263.
11. Davière J.M., Achard P. Gibberellin signaling in plants. In: Development, 2013, vol. 140(6), p. 1147-1151.
12. Duca M., **Nechifor V.**, Port A. Profilul citologic al diviziunilor meiotice la plantele de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă de gibereline. In: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științele Vieții, 2017, nr. 3(333), p. 106-114.

13. Duca M., Port A., **Nechifor V.** Comparative expression of *EXPA1* and *GSL12* genes in induced and cytoplasmic male sterile sunflower plants. Abstracts book of International Congress on oil and Protein Crops. May 20 – 24, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, p. 105.
14. Duca M., Port A., **Nechifor V.** Corelarea dimensiunii florilor tubulare și anterelor cu fazele microsporogenei și microgametogenezei la *Helianthus annuus* L. In: Simpozionul Științific Internațional, Agricultură modernă - realizări și perspective. Lucrări științifice, 2013, vol. 39, p. 59 - 63.
15. Gao X., Liu K., Lu Y. T. Specific Roles of *AtEXPA1* in Plant Growth and Stress Adaptation. In: Russian Journal of Plant Physiology, 2010, vol. 57(2), p. 241-246.
16. Gupta R., Chakrabarty S.K. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. In: Plant Signal Behav., 2013, vol. 8, p. 1-5.
17. Hedden P., Phillips A.L., Rojas M.C., et al. Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A Case of Convergent Evolution? In: J. Plant Growth Regul., 2001, vol. 20(4), p. 319-331.
18. Horner H.T. A comparative Light and Electron Microscopic Study of Microsporogenesis in Male-Fertile and Cytoplasmic Male-Sterile Sunflower (*Helianthus annuus*). In: Amer. J. Bot. 1977, vol. 64, nr. 6, p. 745-759.
19. Ivers D. R., Palmer R. G., Fehr W. R. Anther culture in soybean. In: Crop. Sci., 1974, vol. 14, p. 891-893.
20. Kasembele J.N.R. Phenotypic restoration of fertility in a male sterile mutant by treatment with gibberellic acid. In: Nature, vol. 1967, p. 668.
21. Kumar G., Dwivedi K. Induced polyploidization in *Brassica campestris* L. (*Brassicaceae*). In: Cytology and Genetics, 2014, vol. 48, p. 103-110.
22. Laveau J. H., Schneider C. Berville A. Microsporogenesis Abortion in Cytoplasmic Male Sterile Plants from *H. petiolaris* or *H. petiolaris fallax* Crossed by Sunflower (*Helianthus annuus*). In: Ann. Bot., 1989, vol. 64 (2), p. 137-148.
23. Maqbool S.B., Zhong H., Oraby H.F., et al. Transformation of oats and its application to improving osmotic stress tolerance. In: Methods Mol. Biol., 2009, p. 149-168.
24. Mercier R., Vezon D., Bullier E. Switch1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. In: Gene Dev., 2001, vol. 15, p. 859-1871.
25. Miralles D.J., Ferro B.C., Slafer G.A. Developmental responses to sowing data in wheat, barley and rapeseed. In: Field Crops Res., 2001, vol. 71, p. 211-223.
26. **Nechifor V.** Aspecte morfometrice ale meiocitelor și grăuncioarelor de polen la floarea - soarelui cu androsterilitate indusă. In: Revista Știința agricolă, 2017, nr. 2, p. 11-15.
27. **Nechifor V.** Controlul genetic al meiozei la plante. In: Studia Universitas, Seria Științe reale și ale naturii, 2013, 6(66), p.72-79.
28. Parra-Vega V., González-García B., Seguí-Simarro J.M. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). In: Acta Physiologiae Plantarum, 2013, vol. 35, p. 627–633.
29. Paun, L. The cytologic mechanism of male sterility in sunflower. In: Proc. of the 6th Inter. Sunfl. Conf., Bucharest, Romania, 1974, p. 249-257.
30. Rhee H.K., Cho H.R., Kim K.J. Comparison of pollen morphology in interspecific hybrid lilies after in vitro chromosome doubling. In: Acta Horticulturae, 2005, vol. 673, p. 639- 643.

31. Sato S., Peet M.M., Thomas J.F. Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. In: J. Exp. Bot., 53(371), 2002, p. 1187-1195.
32. Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses. In: Annu. Rev. Plant Biol., vol. 61, 2010, p. 263-289
33. Schneiter A.A., J.F. Miller. Description of Sunflower Growth Stages. In: Crop Sci., vol. 21, 1981, p. 901-903.
34. Shivanna K.R. Pollen biology and biotechnology. In: Science Publishers Inc., Enfield, 2003, p. 300-305.
35. Smart C. J., Moneger F., Leaver C.J. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. In: EMBO J., 1994, vol. 13, p. 8-17.
36. Spirova M. New data on male sterility in sunflower induced by gibberellic acid. In: Resteniev dni Nanki, 1975, vol. 12(1), p.10-17.
37. Swain S.M., Singh D.P. Tall tales from sly dwarves: Novel functions of gibberellins in plant development. In: Trends in Plant Sci., 2005, vol. 10, p.123-129.
38. Tamborindeguy C., Ben F., Jardinaud L. Mass cloning of differential and non-differential transcript-derived fragments from cDNA-AFLP experiments in sunflower. In: Plant Molecular Biology Reporter, 2004, vol. 22(2), p.165-171
39. Teixeira R.T., Knorpp C., Glimelius K. Modified sucrose, starch and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. In: J. Exp. Bot., 2005, vol. 56, p.1245-1253.
40. Toderaş L. Influenţa factorilor ecologici asupra sistemului reproductiv la plante. In: Autoreferat, 2002, p. 18-20.
41. Tucker M.R., Koltunow A.M. Traffic monitors at the cell periphery: the role of cell walls during early female reproductive cell differentiation in plants. In: Current Opinion in Plant Biology, 2014, vol. 17, p. 137-145.
42. Vasil I.K. Effect of kinetin and gibberellic acid on excised anthers of *Allium cepa*. In: Phytomorphology, 1957, vol. 7, p.138-49.
43. Vrânceanu A.V., Aspecte noi privind cultura florii-soarelui. In: Edit. Agro-Silvică, 1967a, p. 30-45.
44. Wang S., Zhang G., Song Q., 2015. Abnormal Development of Tapetum and Microspores Induced by Chemical Hybridization Agent SQ-1 in Wheat. In: PLoS One, 2015, vol. 10(3), p. 1-7.
45. Wu Y., Min L., Wu Z., Defective pollen wall contributes to male sterility in the male sterile line 1355A of cotton. In: Scientific Reports, 2015, vol. 5, p. 1-8.
46. Zenoni S., Fasoli M., Battista G., et al. Overexpression of *PhEXPA1* increases cell size, modifies cell wall polymer composition and affects the timing of axillary meristem development in *Petunia hybrida*. In: New Phytologist, 2011, vol. 191, p. 662-677.
47. Zerpa D.M., Comportamiento meiótico de la descendencia híbrida producida al transferir el carácter bisexual de *C. pubescens* a *C. stipulata*. In: Revista de la Facultad de Agronomía, 1980, vol. 11, p. 5-47.
48. Анащенко А.В. Особенности выращивания подсолнечника при химической кастрации. В: Селекция и семеноводство, 1971, № 2, с. 36-38.
49. Дука М.В., Порт А.И., Шестакова Т.А., **Некифор В.В.** Сравнительный анализ мейоза у стерильных и фертильных форм подсолнечника. БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пущинская школаконференция молодых ученых (Пущино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. с. 476.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE LA TEMA TEZEI

Articole în reviste științifice naționale

Categoria B

1. **Nechifor V.** Controlul genetic al meiozei la plante. În: Studia Universitas, Seria Științe reale și ale naturii, 2013, 6(66), p.72-79. ISSN 1857-1735.
0,81 c.a.
2. **Nechifor V.** Aspecte morfometrice ale meiocitelor și grăuncioarelor de polen la floarea-soarelui cu androsterilitate indusă. În: Revista Știința agricolă, 2017, nr. 2, p. 11-15.
0,38 c.a.
3. Duca M., **Nechifor V.**, Port A. Profilul citologic al diviziunilor meiotice la plantele de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă de gibereline. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2017, nr. 3(333), p. 106 – 114.
0,65 c.a.

Articole în culegeri de lucrări ale conferințelor internaționale în republică

1. **Duca, M., Port A., Nechifor, V.** Corelarea dimensiunii florilor tubulare și anterelor cu fazele microsporogenei și microgametogenezei la *Helianthus annuus* L. În: Materialele Simpozionului Științific Internațional „Agricultura modern – realizări și perspective”, dedicate aniversării a 80 de ani de la fondarea UASM, Lucrări științifice: Agronomie și ecologie, Chișinău, 2013, 39, p. 59-63.
0,40 c.a.

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe internaționale (peste hotare)

1. **Некифор, В.В.** Молекулярный анализ ключевых событий мейоза у стерильных и фертильных форм подсолнечника *Helianthus annuus* L. Сборник тезисов Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии». Пуцзино. 30 июля – 3 августа 2012 года. Стр. 84.
0,042 c.a.
2. Cucereavii A., **Nechifor V.**, Port, A., Duca, M. Expression of *CYCD3* gene in meiosis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Current Opinion in Biotechnology. 2013, 24(1), Suppliment, Proceedings of European Biotechnology Congress S132. ISSN 0958-1669. (IF: 8,04).
0,05 c.a.
3. Duca M., Port A., **Nechifor, V.**, Șestacova, T. Gene expression profiles of *Helianthus annuus* L. during male meiosis and hostpathogen interactions. Материалы 17-ой Международной Пуцзинской школы-конференции молодых ученых „Биология – наука XXI века”, 22 – 26 апреля 2013, г. Пуцзино, Россия, с. 84. ISBN 978-5-9903901-3-3.
0,04 c.a.
4. **Nechifor V.** Meiosis of fertile and sterile sunflower at the cytological and molecular level. Abstract book of the International Plant Breeding Congress, November 10-14, 2013, Antalya, Turkey, p. 507. ISBN 978-5- 9903901-3-3.
0,044 c.a.
5. **Nechifor V.**, Port A., Duca M. Correlation between flower bud size and developmental stage in sunflower (*Helianthus annuus* L.) microspores. Abstracts book of the IXth International Scientific Conference for Students and PhD Students „Youth and progress of biology”, April, 16-19, 2013, Lviv, p. 482.
0,053 c.a.
6. Дука М.В., Порт А.И., Шестакова Т.А., **Некифор В.В.** Сравнительный анализ мейоза у стерильных и фертильных форм подсолнечника. БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пуцзинская школа-конференция молодых ученых (Пуцзино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. с. 476.
0,052 c.a.
7. Maria DUCA, Angela PORT, **Victoria NECHIFOR**. Morphological peculiarities of development pollen grains in sunflower plants with gibberellin induced male sterility. Abstracts book of International Plant Breeding III Congress. October 15 - 19, 2017, Acapulco Hotel, Kyrenia, TRNC, p. 87.
0,06 c.a.
8. Maria DUCA, Angela PORT, **Victoria NECHIFOR**. Comparative expression of *EXPA1* and *GSL12* genes in induced and cytoplasmic male sterile sunflower plants. Abstracts book of International Congress on oil and Protein Crops. May 20 – 24, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, p. 105.
0,06 c.a.

ADNOTARE

Nechifor Victoria “Acțiunea giberelinei asupra microsporogenezei la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L)”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2018. Teza include introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 299 surse, volumul total de 132 pagini, 11 tabele, 42 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 12 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: *Helianthus annuus* L., microsporogeneză, giberelină, aberații cromozomiale, androsterilitate, expresia genelor.

Domeniul de studiu: Genetica vegetală.

Scopul prezentei lucrări constă în stabilirea rolului giberelinei (AG₃) în inițierea și reglarea diviziunii celulare în anterele de floarea-soarelui.

Obiectivele de cercetare: estimarea raportului de corelație a dimensiunii florilor tubulare și anterelor cu fazele microsporogenezei și microgametogenezei; determinarea particularităților histoanatomice de dezvoltare ale microsporangiului la plantele de floarea-soarelui fertile, cu androsterilitate citoplasmatică și indusă; evidențierea indicilor morfo-fiziologici a meiocitelor și microsporilor la plantele tratate și netratate cu giberelină; elucidarea particularităților citogenetice a diviziunii meiotice la floarea-soarelui; studiul expresiei unor gene implicate în microsporogeneză la floarea-soarelui sub influența giberelinei.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată a fost evaluată activitatea transcripțională a genelor *PCNA1*, *CycD3*, *HIS1-3*, *H3.1*, *AHP2*, *MND1*, *DYAD*, *ASK1*, *EXPA1* și *GSL12* implicate în procesul de reproducere la floarea-soarelui, care a permis corelarea *pattern*-ului de expresie cu prezența aberațiilor cromozomiale, degradarea stratului tapetal, meiocite cu formă și structură degenerată, polen steril la plantele cu ASI. Studiile histoanatomice și citogenetice au evidențiat aspecte noi privind dezvoltarea diferențiată a țesuturilor microsporangiului, pe parcursul microsporogenezei, la plantele cu androsterilitate indusă și cele cu androsterilitate citoplasmatică, comparativ cu plantele fertile. S-a demonstrat efectul gametocid al giberelinei prin scăderea dimensiunii anterelor, identificarea unui număr mare de aberații cromozomiale la plantele tratate și inhibarea totală a meiozei la plantele cu ASC. **Problema științifică importantă soluționată** constă în *elucidarea* rolului giberelinei în inițierea și reglarea diviziunii celulare în antere de floarea-soarelui, într-un sistem model (plante fertile, cu androsterilitate citoplasmatică și androsterilitate indusă), *fapt ce contribuie* la identificarea *pattern*-urilor de expresie diferențiată a genelor implicate în microsporogeneză în dependență de tipul de sterilitate, stabilirea fazei în care a fost perturbată meioza la plantele cu ASI ce a favorizat formarea grăuncioarelor de polen sterile și lipsa acestora la plantele cu ASC, *ceea ce duce* la clarificarea mecanismelor de inducere a androsterilității. **Importanța teoretică a lucrării.** Rezultatele prezentate aprofundează cunoștințele existente despre mecanismele histoanatomice și citologice ale tranziției de la sporofitul diploid la gametofitul haploid al plantelor de floarea-soarelui cu sterilitate masculină indusă și citoplasmatică. Cercetările vizează fundamentarea informațiilor despre acțiunea giberelinei asupra gradului de fertilitate la floarea-soarelui și a microsporangiului la plantele fertile și cu androsterilitate citoplasmatică și modelarea unei scheme ipotetice, care descrie elementele de bază în inducerea sterilității masculine la diferite etape de dezvoltarea a celulelor mamă polen. **Valoarea aplicativă.** Au fost implementate metodele de microscopie fonică și ultramicrotomare în Laboratorul de Genomică, care permit eficientizarea cercetării unor procese sau mecanisme corelate cu studiile moleculare. Studiul bioinformatic și molecular realizat prin metoda Real-Time PCR a permis identificarea unor gene implicate în microsporogeneză cu rol prioritar și potențial în androsterilitatea la floarea-soarelui. **Implementarea rezultatelor științifice.** Datele obținute și expuse în teză servesc material științifico-didactic în predarea cursului de Biologie moleculară și Biologie celulară. Primerii specifici, elaborați în baza secvențelor EST din baza de date NCBI, pentru studiul expresiei a 10 gene la plantele de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă și citoplasmatică sunt utilizați în cadrul Centrului Genetică Funcțională al Universității de Stat „Dimitrie Cantemir” și sunt recomandați pentru cercetări genetico-moleculare ulterioare.

АННОТАЦИЯ

Некифор Виктория «Влияние гиббереллина на микроспорогенез подсолнечника (*Helianthus annuus* L.)» диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинев, 2018. Работа включает введение, четыре главы, общие выводы и рекомендации, библиографию из 299 источников, 132 страниц общего объема, 42 рисунков и 11 таблиц. Полученные результаты отражены в 12 научных публикациях.

Ключевые слова: *Helianthus annuus* L., микроспорогенез, гиббереллин, хромосомные aberrации, цитоплазматическая мужская стерильность, экспрессия генов.

Область исследования: генетика растений.

Целью данной работы является выявление роли гиббереллина (ГК₃) в инициации и регуляции процессов клеточного деления в пыльниках подсолнечника.

Задачи исследования: оценка коэффициента *корреляции* размера *трубчатых цветков* и пыльников с фазами микроспорогенеза и микрогаметогенеза; определение гистоанатомических особенностей в развитии микроспорангиев у фертильных растений подсолнечника, растений с цитоплазматической и индуцированной мужской стерильностью; выявление морфо-физиологических параметров микроспороцитов и микроспор у растений обработанных и необработанных гиббереллином; разъяснение цитогенетических особенностей мейотического деления у подсолнечника; изучение профиля экспрессии генов, участвующих в микроспорогенезе подсолнечника под влиянием гиббереллина.

Новизна и научная оригинальность. Впервые была проанализирована транскрипционная активность генов *PCNA1*, *Cyclin D3*, *HIS1-3*, *H3.1*, *AHP2*, *MND1*, *DYAD*, *ASK1*, *EXPA1* и *GSL12*, участвующих в процессе размножения подсолнечника, что позволило коррелировать профиль экспрессии генов с наличием хромосомных aberrаций, деградацией тапетума, появлением мейоцитов с разрушенной формой и структурой, образованием стерильной пыльцы у растений с индуцированной стерильностью. Гисто-анатомические и цитогенетические исследования выявили новые аспекты дифференциального развития тканей микроспорангия в ходе микроспорогенеза у растений с индуцированной и цитоплазматической мужской стерильностью в сравнении с фертильными растениями. Было продемонстрировано гаметоцидный эффект гиббереллина, проявляющийся уменьшением размеров пыльников, присутствием большого числа хромосомных aberrаций у обработанных растений и полной ингибцией мейоза у растений с ЦМС. **Решенная научная проблема** заключается в *выявлении* роли гиббереллина в иницировании и регуляции клеточного деления в пыльце подсолнечника в модельной системе (фертильные растения, растения с цитоплазматической и индуцированной мужской стерильностью), что *способствует* определению дифференцированных профилей экспрессии генов, участвующих в микроспорогенезе, в зависимости от типа стерильности, идентификации фазы в которой был нарушен мейоз у растений с индуцированной стерильностью, что привело к образованию стерильной пыльцы, и отсутствию таковой у растений с ЦМС, что *привело* к выяснению механизмов индукции мужской стерильности. **Теоретическая значимость.** Представленные результаты углубляют существующие знания об гистоанатомических и цитологических механизмах перехода от диплоидного спорофита к гаплоидному гаметофиту растений подсолнечника с цитоплазматической и индуцированной мужской стерильностью. В исследовании основное внимание уделяется действию гиббереллина на степень фертильности подсолнечника и микроспорангиев в фертильных растениях и растениях с ЦМС и моделированию гипотетической схемы, описывающей основы индуцирования мужской стерильности на разных стадиях развития материнских клеток пыльцы. **Прикладная ценность работы.** Были внедрены методы фотонной микроскопии и микрофотографирования в Лаборатории Геномики, которые позволяют более эффективно исследовать процессы или механизмы, коррелирующие с молекулярными исследованиями. Биоинформационное и молекулярное исследование с помощью ПЦР в реальном времени позволили идентифицировать гены, участвующие в микроспорогенезе, с приоритетной и потенциальной ролью в мужской стерильности у подсолнечника. **Внедрение научных достижений.** Полученные и представленные в диссертации данные служат научно-дидактическим материалом для обучения курсу молекулярной и клеточной биологии. Специфические праймеры, разработанные на основе последовательностей EST из базы данных NCBI для изучения экспрессии 10 генов у растений подсолнечника с индуцированной и цитоплазматической мужской стерильностью, используются в Центре Функциональной Генетики, ГУ „Дмитрий Кантемир” и рекомендуются для будущих генетических и молекулярных исследований.

ANNOTATION

Nechifor Victoria **The influence of gibberellins on the microsporogenesis at sunflower (*Helianthus annuus* L.)**", PhD in Biological Sciences, Chişinău, 2018. The thesis includes introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 299 sources, total volume of 132 pages, 11 tables, 42 figures. The obtained results are published in 12 scientific papers.

Key words: *Helianthus annuus* L., microsporogenesis, gibberellin, chromosome aberrations, androsterility, gene expression.

Field of study: Plant genetics.

The purpose of the research: the goal of this work is to establish of the role of gibberellin (GA₃) in initiation and regulation of cell division in anthers of sunflower.

Objectives of the thesis: to estimate the correlation of the tubular flowers size and anthers with microsporogenesis phases and microgametogenesis; to determine the histoanatomical peculiarities of development of microsporangium in the plants of fertile sunflower with cytoplasmic and induced androsterility; to recognize the morpho-physiological indices of meiocytes and microspores in treated and untreated plants with gibberellin; to elucidate the cytogenetic peculiarities of the meiotic division in sunflower; to study the expression of some genes involved in sunflower microsporogenesis under the influence of gibberellin.

Scientific novelty and originality. For the first time the transcriptional activity of the genes *PCNA1*, *Cyclin D3*, *HIS1-3*, *H3.1*, *AHP2*, *MND1*, *DYAD*, *ASK1*, *EXPA1* and *GSL12* involved in the reproduction process of sunflower, which allowed the correlation of the pattern of expression with the presence of chromosome aberrations, degradation of the tapetal layer, meiocytes with degenerated shape and structure, sterile pollen in plants with IMS and their lack of in those with CMS have been evaluated. Histoanatomical and cytogenetic studies have highlighted new aspects of differentiated development of microsporangium tissues during microsporogenesis in induced male sterility plants and those with cytoplasmic androsterility compared to fertile sunflower plants. The gametocidal effect of gibberellin was demonstrated by diminishing anthers, was identified a large number of chromosomal aberrations in treated plants and total inhibition of meiosis in CMS. **The most important solved scientific problem** consists in explanation of the gibberellins role in initiating and regulating the cell division in the anther of sunflower, in a model system (fertile plants, with cytoplasmic male sterility and induced androsterility) that contributes to explanation the patterns of differentiated expression of genes involved in microsporogenesis depending on the type of sterility, identification of the phase in which meiosis was disrupted in plants with IMS through the formation of sterile grains of pollen and lack thereof in plants with CMS, which allowed clarification of the mechanisms of induction of androsterility. **The theoretical significance.** The results presented extend the existing knowledge of the histoanatomical and cytological mechanisms of the transition from diploid sporophyte to the haploid gametophyte of sunflower plants with induced and cytoplasmic male sterility. Research is aimed at substantiating the information about the action of gibberellin on the fertility in sunflower and microsporangium in fertile plants and cytoplasmic androsterility and development of a hypothetical scheme, which would describe the basic elements of male sterility induction at different stages of the pollen mother cells development. **The applied value of the work.** The methods of photonic microscopy and ultramicrotation have been implemented in the Laboratory of Genomics that contribute efficient investigation of the processes or mechanisms related to molecular studies, have been appropriated. The bioinformatical and molecular, via Real-Time PCR method, study provided for the identification of genes involved in microsporogenesis with a priority and potential role in the androsterility of sunflower. **Implementation of scientific results.** The data obtained and exhibited in the thesis serve as scientific material during teaching of courses on molecular biology and cellular biology. Specific primers developed from EST sequences of the NCBI database, with the purpose of investigation of the expression of 10 genes from sunflower plants with induced and cytoplasmic androsterility are applied in the Centre Functional Genetics of State University "Dimitrie Cantemir" and are recommended for implementation in further genetical-molecular investigations.

NECHIFOR VICTORIA

**ACȚIUNEA GIBERELINEI ASUPRA MICROSPOROGENEZEI LA
FLOAREA-SOARELUI (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

162.01. GENETICĂ VEGETALĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 28 iunie 2018
Hârtie ofset. Tipar ofset.
Coli de tipar: 2,0

Formatul hârtiei 60x84 1/16
Tiraj ex. 50
Comanda nr.52

“PRINT-CARO” SRL, str. Astronom N. Donici, Chișinău