

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

Cu titlu de manuscris
C.Z.U. 633.854.78:631.523(043.2)

NECHIFOR VICTORIA

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

162.01. GENETICĂ VEGETALĂ

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific

DUCA Maria,

doctor habilitat în științe biologice,
profesor universitar,
academician

Autor

NECHIFOR Victoria

CHIȘINĂU, 2018

© Nechifor Victoria, 2018

CUPRINS

ADNOTĂRI (română, engleză, rusă).....	5
LISTA ABREVIERILOR.....	8
INTRODUCERE.....	9
1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND MICROSPOROGENEZA LA PLANTE.....	14
1.1. Genetica și fiziologia dezvoltării reproductive la plante.....	14
1.1.1. Meioza și grăuncioarele de polen: aspecte celulare și subcelulare.....	15
1.1.2. Controlul genetic al meiozei la plante.....	20
1.1.3. Mutanții meiotici: identificarea genelor cu funcții în meioză.....	22
1.2. Rolul fitohormonilor în dezvoltarea reproductivă.....	30
1.2.1. Interconexiuni fitohormonale în reglarea creșterii și diferențierii anterelor.....	31
1.2.2. Aspecte funcționale ale giberelinelor în formarea gameților masculini.....	33
1.2.3. Androsterilitatea citoplasmatică la plantele de cultură.....	35
1.3 Concluzii la capitolul I.....	41
2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE.....	42
2.1. Caracteristica materialului de cercetare.....	42
2.2. Metode de cercetare.....	43
2.2.1. Analiza macroscopică.....	42
2.2.2. Metode microscopice de cercetare.....	44
2.2.3. Tehnici de analiză moleculară.....	46
2.2.4. Proiectarea <i>primeri</i> -lor specifici genelor de interes.....	47
2.2.5. Prelucrarea statistică a datelor experimentale.....	48
2.3. Concluzii la capitolul 2.....	49
3. PARTICULARITĂȚILE MICROSPOROGENEZEI LA LINIILE IZOGENE DE FLOAREA-SOARELUI.....	50
3.1. Identificarea fazelor microsporogenezei și microgametogenezei.....	50
3.2. Histoanatomia microsporangiumului la plantele de floarea-soarelui.....	54
3.3. Profilul citologic al diviziunii meiotice la liniile izogene de floarea-soarelui.....	60
3.4. Concluzii la capitolul 3.....	68
4. ACTIVITATEA TRANSCRIȚIONALĂ A UNOR GENE CU ROL ESENȚIAL ÎN MICROSPOROGENEZĂ LA FLOAREA-SOARELUI.....	69
4.1. Principii de selectare a genelor de interes.....	69
4.2. Gene implicate în organizarea cromozomilor și reglare a metabolismului ADN.....	73

4.2.1. Caracteristica bioinformatică a genelor <i>CycD3</i> , <i>PCNA1</i> , <i>HIS1-3</i> , <i>H1.3</i>	73
4.2.2. Analiza rezultatelor de expresie.....	79
4.3. Studiul expresiei genelor cu rol în segregarea cromozomilor <i>MND1</i>, <i>AHP2</i>, <i>ASK1</i>, <i>DYAD</i>.....	83
4.3.1. Caracteristica bioinformatică a genelor.....	84
4.3.2. Analiza rezultatelor de expresie.....	89
4.4. Evaluarea nivelului de expresie a genelor cu funcții în formarea și activitatea membranelor celulare.....	93
4.4.1. Caracteristica bioinformatică a genelor <i>EXPA1</i> , <i>GSL12</i>	94
4.4.2. Analiza rezultatelor de expresie.....	96
4.5. Concluzii la capitolul 4.....	101
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	103
BIBLIOGRAFIE.....	105
ANEXE.....	127
Anexa 1. Act de implementare a rezultatelor științifice în instruire.....	127
Anexa 2. Act de implementare a rezultatelor științifice în ameliorare.....	128
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	129
CV-UL AUTORULUI.....	130

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 lucrării 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 microsporogeneza 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 microsporogeneza 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 implimentate 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 microsporogeneza 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 морфофизиологических 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 consists in estimation 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.

LISTA ABREVIERILOR

ABA – acid abscisic
AG₃ – acid giberelic
AIA - acid indolil acetic
AJ – acid jasmonic
AS – acid salicilic
ASC – androsterilitate citoplasmatică
ASI – androsterilitate indusă
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
BR – brasinosteroid
CDK – ciclin dependent kinaze
CMP – celulă mamă polinică
DEPC – Diethylpyrocarbonate
EST– Expressed Sequence Tags (Secvențe expresate marcate)
ET – etilenă
FC – fold change
IGFPP – Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor
MO – microscopie optică
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NT - nucleotide
Pb – perechi de baze
PCNA - Proliferating cell nuclear antigen
PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacția de Polimerizare în Lanț)
RE – reticul endoplasmatic
SM – sterilitate masculină
TAE – Tris-acetate-EDTA
TBE – Tris-borate-EDTA
UV – lumina ultravioletă

INTRODUCERE

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 [92]. La alge, ciuperci și plantele superioare s-au stabilit anumite relații între conținutul acestui hormon și sterilitate precum și rolul esențial în reglarea androsterilității [99]. Astfel, tratarea exogenă cu gibereline restaurează androfertilitatea la plantele sterile [126] și anume aceste substanțe induc sterilitatea masculină (SM) la plantele fertile [217], dereglând derularea normală a programului genetic al microsporogenezei. În aspect practic inducerea androsterilității (ASI) se utilizează pentru determinarea capacității combinative generale și capacității combinative specifice a liniilor de floarea-soarelui, iar în aspect teoretic – pentru identificarea unor particularități fundamentale ale microsporogenezei.

Întrucât mecanismele moleculare ale androsterilității citoplasmatică (ASC) reprezintă rezultatul interacțiunii genice (nucleu), citoplasmatică (mitocondrii) și fitohormonale, iar aplicarea AG₃ contribuie la inducerea sterilității masculine [217] ne-am propus să efectuăm o serie de cercetări citologice și genético-moleculare asupra plantelor tratate exogen cu gibereline la toate fazele de dezvoltare a microsporilor la nivel structural, citogenetic și genético-molecular.

La plantele superioare fitohormonii endogeni sunt implicați în evocație, sporogeneză și în manifestarea sexului [92] - atât la nivelul expresiei genelor cât și la nivel de organism [223].

Acțiunea stimuloare 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 [57]. 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. [28].

În plan mondial cercetările de până acum au clarificat o bună parte din problemele esențiale ale androsterilității citoplasmatică la floarea-soarelui. În același timp, nu au fost determinate aspectele structurale și citogenetice comparative ale microsporogenezei la *Helianthus annuus* cu sterilitate masculină indusă de către giberelină și cea citoplasmatică. 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 [13], tomate [6,14] și triticale [233].

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 lucrării 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 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 implimentate 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.

Aprobarea rezultatelor

Rezultatele expuse în teză au fost prezentate, discutate și aprobate la Ședințele Consiliului Științific al IGFPP și Consiliul Științific al Centrului de Genetică Funcțională, UnAȘM, precum și în cadrul următoarelor întruniri științifice: 16-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 16-21 апреля 2012); Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Пущино, 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 Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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).

Sumarul compartimentelor tezei

Lucrarea cuprinde: adnotare prezentată în limbile: română, rusă și engleză, lista abrevierilor, introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie, declarația privind asumarea răspunderii și CV. Teza de doctor este expusă pe 132 pagini, conținutul completat cu 11 tabele și 42 figuri. Rezultatele obținute sunt reflectate în 12 lucrări științifice.

Introducerea prevede informația științifică privind actualitatea și importanța temei abordate, scopul și obiectivele investigațiilor, inovația științifică a rezultatelor obținute, semnificația teoretică și aplicativă a lucrării, aprobarea investigațiilor, structura și volumul tezei.

Capitolul 1. ”Considerații generale privind microsporogeneza la plante” include datele privind sinteza analitică a studiilor științifice naționale și mondiale în acest aspect și expunerea sugestiilor proprii. Aprofundarea cunoștințelor referitor la particularitățile morfo-fiziologice și genetice în microsporogeneză și rolul fitohormonilor în inducerea sterilității la plante. O înțelegere mai profundă a funcționării genelor implicate în meioză și în post-meioză la plante va facilita elaborarea strategiilor mai eficiente de ameliorare. În cadrul capitolului, o atenție deosebită a fost acordată studiului microsporogenezei la nivel molecular și acțiunea giberelinelor asupra acestui proces.

Capitolul 2. ”Material și metode de cercetare” cuprinde informația privind caracteristica și condițiile de cultivare a materialului biologic pentru cercetare. Conține descrierea metodologiei utilizate pentru realizarea studiului: metode microscopice (fotonică), de ultramicrotomare, de analiză morfometrică a microfotografiilor, metode de biologie moleculară (extragerea ARN – ului, cunțificarea și electroforeză) și determinarea expresiei genelor a fost realizată prin PCR cantitativ precedat de transcripția inversă, utilizând ARN – ul obținut de la plantele de floarea-soarelui martor și supuse acțiunii exogene a giberelinei.

Capitolul 3. "Particularitățile microsporogenezei la liniile izogene de floarea-soarelui" include rezultatele privind caracteristicile histoanatomice a anterelor la plantele fertile, cu androsterilitate indusă și androsterilitate citoplasmatică realizată prin analiza secțiunilor semifine ale anterelor. Rezultatele obținute pun în evidență structura tipică și diferențiată a anterei și a straturilor acesteia: epidermă, endoteciu și stratul median. Analiza microscopică, a fazelor de dezvoltare a microsporului ce duc la sterilitatea citoplasmatică prin influența exogenă a fitohormonului giberelina, a evidențiat delimitarea parametrilor temporali și spațiali, care au ca rezultat degenerarea microsporilor și a polenului. Sunt determinate modificările morfometrice ale celulelor mamă polen, frecvența aberațiilor cromozomiale la diferite faze ale meiozei, care ulterior rezultă în formarea monadelor, triadelor sau poliadelor și viabilitatea grăuncioarelor de polen, ca rezultat al inducerii androsterilității prin aplicarea exogenă a AG₃. În concluzii la capitol se rezumă valoarea aplicativă a rezultatelor obținute și perspectivele utilizării datelor obținute în programele de ameliorare.

Capitolul 4. "Activitatea transcripțională a unor gene cu rol esențial în microsporogeneză la floarea-soarelui" conține datele despre nivelul de expresie a genelor *PCNA1*, *Cyclin D3*, *HIS1-3* și *H3.1* (organizarea cromozomilor, reglarea replicării și a metabolismului ADN), *AHP2*, *MND1*, *SWI1/DYAD*, *ASK1* (recombinarea ADN-ului, formarea chiasmelor, coeziunea cromatidelor surori, segregarea cromozomială), *EXPA1* și *GSL12* (formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare) la plantele de floarea-soarelui fertile, cu androsterilitate indusă și citoplasmatică.

Utilizarea metodei Real – Time PCR a relevat dinamica expresiei genelor implicate în diferite stadii ale microsporogenezei. Studiile la nivel molecular al procesului meiotic contribuie cu informații noi în elucidarea fenomenului de inducere a sterilității citoplasmatică masculine la floarea-soarelui.

Compartimentul **Concluzii generale** și **Recomandări practice** este dedicat concluziilor studiului de față și a posibilităților de implementare în practică a rezultatelor obținute.

1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND MICROSPOROGENEZA LA PLANTE

Microsporogeneza este un proces important în reproducerea plantelor, care include mai multe etape de dezvoltare, de la celule sporogene la microspori. Dezvoltarea țesuturilor anterei, morfologia meiocitelor și stabilitatea meiozei reprezintă particularitățile ce stau la baza formării grăuncioarelor de polen fertile [154]. Perturbarea oricărei etape ale acestui proces complex, datorită factorilor endogeni și exogeni, poate afecta fertilitatea gameților masculini. În funcție de severitatea anormalităților pot fi cauzate modificări neînsemnate, care nu afectează fertilitatea sau pot induce sterilitatea totală [82].

1.1. Genetica și fiziologia dezvoltării reproductive la plante

Gametogeneza la plantele cu flori de multe ori este extrem de sensibilă la factorii de mediu și endogeni. Majoritatea produselor alimentare, de origine vegetală, sunt rezultatul reproducerii sexuate ale plantelor superioare, înțelegerea modului în care diferite plante suportă factorii de stres în timpul fazei gametofitice este esențială în gestionarea viitoare a productivității agricole [50]. O anteră tipică cuprinde patru microsporangii alungite și este atașată la receptaculul floral de un filament cilindric, alungit și subțire. Fiecare teacă a anterei conține două microsporangii care devin confluențe la maturitate datorită ruperii secțiunii dintre ele. Într-o secțiune transversală a unei anterei tinere se află o masă de celule meristemice omogene delimitate la exterior de o epidermă. Ea devine în scurt timp cu patru lobi și cu rânduri de celule hipodermale diferențiate în fiecare lob, din cauza dimensiunii lor mai mari se evidențiază ușor alungirea radială și nucleii devin profund colorați. Într-o secțiune longitudinală a anterei aceste rânduri de celule apar ca o placă verticală, în majoritatea cazurilor sunt prezente mai multe straturi groase. Aceste celule constituie țesutul arhesporial, care se divide pentru a forma un strat parietal primar spre exterior și un strat sporogen primar spre interior. Celulele sporogene primare, fie direct, funcționează ca celule mamă polinice, fie sunt supuse diviziunii mitotice în continuare, cu scopul de a forma un număr mare de celule sporogene. Dezvoltarea maximă a endoteciului este finisată atunci când antera matură este gata de a se deschide brusc și de a elibera rezerva de grăuncioare de polen [55].

Celulele din stratul de mijloc sunt în general efemere și ca regulă devin aplatisate și zdrobite în timp, începând cu meioza celulelor arhesporiale. În unele cazuri, unul sau mai multe straturi de mijloc pot persista și simula celulele endoteciale sau tapetale. În antere, stratul tapetal este de obicei format din țesutul parietal. O cale rară întâlnită de formare a tapetului reprezintă sterilizarea parțială a țesutului sporogen, aceasta fiind descoperită la câteva plante: *Antirrhinum majus* L. [210], *Pulsatilla grandis* Wender, *Gentiana cruciata* L. și *Impatiens glandulifera* Am. [218].

Studiul dezvoltării anterei la angiosperme a durat mai mult de un secol și a oferit o bază stabilă pentru activitatea ulterioară în domeniile de fiziologie și, mai recent, în biologia moleculară. Pentru investigații fiziologice și moleculare este necesară o metodă nedistructivă care prevede stadiul microsporogenezei în anteră, timp ce aceasta este încă închisă în mugurele floral. Pentru mai multe plante, aceasta a dus la stabilirea relațiilor alometrice între creșterea mugurelui floral, lungimea anterei și stadiul microsporogenezei [187]. Anterele într-un buton floral pot fi mai mult sau mai puțin într-o etapă identică de dezvoltare la un moment dat. Începând cu lucrările lui Erickson [71] un mare accent a fost pus pe corelarea dintre lungimea butonului floral și etapele meiozei sau dezvoltarea polenului. În mugurii floralii de *Lilium longifirum* Thunb., odată ce ating aproximativ 10 mm în lungime (până la o zi sau două înainte de anteză) atunci când floarea este de aproximativ 150 mm lungime, creșterea în lungime este exponențială, adică logaritmul lungimii mugurilor este o funcție liniară în timp, și prin urmare, servește ca un "indice de dezvoltare" convenabil și precis. Gradul de sincronie la *Lilium turneul* L. este destul de mare pentru etapele meiotice și destul de înalt în momentul mitozei microsporului [27]. Foarte bine este cunoscut faptul că dezvoltarea între celulele arhesporiale sau a microsporilor din cadrul unei antere și între diferite anterele ale unui singur buton floral este sincronă [241, 242], dar de asemenea, se știe că, la plante, cum ar fi *Lilium*, unde anterele sunt neobișnuit de lungi există un gradient meiotic de la bază până la vârf [243].

Studierea controlului genetic al meiozei la plante va contribui la înțelegerea completă a mecanismelor micro- și macrosporogenezei, va deschide noi perspective pentru manipularea biotehnologică a reproducerii la plante, le va permite amelioratorilor să creeze noi variante de gene pentru hibridi de calitate superioară sau să folosească genele meiotice în programele de ameliorare ce vizează apomixisul și poliploidizarea. Cu toate că meioza joacă un rol central în reproducerea sexuată, mecanismele moleculare complexe prin care se realizează acest fenomen nu sunt elucidate pe deplin.

1.1.1. Meioza și grăuncioarele de polen: aspecte celulare și subcelulare

Ciclul de viață al plantelor este alcătuit din două generații: sporofitică (diploidă), și gametofitică (haploidă) [19]. La plantele cu semințe, generația gametofitică începe dintr-un spor din care ulterior se dezvoltă prin diviziuni mitotice o structură multicelulară. Prin urmare, generația sexuată este de scurtă durată și depinde nutritiv de sporofit, iar structurile morfologice, cu excepția sacului embrionar și a grăuncioarelor de polen, aparțin generației sporofitice [229]. Dezvoltarea microsporogenezei și microgametogenezei se împarte în patru etape:

Etapa I - Sporangiu și celulele arhesporiale. Antera tânără formată complet este constituită din patru sporangii, două dintre ele în regiunile ventralo-laterale, iar celelalte în regiuni dorsalo-laterale. Celulele epidermice, precum și straturile endoteliale și medii, prezintă celule vacuolate cu nuclee vizibile. Epidermul și endoteciul sunt nediferențiate în această etapă. Celulele straturilor medii conțin în citoplasmă nuclee cu porțiuni de cromatină condensată și vacuole mici. Celulele tapetale sunt alungite radial, multinucleate cu nucleoli evidenți, citoplasma este densă, cu prezența vacuolelor mici. Celulele arhesporiale sunt cele mai mari celule ale sporangiului, nucleele sunt hialine, cu nucleoli vizibili și câteva porțiuni de cromatină condensată, citoplasma prezintă granule lipidice de stocare care, prin oxidarea lor, asigură energia necesară declanșării procesului meiotic [229].

Etapa II - Meioza și sfârșitul generației sporofitice. Formarea peretelui celular (și dizolvarea), în timpul și după divizarea meiotică reprezintă o caracteristică unică a meiozei masculine la plante. La începutul meiozei are loc depunerea unui perete de caloză pe partea interioară a peretelui primar al celulei mamă androspore. Caloza reprezintă un polizaharid care este implicat în multiple etape de dezvoltare a grăuncioarelor de polen ca un component structural. Procesul de sinteză și degradare a calozei este înalt reglat în timpul dezvoltării polenului. La petunie au fost caracterizate câteva forme mutante care determină formarea și degradarea peretelui calozic, sugerând faptul că timpul de formare și distrugere a peretelui calozic este important pentru microsporogeneză și dezvoltarea polenului [177]. La tutunul transgenic, α -1,3-glucanaza, expresată în celulele tapetale, duce la dizolvarea prematură a peretelui calozic al microsporului, cauzând sterilitatea masculină. Peretele calozic temporar joacă multe roluri importante în dezvoltarea polenului. Acest perete poate fi temporar construit pentru a preveni coeziunea și fuzionarea celulelor după degradarea sa și în stadiul târziu să faciliteze eliberarea microsporilor liberi în spațiile locurilor. Aceasta sugerează că peretele calozic poate funcționa, de asemenea ca un filtru molecular protejând dezvoltarea microsporilor de influența țesuturilor diploide din jur formând un perete flexibil, care poate ajuta la prevenirea umflării premature și spargerea microsporilor.

În cele din urmă, peretele calozic poate acționa ca un “*mucegai*” în cazul în care exina primară este generată imediat după terminarea meiozei în timpul microsporogenezei și apoi exinele primare realizează un model pentru formarea exinei pe grăuncioarele de polen mature [20].

Etapa III - Începutul fazei gametofitice (unicelulară). Microsporii tineri capătă o formă sferică și sunt eliberați din tetrade în loculii anterelor. Aceștia conțin nuclee mari hialini cu nucleoli vizibili semnalizând începutul gametogenezei. Formarea sporodermei, care începe în

timpul fazei tetradice și în faza microsporilor liberi, este formată din două straturi (ectexină și endexină). Citoplasma prezintă un aspect dens și își concentrează cel mai mare volum spre nucleul polarizat. După polarizare, nucleul microsporului este supus diviziunii mitotice formând celula vegetativă (CV) și generativă (CG). Celulele tapetale, care anterior au fost alungite și organizate în jurul locusului, prezintă contururi neregulate și se degradează la sfârșitul meiozei [19].

Etapa IV – Grăuncioare de polen bicelulare (gametofit bicelular). Odată ce sa produs divizarea mitotică, vacuola centrală devine mai mică și nucleul vegetativ revine în porțiunea mediană a citoplasmei, în timp ce celula generativă este menținută într-o poziție parietală. Peretele care separă cele două celule este continue cu intina. Celula vegetativă înglobează pe cea generativă, obținând o formă care variază de la lenticulară până la seceră. Din această fază, în citoplasma celulelor vegetative se acumulează o cantitate mare de amidon. Acest amidon este hidrolizat în mod distinct în timpul diferențierii polenului, astfel încât diferite specii pot prezenta polen cu sau fără amidon în timpul antezei. În cazurile în care amidonul este hidrolizat, citoplasma este reactivă la reacția PAS, în timp ce în celelalte, fără hidroliză, există o reacție PAS mai slabă a citoplasmei. Grăunciorul de polen bicelular, în secțiune transversală, prezintă un nucleu vegetal hialin, cu o formă rotunjită și un nucleol vizibil [20]. Celula generativă se găsește imediat lângă ea și are o formă alungită, în secțiune longitudinală și secțiune transversală, și un nucleu cu porțiuni de cromatină condensată. În funcție de planta analizată, grăuncioarele de polen se eliberează în această formă bicelulară, finalizând formarea gameților de-a lungul tubului polinic germinat, ca urmare a mitozei celulei generative [55].

Microsporogeneza la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.). Speciile din genul *Helianthus* sunt potrivite pentru studiile meiotice, utilizând anterele imature. Florile din calatidiu, de obicei, sunt numeroase și se dezvoltă succesiv de la periferie spre centru. Indiferent de specie sau de dimensiunea calatidiului, anterele cu lungimea de 1,5-2,0 mm în general, sunt în curs de meioză (Figura 1.1). Probele pentru studierea meiozei trebuie să fie colectate între orele 11:00 - 13:00 în zilele senine. Perioada zilei afectează diviziunea meiotică și zilele senine previn aglutinarea cromozomilor [84].

Conform savantului Whelan (1974) primul indiciu de inițiere a meiozei este dezvoltarea peretelui calozic, un glucan 1,3 - linkat neramificat, în jurul fiecărui meiocit în timpul meiozei [258]. Deasemenea, în prezența peretelui calozic, meiocitele dezvoltă un nucleol proeminent și cromozomii devin evidenți ca trepte cromatice prin citoplasmă. În zigoten, împerecherea cromozomilor poate fi vizibilă și sinapsele încep să se formeze lângă centromer. Din păcate, în zigoten și pachiten cromozomii au tendința de a se strânge în grupuri, deci cromozomii individuali

rar pot fi identificați. Un comportament similar a fost deasemenea observat la *H. rigidus* de către Georgieva-Todorova [84].

La floarea-soarelui în pachiten, centromerii sunt clar delimitați în două părți prin regiunile cromatice intens colorate de diferite dimensiuni. Numeroase regiuni cromatice sunt, de asemenea, evidente în brațele cromozomiale. Aceste caracteristici permit, de obicei, o descriere ușoară și precisă a cromozomilor din pachiten. Tehnicile îmbunătățite pentru reducerea agregării cromozomilor din pachiten sunt foarte necesare pentru activitatea viitoare privind identificarea cromozomului la *Helianthus*.

Comportamentul cromozomilor în diploten pare a fi neobișnuit de complex și similar cu cel observat la tomate [123]. Cromozomii omologi sunt supuși unei respingeri marcate și chiasmata este evidentă frecvent. La această etapă bivalenții devin relativ difuzi și pot fi incorect identificați ca zigoten. Claritatea bivalenților crește pe măsură ce trec în diploten. Numărul bivalenților sau frecvența chiasmatei nu poate fi estimată până în diplotenul târziu ori diachineză, datorită tendinței mai multor cromozomi de a rămâne în grupuri granulate, creând o impresie falsă de prezență a multivalenților. Un meiocit tipic în diachineză conține 2 – 10 inele de bivalenți. Doi dintre bivalenți sunt asociați cu nucleolul. Observațiile referitor la 163 de meiocite a soiului P2I au aratat o medie de frecvență a chiasmei de 21,8 per celula, cu un diapazon de 18,0 la 26,0 (ianuarie nepublicat). Georgieva-Todorova a estimat 23,9 chiasme în soiul Peredovik [84].

În metafaza I, nucleolii, care au fost evidențiați de-a lungul profazei meiotice s-au descompus, iar bivalenții foarte contractați deven orientati în placa metafazică. Disjunția dintre bivalenți apare în anafaza I și nu este simultană. Unul din bivalenți este supus rapid disjunției și ca rezultat cromozomii încep deplasarea spre poli. Unele aberații meiotice, cum ar fi punțile și fragmentele cromozomale pot să apară la soiurile complet fertile, care sunt considerate a fi rezultatul distrugerii spontane, mai degrabă decât prezența unui inversii paracentrice [248].

În timpul telofazei se formează un nucleol și cromatidele își pierd structura lor obișnuită și în interfază, numărarea cromozomilor nu mai este posibilă. În anafaza II, apare disjunția cromatidelor și are loc dezvoltarea a patru grupuri cu 17 cromatide în fiecare grup. Cromatidele își pierd structura lor regulată, în timpul dezvoltării nucleolilor. În mod normal, forma celor patru grăuncioare de polen potențiali și dispunerea lor în tetradă este tetraedrică [248].

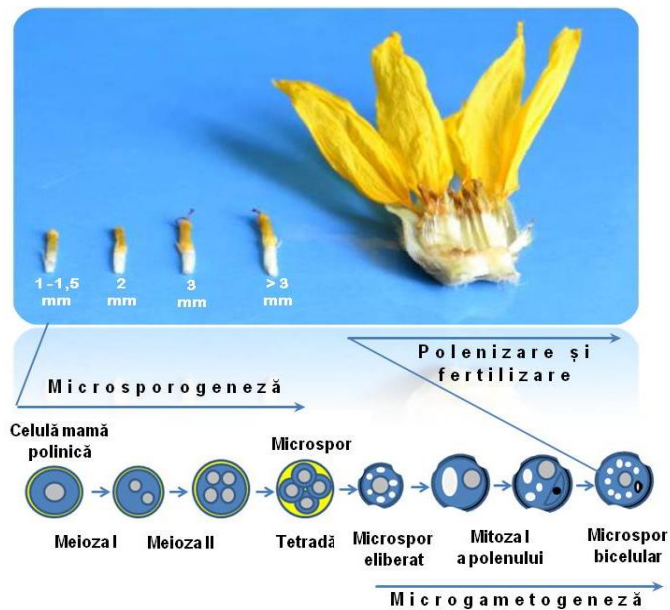


Fig. 1.1. Butoni florali în diferite faze de dezvoltare la *Helianthus annuus* L.

Notă: Dimesiunile butonilor florali de 1,0 mm – 4,0 mm corespund fazelor în care au loc procesele de microsporogeneză și microgametogeneză în antere, în timp ce polenizarea și fertilizarea are loc în stadiul de anteză.

La floarea-soarelui dezvoltarea polenului are loc prin cele două diviziuni mitotice ale nucleului în urma cărora se produce un grăuncior de polen tricelular în anteză. Nucleul celulei vegetative capătă o formă ovală, iar cei doi nuclei generativi formă liniară. La maturitate, sporoderma grăuncioarelor de polen, de formă sferică, este acoperită cu spini (aciculat) și prezintă trei orificii porate-colpate. Tubul polinic germinativ se desprinde din una din aceste regiuni ale aperturii stratului exterior al peretelui de exină, deoarece este foarte subțire. Diametrul corpului grăunciorului de polen fără spini variază între 33 – 39 μ . Grăuncioarele de polen avortate sunt mai mici decât în mod normal și sunt umplute doar parțial [125].

În dezvoltarea microsporilor și grăuncioarelor de polen sunt exprimate un număr mare de gene. Se estimează faptul că cel puțin 15.000 de gene diferite pot fi transcrise în timpul ciclului de viață al polenului demonstrând importanța controlului genetic al dezvoltării polenului de către genomul haploid. Aceste gene au fost clasificate în familii mari ca gene timpurii, care sunt cele mai active în etapa de microspor, iar genele târzii, acele care sunt activate după mitoză I a polenului și crescând în expresie până la eliberarea polenului. Momentul exact și reglarea dezvoltării acestor gene polen-specifice este mediată de elementele ADN transcripțional reglatoare prezente în regiunile promotor ale genei, care acționează împreună cu elementele ARN pentru a stimula sau inhiba sinteza proteinelor în timpul maturizării polenului [76].

Cu scopul de a studia căile moleculare și genetice în dezvoltarea polenului, o cale comună și utilă este izolarea și studiul formelor mutante care perturbă această cale. Dacă o genă este importantă pentru dezvoltarea polenului și este mutantă, planta dată are adesea o segregare denaturată. Această caracteristică a fost utilizată în screening pentru a identifica mutațiile gametofitului masculin [76, 180]. În plus față de screening – ul formelor mutante, cercetarea funcțiilor genelor specifice, cu roluri posibile în dezvoltarea polenului este adesea studiată pentru a indica anumite gene care sunt cu adevărat implicate în acest proces [161]. Este demn de menționat faptul că unele gene care cauzează defecte în dezvoltarea polenului sunt sporofitice [154]. De exemplu, mutantul de la *Arabidopsis ms2* este androsteril și produce grăuncioare de polen, care au un perete foarte subțire cu un strat redus de exină [1]. Un număr semnificativ de mutații ai polenului gametofitic au fost descriși la *Arabidopsis*. Mutația *sidecar pollen (scp)* provoacă, la unele grăuncioare de polen în curs de dezvoltare, o mitoză suplimentară care produce două celule vegetative înainte de diviziunea asimetrică, în timp ce alte grăuncioare de polen mutante sunt avortate [37].

1.1.2. Controlul genetic al meiozei la plante

Deși procesul de dezvoltare a anterei la nivel celular este bine cercetat, acesta este slab studiat la nivel molecular [154, 238]. De exemplu, nu se știe ce gene sunt necesare pentru diferențierea celulelor și țesuturilor după inițierea primordiei staminei, modul de degenerare celulară și evenimentele coordonate cu diferențierea grăuncioarelor de polen. Există două moduri principale pentru a studia dezvoltarea anterei la nivel molecular. Unul utilizează strategia extirpării celulare, [204] care distruge selectiv un tip de celule specifice pentru a identifica efectul distrugerii privind diferențierea celulelor învecinate. Această metodă furnizează importante informații conceptuale despre procesele care controlează diferențierea celulelor. Unii cercetători au utilizat extirparea celulară direcționată pentru a arăta că o stamină funcțională este esențială pentru dehiscență [204]. Ca alternativă, o abordare genetică poate fi aplicată pentru a identifica genele, care sunt responsabile pentru evenimentele individuale așa ca inițierea sporogenzei sau dezvoltarea stratului tapetal și pereții anterei [275]. Stratul de celule tapetal este necesar în dezvoltarea polenului prin producerea și eliberarea proteinelor esențiale. Atunci când celulele stratului tapet sunt distruse selectiv planta nu reușește să producă polen [35].

Progresia ciclului celular este controlată de ciclurile care interacționează și activează kinazele ciclin dependente (CDKs), contribuind la realizarea tranzițiilor treptate prin intermediul ciclului de fosforilare [157]. Un număr semnificativ de gene implicate în reglarea progresiei meiotice, au fost identificate la planta model *Arabidopsis thaliana*. Genele *SOLO DANCERS (SDS)*

similar ciclurilor sunt expresate în mod special în timpul meiozei, iar formele mutante *sds* manifestă aberații la împerecherea cromozomilor și în timpul segregării cromozomiale [40]. Recent, s-a observat faptul că formele mutante *sds* formează întreruperi în catenele duble de ADN, însă și le repară eficient, cel mai probabil prin intermediul genei *RAD51* mediată de sistemul de reparare. O genă nouă *OMISSION OF SECOND DIVISION1 (OSD1)* este necesară pentru realizarea normală a meiozei II, iar forma mutantă *osd1* ca rezultat al meiozei produce diade diploide, în loc de tetrade haploide [37]. Reglarea stabilității proteinelor este esențială pentru controlul ciclului celular, iar genele *SKP* similar proteinelor F-box acționează asupra ubiquitinizării și distrugerii proteinelor țintă, (ex. cicluline). În mod consecvent, mutațiile *SKP1* legate de gena *ASK1*, produc deformări în segregarea meiotică a cromozomilor [130].

Evenimentele importante ale meiozei constau în identificarea cromozomilor omologi perechi și formarea complexului sinaptonemal. Identificarea cromozomului omolog pereche are loc prin mecanisme puțin cunoscute care se realizează în profaza I.

Recent mai multe gene s-au dovedit a fi necesare pentru formarea stratului tapetal și pot fi componente ale aceleiași căi de semnalizare. Două grupuri izolate în mod independent de alele mutante ale aceleiași gene au fost numite *EXCES MICROSPOROCTES1 (EMS1)/EXTRA SPOROGENOUS CELLS (EXS)* [35, 286]. Atât la forma mutantă a alelei *ems1* cât și *exs* le lipsește stratul de celule tapetale și produc un număr mărit de celule arhesporiale. Diferențierea coordonată și funcția celulelor tapetale și a gametofitului masculin este esențială pentru dezvoltarea normală a polenului. Mai multe gene au fost identificate, care sunt importante pentru diferențierea și/sau funcția a tapetului, incluzând genele strâns legate *MYB33* și *MYB65* [169]. Perturbarea oricărei gene nu are nici un efect evident asupra dezvoltării plantelor, în timp ce plantele dublu mutante *myb33 myb65* sunt androsterile în mod condiționat și nu reușesc să producă polen, indicând că acestea funcționează în mod redundant. Sterilitatea masculină la formele dublu mutante *myb33 myb65* este afectată de condițiile de mediu [169].

Studiile genetice au identificat, de asemenea, alți mutanți cu diferențierea anormală a celulelor anterei. Un interes deosebit prezintă forma mutantă de la *Arabidopsis* numită *fat tapetum*, care pare a fi normală în dezvoltarea timpurie a anterei, însă stratul tapetal se mărește în momentul meiozei, iar stratul de mijloc persistă și, de asemenea, se mărește într-un mod similar ca stratul tapetal [204]. Faptul că stratul de mijloc mutant pare să fie similar cu stratul tapetal, ceea ce sugerează că această genă poate fi un reglator critic pentru diferențierea corespunzătoare a stratului de mijloc [37].

Analizele genetice și moleculare au descoperit deja o serie de reglatori importanți pentru mai multe aspecte ale dezvoltării anterei, precum diferențierea celulară a anterei, funcția tapetului

și dezvoltarea microsporului. Caracterizarea suplimentară și izolarea mutațiilor raportați vor facilita identificarea și înțelegerea acelor gene nedescoperite care sunt importante pentru diferențierea celulelor anterei [104].

1.1.3. Mutații meiotice: identificarea genelor cu funcții în meioză

Numeroase cercetări ale meiozei la diferite specii de plante au fost realizate la nivel citologic [6, 56]. În ultimul deceniu au apărut publicații cu privire la analiza moleculară și funcțională a genelor care controlează meioza la drojdii [160], șoareci [209] tomate și porumb [13, 14] etc. S-au constatat diferite niveluri de omologie a genelor-cheie implicate în meioza la drojdii, nematoda de pământ, drozofilă și mamifere. În același timp, au fost puse în evidență și diferite mecanisme genetice de formare a gameților la fiecare dintre organismele studiate. Până în prezent a fost înregistrat un număr mare de gene care afectează premeioza, meioza și postmeioza [128]. S-a realizat clonarea unor transcripți specifici din antere la tomate, au fost izolați și analizați transcripții a două gene necunoscute (*cmg1* și *cmg2*) la porumb [13].

Astfel, s-a constatat că procesul meiotic se desfășoară conform unui mecanism genetic strict, însă încă puțin cunoscut, informația privind etapele de reglare a meiozei la plante fiind foarte fragmentară.

Un rol important în reglarea și derularea meiozei au genele implicate în inițierea meiozei, conjugarea și recombinarea cromozomilor, citochineză. Fiecare eveniment (formarea complexelor sinaptonemale, a nodurilor recombinazionale, crosing-over-ul etc.) se află sub controlul unui grup de gene specializate. Analiza mutațiilor, care afectează meioza la diferite specii de organisme, a permis identificarea a cel puțin șapte etape, care se află sub control genetic:

- inițierea meiozei sau tranziția de la mitoză la meioză;
- procesul de sinapsis al cromozomilor omologi;
- recombinarea cromozomilor omologi;
- formarea chiasmelor;
- disjuncția cromozomilor omologi și prima diviziune a celulei;
- inițierea diviziunii meiotice secundare;
- a doua diviziune celulară.

Studiile moleculare ale acestor gene prezintă un interes deosebit, deoarece permit o înțelegere mai profundă a mecanismelor de inițiere și realizare treptată a meiozei [154, 183].

Primele gene meiotice la plante au fost izolate la crin – specie din familia Liliaceae, remarcată prin dimensiuni relativ mari ale organelor de reproducere și o meioză de lungă durată [27]. Ulterior, la sfârșitul anilor '90 ai sec. XX, s-a obținut o colecție mare de mutații premeiotice și meiotice la

Arabidopsis. Au fost izolate primele gene implicate în recombinare și clonate primele gene meiotice. Au fost identificate gene cu expresie diferențiată în diverse stadii ale meiozei [51].

Au fost creați mutații privind genele asociate formării sporilor masculi – microsporogeneză, sporilor femeli – macrosporogeneză sau ambelor procese [172]. Astfel, forma mutantă de *Arabidopsis sporocyteless/nozzle (spl/nzz)* se caracterizează prin incapacitatea celulelor arhesporale de a se diferenția în micro- și megaspori. Gena *SPL* codifică un factor reglator de transcripție, esențial în dezvoltarea sporociților, omolog cu factorii de transcripție MADS box. Genele *AML1–5* la *Arabidopsis* cu un efect pleiotropic accentuat asupra dezvoltării plantelor sunt similare cu gena *Mei2*, având un rol major în inițierea meiozei la drojdia *Schizosaccharomyces pombe*, fapt ce demonstrează că o parte din mecanismul de inițiere a meiozei este unul conservat [128].

În ultimii ani, identificarea și studierea mutațiilor meiotice s-a extins și asupra altor specii de plante (Tabelul 1), precum porumb (*Zea mays*), orez (*Oryza sativa*), grâu (*Triticum aestivum*), ierburi tropicale (*Brachiaria brizantha*), tomate (*Solanum lycopersicum*), petunie (*Petunia hybrida*), seară (*Secale cereale*), proces stimulat și de secvențierea genomurilor plantelor superioare [110]. Evoluția ciclului celular este controlată de ciclone, care interacționează și activează kinazele ciclone dependente (CDKs), contribuind la realizarea tranzițiilor treptate prin intermediul ciclului de fosforilare [130]. Majoritatea genelor prezentate în tabel au un rol important în realizarea evenimentelor meiotice timpurii. De exemplu, mutațiile în gena *SWITCH1* împiedică activarea mecanismelor meiotice – coeziunea și recombinarea [166]. Genele *SOLO DANCERS (SDS)*, similar ciclonele, sunt exprimate în mod special în timpul meiozei, iar formele mutante *sds* manifestă aberații la împerecherea cromozomilor și în timpul segregării cromozomale. Mutantul *PHS1* la porumb manifestă defecte similare în recombinarea meiotică, formarea complexului sinaptonemal și a bivalenților cu cele întâlnite la mutațiile *SPO11* și *DMC1* [183].

Studierea unor astfel de mutații precum *SPO11*, *DMC1*, *SDS*, *PHS1* a permis cercetătorilor să înțeleagă mai bine legătura dintre procesele de sinapsis și recombinarea meiotică la plante și modalitățile lor de reglare [53, 130, 191].

Reglarea stabilității proteinelor este esențială pentru controlul ciclului celular. Proteinele CDC45 sau SDS, similar ciclonele, participă în controlul progresiei ciclului celular meiotic și au un rol specific în repararea ADN-ului. Genele *SKP*, similar proteinelor F-box, influențează realizarea ubiquitinizării și distrugerea proteinelor-țintă (ex., ciclonele).

Identificarea proteinei MEL1 din familia ARGONAUTE la orez, specifică pentru celule embrionare, presupune existența unui mecanism de silențiere mediat de ARN care reglează dezvoltarea sporilor la plante și care a fost descris și la alte eucariote superioare [103].

Evenimentele importante ale meiozei constau în identificarea cromozomilor omologi perechi și în formarea complexului sinaptonemal. În timpul profazei I are loc expresia genei *SWITCH1/DYAD* care codifică o proteină, necesară pentru împerecherea, sinapsa și recombinarea cromozomilor, iar mutații univalenți *swi1/dyad* segregă în meioza I [3]. Cercetările genei *AMEIOTIC1* efectuate asupra cromozomilor omologi la porumb indică faptul că aceste funcții sunt conservative la angiosperme. Cel puțin două mutații *SWI(SWITCH1)/DYAD* și *SYN1/DIF1* afectează coeziunea cromatidelor surori. Trei alele ale locusului *SWI(SWITCH1)/DYAD: SWITCH1-1* [51], *SWITCH1-2* și *DYAD* cauzează defecte similare în macrosporogeneză [3, 165, 166].

Mutația genei *SYN/DIF1* cauzează sterilitate la plante, erori în micro- și macrosporogeneză determină condensarea neregulată și fragmentarea cromozomilor în stadiile de leptoten și zigoten ale profazei I. Analizele citologice arată că la formele mutante coeziunea cromatidelor lipsește și împerecherea cromozomilor omologi nu se realizează [34]. Gena *SYN1/DIF1* a fost clonată și s-a constatat că este omoloagă cu gena *RAD21/REC8* din familia cohezinelor [91].

La mutații de *Arabidopsis ASY1* se atestă absența procesului de sinapsis al cromozomilor omologi și se manifestă reducerea fertilității. Gena *ASY1* codifică o proteină omoloagă cu proteina HOP1 a drojdiei. Anomaliile care au loc în procesul de sinapsis la mutații asinaptici de seară *SY1* și *SY10* pot fi o consecință a unei decondensări parțiale a cromatinei la stadiile de interfază premeiotică – profaza I [203].

După procesul de sinapsis al cromozomilor omologi următorul eveniment esențial în meioză este fenomenul de crossing-over, sau recombinare. Modelul molecular de recombinare meiotică a fost propus de J.Szostak la drojdia *S. cerevisiae* [225]. În conformitate cu acest model, recombinarea meiotică este inițiată de ruperea cromatidelor la nivel de ADN și formarea unor structuri double-stranded breaks (DSBs), urmată de schimbul reciproc de segmente cromozomiale. Inducția complexului DSBs la toate eucariotele este un proces conservativ, fiind realizat de endonucleaza SPO11, iar procesul de reparare a DSBs este controlat de gena *DMC1* [33]. Pentru a iniția formarea complexului DSBs de către enzima SPO11, este necesară prezența a zece proteine: Rad50, Mre11, Xrs2, Mei4, Mer1, Mer2, Mre2, Rec 102, Rec104 și Rec114. Mutația genei *SPO11* cauzează erori în sinapsis la fungi, mamifere și plante [130].

Astfel, identificarea mutațiilor premeiotici a fost primul pas în studierea etapelor timpurii ale sporogenezei, însă microsporogeneză este afectată și după profaza I. La forma mutantă *ASK1* cromozomii omologi nu se separă la polii celulei. Gena *ASK1* este omoloagă cu gena *SKP1* de la drojdie, esențială în reglarea ciclului celular mitotic și derularea meiozei și, posibil, joacă un rol în controlul separării cromozomilor omologi prin degradarea proteinei necesare pentru conjugarea lor în profaza I [277].

Mutații au fost identificate și în ultimul stadiu al microsporogenezei, când se formează tetrada cu microspori haploizi – telofaza II. Mutantul androsteril *POLLENLESS3/TMD1* produce microspori în exces în stadiul de formare a tetradei celulare, cu patru microspori mai mult, de regulă 8 +/-1 or +/- 2. Meioza I și II evoluează normal, iar formarea „octadelor” este cauzată de o diviziune celulară suplimentară fără replicarea ADN-ului. S-a constatat că gena *POLLENLESS3/TMD1* codifică o proteină omoloagă parțial cu proteinele CDC23P și RAD3 implicate în ciclul celular la drojdiile *Saccharomyces cerevisiae* și, respectiv, la *Schizosaccharomyces pombe*. În urma citochinezei, în meioza secundară, dintr-o diadă cu celule haploide rezultă patru celule haploide ce formează o tetradă celulară. La formele mutante *Stud* (*STD*) / tetraspore (*TES*) se produc diviziuni meiotice normale, însă e absentă citochineza [227]. Polenul formelor mutante este mai mare decât cel de tip sălbatic, deoarece microsporiile sunt tetranucleați, iar dezvoltarea lor postmeiotică se poate desfășura relativ normal. Nucleele pot trece printr-o mitoză completă, ceea ce duce la formarea unor grăuncioare de polen cu un număr variabil de nuclee. Dacă nucleii microsporilor fuzionează înainte de prima diviziune mitotică, în loc de nuclee normale haploizi se formează microspori cu nuclee poliploizi [19, 32]. Astfel de erori în microsporogeneză, ca realizarea citochinezei după telofaza I și producerea diadelor cu două celule fiice la sfârșitul primei diviziuni nucleare, se constată și la mutații *TAM* (tardy asynchronous meiosis). Se presupune că proteina TAM reglează desfășurarea normală a ciclului celular, asigurând tranziția de la stadiul G2 al interfazei la mitoză și a diviziunilor mitotice ale celulei-mamă a polenului [37].

Ciclul celular joacă un rol important în creșterea și dezvoltarea organismelor multicelulare, inclusiv plantele, fiind controlat de o familie mare de gene, precum sunt ciclonele [60]. Majoritatea organismelor au mai multe grupuri diferite de ciclone și fiecare grup are, de obicei, funcții specializate. În celule animale, ciclonele de tip A sunt sintetizate la începutul fazei S, ciclonele de tip B sunt sintetizate în faza G2 și sunt implicate în intrare mitotică [213], ciclonele de tip D sunt sintetizate de la intrarea în ciclul celular și joacă un rol în reintrare în ciclul celular, ca răspuns la semnalele extracelulare și ciclonele de tip E care se sintetizează la trecerea din faza G1/S și realizează intrarea în faza S [17]. În special, ciclina de tip D (*CYCD*) este implicată în controlul ciclului celular mitotic, în creșterea celulară, diferențierea celulară și finisarea ciclului celular [25, 69]. Așa cum rezultă din testele Northern blot, *CycD3* este foarte exprimată în rădăcini, prezentă în cantități mai mici, în flori, frunze tinere, țesuturile calusale și este absentă în țesutul meristematic. *CycD1* generează trei transcripți de diferite dimensiuni. Cel mai lung transcript este răspândit în flori și, într-o măsură mai mică, în rădăcinile și materiale calusale, în timp ce în frunze predomină cei intermediari și mai scurți.

Pe de altă parte, expresia în exces a genei *CYCD3;1* în plante cum ar fi la *Arabidopsis* duce la schimbări dramatice în morfologia plantelor, în extinderea zonei de divizare a celulelor, diviziunea celulară ectopică, dimensiuni reduse ale celulelor, întârziere în diferențierea celulară, creșterea conținutului ADN-ului celular, care apare în multe celule, după încheierea diviziunii mitotice [60, 129].

Un factor implicat în procesul de diviziune celulară reprezintă genele histone. Histonele sunt proteine de bază cromozomială, extrem de conservate de-a lungul evoluției, care sunt împărțite în 5 tipuri: H1, H2A, H2B, H3, și H4. Proteinele histone pot suferi numeroase modificări post-tranlaționale, care joacă un rol important în structura și funcția cromatinei. Multe modificări cum ar fi acetilarea, metilarea, fosforilarea, etc., au loc la capătul N-terminal al histonelor. Diferite modificări nu au numai funcții structurale, dar ele joacă, de asemenea, un rol semnificativ în mai multe procese biologice valabile și induce, probabil, semnalele de reglare [136, 219]. Toate modificările post-transducționale pot determina modificări structurale și funcționale la nivelul cromatinei [237] și reglează unele procese biologice, inclusiv transcripția, repararea ADN-ului și apoptoza [77, 136].

Histona H1 a fost mult timp asociată cu menținerea structurii de ordin superior în cromozomi. La tutun, cele mai multe histone somatice H1 sunt reținute în cromozomi în timpul meiozei masculine [10].5

Histona H3 este o proteină importantă în domeniul de dezvoltare a epigeneticii, în cazul în care variantele secvențelor și stările variabile de modificare au un rol în dinamica și reglarea pe termen lung a genelor [26]. Cromatina suferă schimbări structurale în profaza meiotică I, în care cromozomii perechi se recombină și formează sinapsa [143], astfel diverse teste genetice, biochimice și citologice au stabilit că mai multe modificări ale histonelor au un rol fundamental în aceste procese [26, 31, 101, 193]. Până în prezent, schimbări dinamice detaliate ale acestor modificări ale histonei H3 nu au fost examinate în detaliu în stadiile târzii ale meiozei la plante [181].

Genomul tuturor organismelor eucariote conține cel puțin o copie a genei *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*). La animale, o copie a genei *PCNA* a fost identificată la genomul șobolanilor [58], întrucât o gena *PCNA* și mai multe pseudogene sunt prezente la șoareci și om [58, 137]. La plante, o singură copie a genei *PCNA* a fost identificată la genomul *Oryza sativa* (orez), *Catharanthus roseus* (trandafir), *Populus nigra* (plop negru), *Pisum sativum*, *P. vulgaris*, *Brassica napus* și *Glycine max*, în timp ce speciile, cum ar fi *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum* și *Phaseolus coccineus* conțin cel puțin două gene

PCNA. Prezența a trei gene *PCNA* funcționale au fost descoperite în genomurile arhaice: *Sulfolobus solfataricus* și *Aeropyrum pernix* [62, 113].

Expresia genelor *PCNA* în toate organismele este corelată cu proliferarea celulelor și, astfel, cu sinteza ADN-ului în timpul replicării genomului în faza S a ciclului celular. Expresia genelor *PCNA* corelează cu proliferarea celulelor și replicarea ADN-ului, iar proteina sa dovedit a fi implicată în ambele procese. În plus ADN polimerazele, sunt implicate în sinteza ADN-ului în timpul replicării și reparațiilor, de asemenea, aceste interacțiuni pot să apară între factorii necesari în etapele anterioare de sinteză a ADN-ului [137].

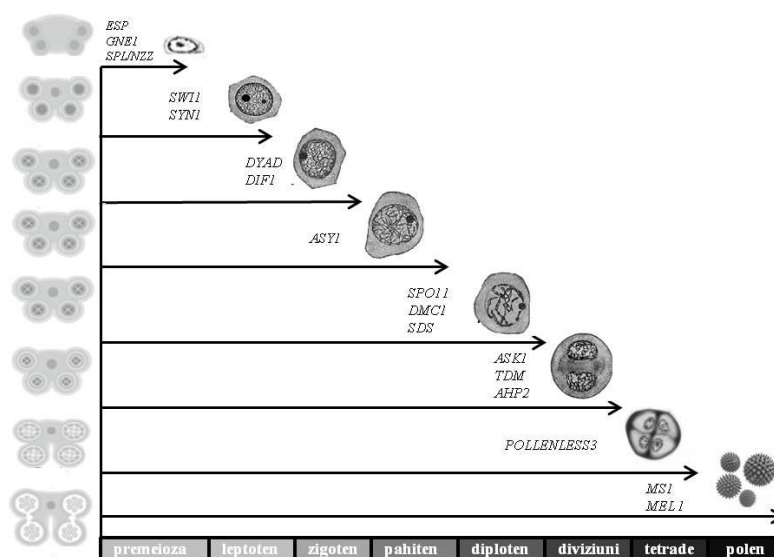


Fig. 1.2. *Pattern* – ul de expresie a unor forme mutante și genele expresate în diferite stadii de dezvoltare a celulelor arhesporiale și a anterelor.

O corelație între expresia genelor *PCNA* și proliferarea celulelor a fost observată, de asemenea, în diferite specii de plante. Aceasta a fost identificată în fasole odată cu începutul germinării semințelor, transcripția *PcPCNA1* prezintă niveluri scăzute, urmată de creșterea nivelului de expresie a genei *PcPCNA1* în prima etapă de germinare și apoi în diminuarea nivelului de expresie în ultima perioadă de germinare [221]. Pe de altă parte, în țesuturile rădăcinilor, frunzelor și în cele meristemice, nivelul de transcriere *PcPCNA1* a fost scăzut, cu excepția regiunii micropilare a seminței, unde această genă a fost activ expresată.

Exprimarea genelor *PCNA* se corelează cu proliferarea celulelor și replicarea ADN-ului și, nu în mod surprinzător, proteina sa dovedit a fi implicată în ambele procese. În plus, gena *PCNA* are un rol-cheie în trei căi de reparare a ADN-ului, exercitându-și funcția sa prin interacțiunea directă cu proteinele implicate în aceste procese. Mai mult ca atât, interacțiunea genei *PCNA* cu

alți factori previne recombinația nepotrivită a omologilor, permite coeziunea cromatidelor surori și controlează negativ sau pozitiv progresia ciclului celular [62].

Cu scopul de a studia căile moleculare și genetice în meioza masculină la plante, o cale comună și utilă este izolarea și studiul formelor mutante care perturbă această cale (Tabelul 1.1). În ultimii ani, identificarea și studierea mutațiilor meiotice se realizează la unele specii de plante, precum porumbul (*Zea mays*) [192], orezul (*Oryza sativa*) [178], grâul (*Triticum aestivum*) [90], ierburile tropicale (*Brachiaria brizantha*) [162], tomatele (*Solanum Lycopersicum*) [195], petunia (*Petunia hybrida*) [49], secara (*Secale cereale*) [291], proces stimulat și de secvențierea genomurilor plantelor superioare [54, 119].

Astfel, s-au identificat genele la *Arabidopsis Ahp2 (Hop2)* [208] și *Mnd1* [133] care formează un complex proteic. Schommer și colab. (2003) au stabilit că plantele mutante *ahp2* în stare homozigotă prezintă atât sterilitate masculină, cât și feminină și nu formează bivalenți, rezultate similare au fost observate și pentru forma mutantă *mnd1* [133, 208]. Deasemenea s-a constatat că la meiocitele *ahp2* în anafaza I și II prezintă aberații extinse a cromozomilor, fragmentare, punte cromatinică și segregare dezechilibrată.

La unele forme mutante de *Arabidopsis* microsporogeneza este afectată după profaza I, în anafaza I. Astfel, la forma mutantă *ASK1* cromozomii omologi nu se separă la polii celulei [277]. Gena *ASK1* este omoloagă cu gena *SKP1* de la drojzii, esențială în reglarea ciclului celular mitotic și derularea meiozei și posibil joacă un rol în controlul separării cromozomilor omologi prin degradarea proteinei necesare pentru conjugarea omoloagă a lor în profaza I [97]. Studiile genetice indică faptul că gena *ASK1* este esențială pentru meioza masculină: o inserție a transpozoniului disociat în gena *ASK1* duce la sterilitate masculină [275], reducerea frunzelor și dimensiunile petalelor, alterarea identității organelor florale [285], și erori în răspunsul auxinic [89]. Yang și colab. (1999), au stabilit că gena *ASK1* este esențială pentru decurgerea normală a meiozei masculine. Mutația *ask1-1* determină producerea tetradelor cu un număr variabil de microspori, care au mărimi diferite și par să aibă diferite cantități de ADN [275].

La *Arabidopsis* cel puțin două mutații afectează coeziunea cromatidelor surori *SWI(SWITCH1)/DYAD* și *SYN1/DIF1*. Au fost izolate trei alele ale locusului *SWI(SWITCH1)/DYAD*: *SWITCH1-1* [171], *SWITCH1-2* [164] și *DYAD* [3]. Toate cele trei alele cauzează defecte similare în macrosporogeneza. Majoritatea celulelor mamă ale macrosporilor (CMM) nu parcurg meioza I, ci se divid mitotic. Două celule fiice, produse ale primei diviziuni mitotice, parcurg alt tip aberant de diviziune de tip mitoză cu o segregare inegală a cromozomilor. În cele din urmă, în loc de celule haploide ale sacului embrionar se formează celule degenerate. În același timp, doar gena *SWITCH1-2* afectează și procesul de microsporogeneza, provocând

androsterilitatea plantelor. S-a stabilit că gena *SWI* este implicată atât în stabilirea unei coeziuni între cromatidele surori cât și în procesul de conjugare, formare a complexului sinaptonemal și recombinare a cromozomilor [166]. Identificarea unui omolog al genei (*SWITCH1*)/*DYAD* la porumb – *AMEIOTIC1* ne indică că aceste funcții sunt conservate la toate angiospermele [95].

Tabelul 1.1.
Gene premeiotice și meiotice la diferite specii de plante

Genă	Specie ^a	Fenotip mutant	Omologia genei	Funcția genei	Referințe
<i>ASK1</i>	A.t.	Conjugarea neomoloagă și agregarea cromozomilor	Skp1	Structura cromatinei, calea de ubichitinizare	[277]
<i>SWI1/DYAD</i>	A.t.	Absența formării (AEs) ^c , sinapsei și recombinării cromozomilor	– ^b	Inițierea meiozei	[3]
<i>MND1</i>	A.t.	Formarea punților cromatinice, fragmentarea cromozomilor	Mnd1	Recombinarea cromozomilor	[186]
<i>AHP2</i>	A.t.	Formarea punților cromatinice, fragmentarea cromozomilor	Hop2	Recombinarea cromozomilor	[220]
<i>AMI</i>	Z.m.	Arestarea meiocitelor în profaza I	– ^b	Tranziția de la leptoten la zigoten	[192]
<i>MS1</i>	A.t.	Exina nu se formează, vacuolarea tapetului și a microsporilor		Reglează formarea exinei și dezvoltarea pereților polenului	[262]
<i>ZYP1</i>	A.t.	Absența sinapsei cromozomale și forma-rea multivalentilor	Zip1/Scyp1	Sinteza elementului proteic transversal al CS ^d	[12]
<i>DMC1</i>	A.t.	Absența sinapsei și recombinarea cromozomilor	RECA	Recombinarea cromozomilor	[202]
<i>SYN/DIF</i>	A.t.	Condensarea neregulată și fragmentarea cromozomilor	REC8/RAD21	Coeziunea cromatidelor surori în meioză	[245]
<i>PHS1</i>	Z.m.	Conjugarea neomoloagă a cromozomilor	– ^b	Recunoașterea omo-loagă a cromozomilor	[191]

a – A.t.: *Arabidopsis thaliana*, Z.m.: *Zea mays*.

b – doar la plante

Studiile genetice realizate de către Golubovskaya și colab., (1993) au arătat că gena *AMEIOTIC1* joacă un rol esențial în inițierea meiozei la porumb. Produsul genei *AMEIOTIC1* afectează o etapă anterioară a procesului meiotic mai tare decât oricare altă genă cunoscută la porumb și este importantă pentru aderența ireversibilă a celulelor la meioză și pentru evenimentele cruciale care marchează trecerea de la interfaza premeiotică la profaza I, incluzând sinapsa cromozomială [86]. Studiile recente realizate pe mutantul *aml* au demonstrat că gena *aml* are două roluri distincte în reglarea meiozei. Gena este necesară pentru tranziția de la ciclul celular mitotic la meioză și în absența ei meiocitele continue să se dividă mitotic. Gena *aml*, de asemenea reglează tranziția de la leptoten la zigoten [176, 190].

MALE STERILITY1 (MS1) este o genă care se expresează în tapet începând cu stadiul târziu de tetrade, în timpul degradării calozei, la etapa când microsporul tânăr este eliberat [115]. Cu

toate acestea, proteina MS1 se detectează numai la aproximativ 12 ore de la etapa târzie de tetrade până la etapa de microspor liber [274]. Secreția tapetală în mutantul *ms1* este afectată cauzând anomalii în formarea peretelui grăunciorului de polen și depozitarea exinei aberante. La aceste forme mutante primele faze ale meiozei celulelor mamei polinice (CMP) și eliberarea microsporilor par să decurgă în mod normal, apoi tapetul devine anormal vacuolizat și degradează împreună cu microsporii [115, 235, 263].

Progresele înregistrate în studierea meiozei la *Arabidopsis* stimulează cercetarea genelor asociate meiozei și la plantele de cultură. Studiarea controlului genetic al meiozei la plante va contribui la înțelegerea completă a mecanismelor micro- și macrosporogenezei, va deschide noi perspective pentru manipularea biotehnologică a reproducerii la plante, va permite amelioratorilor să creeze noi variante de gene pentru hibridii de calitate superioară sau să folosească genele meiotice în programe ce vizează apomixisul și poliploidizarea [19, 176].

1.2. Rolul fitohormonilor în dezvoltarea reproductivă

Ciclul celular meiotic la plante este diferit în comparație cu cel din celulele animale și drojzii. În urma studiilor efectuate asupra plantelor sau identificat mutații care afectează formarea meiocitelor sau procesul meiozei. Cele mai multe celule meiotice mutante de la plante finisează ciclul celular meiotic și produc microspori anormali [37].

Studiile efectuate la unele plante de cultură au arătat că faza de dezvoltare reproductivă este mult mai sensibilă la stresul abiotic decât faza de dezvoltare vegetativă [2, 71, 127, 182]. Mai mulți cercetători au afirmat că meioza este etapa cea mai sensibilă în ciclul de viață al plantelor de cultură și este influențată atât de factorii genetici cât și de cei de mediu [23].

1.2.1. Interconexiuni fitohormonale și de mediu în reglarea creșterii și diferențierii anterelor

Citochininele sunt fitohormonii cei mai frecvent asociați cu reglarea apoptozei celulare. Genele de sinteză a citochininelor sunt preferențial exprimate în etapele timpurii de dezvoltare a tapetului la orez și o genă de dezactivare a citochininelor este exprimată în etapa de microspor uninucleat [32]. Prin urmare, inhibarea nivelurilor acestui fitohormon poate fi o premisă prealabilă pentru moartea programată a tapetului. La *Mercurialis annua* aplicarea exogenă a citochininelor la diferite linii fertile inhibă stadiul de tetrade și duce la formarea anterelor goale [23].

Studiile demonstrează că etilena joacă un rol important în moartea celulelor la plante [8, 63, 5]. Formele mutante de *Arabidopsis* cu producția de etilenă redusă și transducția semnalului duc

la întârzierea senescenței frunzelor, deși aceasta nu este indusă mai devreme în plantele ce produc etilenă în exces [240]. Etilena induce formarea aerenchimei în rădăcinile de porumb, un proces care implică moartea programată a celulei [8, 63]. Există unele dovezi că etilenă este implicată în moartea celulelor tapetale. Genele de semnalizare ale etilenei sunt exprimate în celulele tapetale la orez, în deosebi în timpul etapei de tetrade [23].

Semnalizarea acidului jasmonic (AJ) poate fi necesară pentru senescența frunzelor [98], astfel în aceste frunze crește nivelul de acid salicilic. Sinteza acidului jasmonic pare a fi activă în toate etapele de dezvoltare a tapetului la orez, la fel ca etilena având funcție în apoptoză [23]. Cu toate acestea, sinteza AJ are loc în filamentul anterei și nu în celulele tapetale sau microsporii de la *Arabidopsis* [114, 204].

Printre factorii de mediu care influențează procesul meiotic capabili să inducă anomalii în timpul meiozei se numără efectele de temperatură înaltă [11], deficitul de apă [127], conținutul de nutrienți, iradierea [243] și substanțele chimice, cum ar fi erbicidele [11] și fungicidele [72].

Acești factori de stres pot cauza anomalii structurale și funcționale în organele reproductive care duc la insuficiența de fertilizare sau avortarea semințelor și fructelor. Astfel daunele asupra productivității induse de stres la această etapă sunt deosebit de grave pentru culturile la care recolta economică este produsul reproducerii sexuate [182]. Deși numărul grăuncioarelor de polen este stabilit înainte de meioza CMP, stresul abiotic în timpul meiozei duce la sterilitatea polenului și poate foarte mult să reducă numărul grăuncioarelor de polen. Factorii abiotici cei mai bine studiați sunt deficitul de apă și temperatura (Figura 1.3). Dezvoltarea reproductivă masculină la plante este extrem de sensibilă la deficitul de apă în timpul meiozei în celulele mamă a microsporocitelor. Insuficiența de apă în timpul acestei faze inhibă dezvoltarea ulterioară a microsporilor sau a grăuncioarelor de polen, astfel cauzând sterilitatea masculină. Stresul indus de insuficiența de apă în stadiul de meioză induce sterilitatea masculină la grâu [154], orz [280], ovăz [158] și orez [121]. CMP ale acestor plante par să treacă complet prin meioză, dar dezvoltarea în continuare a microsporului este arestată în diferite etape. În unele antere, vacuolizarea anormală a tapetului poate fi observată la scurt timp după meioză. Astfel, este posibil ca disfuncția tapetală să fie asociată cu pierderea orientării microsporului [253]. Grăuncioarele de polen dezorientate au citoplasmă diluată, intina este puțină sau chiar lipsește, însă exina este în normă, astfel aceștia nu reușesc să acumuleze amidon, care reprezintă un constituent major al fertilității polenului la graminee. Unii cercetători au demonstrat că sterilitatea masculină rezultată la grâu din insuficiența de apă are loc aproximativ la 10 zile înainte de anteză, ce corespunde cu perioada de meioză în CMP [127, 170]. Cercetările acestor savanți au arătat că stresul indus de apă cauzează pierderea

orientării, lipsa depozitării amidonului în celulele masculine de reproducere, vacuolizarea anormală a celulelor tapetale și depozitarea anormală a amidonului în țesutul conducător.

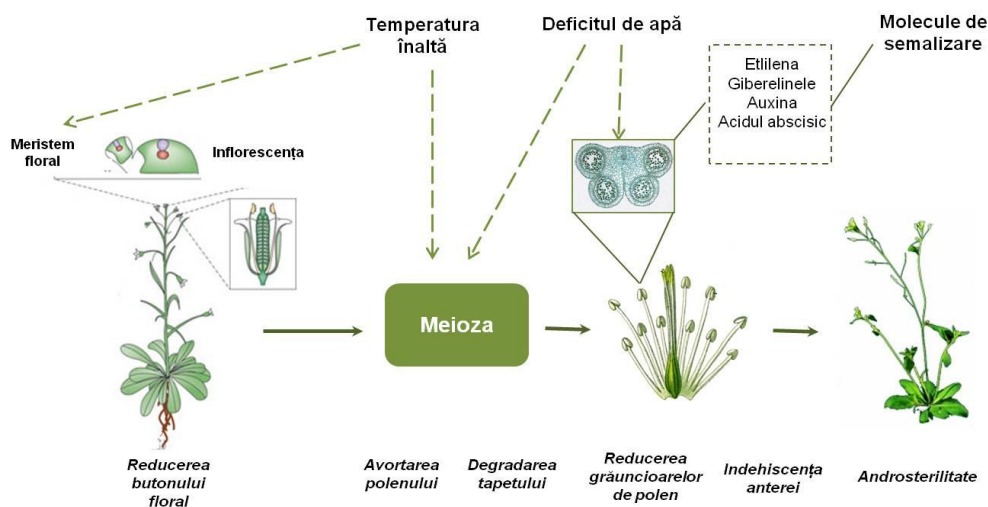


Fig. 1. 3. Prezentarea schematică a ciclului de reproducere la plante și efectul stresului abiotic în diferite stadii de dezvoltare reproductivă.

Sensibilitatea dezvoltării florale, în special microsporogeneza, la temperaturi ridicate a fost identificată la multe culturi. La tomate, meioza care are loc la 8 – 9 zile de la anteză în CMP este foarte sensibilă la temperaturile ridicate. Odată cu creșterea temperaturii se evidențiază reducerea dezvoltării microsporilor, viabilității și eliberării polenului [80]. Sub acțiunea temperaturii grăuncioarele de polen devin zbârcite, lipsește dehiscența anterei și organizarea iregulară a endoteciumului și epidermei [205]. La grâu temperaturile înalte în timpul meiozei cauzează distrugerii la nivelul stratului tapetal și microsporiile devin incapabili să finiseze prima mitoză [127].

1.2.2. Aspecte funcționale ale giberelinelor în formarea gameților masculini

Giberelina este un alt fitohormon cu un rol deosebit în microsporogeneza plantelor superioare. Giberelinele sunt esențiale pentru dezvoltarea florilor fertile la tomate și pot fi necesare imediat după fertilizare [239]. Studiile efectuate la grâu arată că conținutul exogen de AG₃ în anterele sterile este semnificativ mai scăzut decât în anterele fertile și aplicarea exogenă a AG₃ poate parțial să mărească fertilitatea [284]. Interesant este faptul că în unele cazuri giberelinele pot promova dezvoltarea reproductivă feminină sau pot induce sterilitatea masculină. De exemplu, tratarea cu AG₃ stimulează creșterea organelor de reproducere feminine la tomate [117], ricin (*Ricinus communis*) și porumb (*Zea mays*) [36], însă induce sterilitatea masculină la salata verde (*Lactuca sativa*) și piper (*Capsicum annuum*) [214]. De asemenea, aplicarea exogenă a

giberelinelor promovează dezvoltarea staminelor de la normal până la aproape normal și formează polen viabil în unele plante cu androsterilitate. La piper AG₃ inhibă dezvoltarea polenului și în același timp stimulează diferențierea carpelilor în stamine [214]. La tomate, sunt prezente diferite alele ale unei gene a androsterilității *stamenless (sl)* [196] și astfel aceste gene având poziție diferită răspund similar la gibereline. La aceste forme mutante, tratarea cu giberelină are ca rezultat producerea polenului normal viabil care este capabil de a induce dezvoltarea fructelor și semințelor. Aceasta ne sugerează că giberelinele sunt un component important pentru dezvoltarea normală a polenului [117].

La unele plante dicotiledonate hermafrodite sau monocotiledonate, aplicarea giberelinelor induce sterilitatea masculină sau/și stimulează creșterea organului feminin de reproducere. La slata verde, de exemplu, AG₃ induce o serie de stări androsterile, de la antere nondehiscente până la antere rudimentare sau chiar până la absența completă a acestora [67, 68]. Fitohormonii sunt produși ai metabolismului la plante și sunt implicați în reglarea multor procese fiziologice de creștere și dezvoltare. Rolurile hormonilor în dezvoltarea organelor de reproducere au fost studiate de către mai mulți cercetători [59, 75, 109, 223], inclusiv legătura dintre sterilitatea masculină și unele substanțe de creștere în androsterilitatea citoplasmatică (ASC) la grâu [284], orez [108], porumb [269] și rapiță [170], androsterilitatea nucleară la porumb [228] și sterilitatea masculină indusă de un agent chimic [253]. Acidul giberelic (AG₃) joacă roluri importante în dezvoltarea anterelor și în fertilitatea polenului la diferite specii de plante [46, 124]. Studiile au arătat că AG₃ favorizează formarea și eliberarea grăuncioarelor de polen mature [75, 223]. Studiile suplimentare au arătat că AG₃ controlează elongarea celulelor a filamentelor staminei și formarea polenului matur [46]. AG₃ este un hormon cu o acțiune foarte puternică a cărui prezență naturală în plante controlează dezvoltarea lor. Deși are multe efecte care reglează diverse procese fiziologice, inclusiv germinarea semințelor, creșterea lăstarilor, înflorirea, dezvoltarea florilor și fructelor, în ultimii ani a fost descoperit un alt efect important al AG₃ - inducerea sterilității la polen în unele plante cum ar fi floarea - soarelui, orezul și ceapa [57, 147, 217]. În plus, plantele de sofrănel tratate exogen cu AG₃, aplicat pe muguri înainte de înflorire, nu produc polen fie este insuficient din cauza inhibării microsporogenezei [15].

Aplicarea exogenă a acidului abscisic, un antagonist al giberelinelor este de asemenea cunoscut ca inductor al sterilității masculine la grâu [57] și la tomate [5]. Anterele de orz tratate cu acid abscisic (ABA) protejează microsporiile de moartea celulară programată [251], sugerând că scăderea nivelului de ABA poate fi asociată cu apoptoza.

Rezultatele obținute de Анященко și colab., au demonstrat că aplicarea exogenă a giberelinelor asupra plantelor de floarea-soarelui induce androsterilitate la 98 % din ele, iar

savantul Kasemle (1967) a demonstrat un proces invers, susținând că giberelinele exogene restaurează fertilitatea la plantele androsterile [126]. Deci, giberelinele au un rol deosebit în reglarea androsterilității/androfertilității la floarea-soarelui și la alte specii de plante (Tabelul 1.2).

Tabelul 1.2.
Efectul gametocid al giberelinei asupra sterilității polenului la diferite specii de plante

Specia	Aplicarea exodenă a giberelinei	Autori
Floarea – soarelui	Concentrația de 0,5% AG ₃ induce sterilitatea masculină, fiind aplicată la stadiile de 5 – 6 frunze și buton floral.	[217]
	Concentrația de 0,25 -0,5 mg per plantă aplicată la începutul dezvoltării butonului floral induce 90 – 100% sterilitate masculină. Diferite genotipuri raspund în mod diferit la tratare în condiții climatice diferite.	[59]
	Concentrația de 150 ppm la faza de buton floral în formă de stea induce sterilitatea masculină. De asemenea, induce o creștere marcată a înălțimii plantelor, lungimea și lățimea primelor cinci frunze și o reducere semnificativă în dimensiunile inflorescenței și a discului floral.	[246]
	Concentrația de 100 ppm induce sterilitatea masculină de 94%, fără scăderea excesivă a producției de achene la floarea-soarelui.	[83]
	Concentrațiile de 50, 100, 200 și 500 ppm induc androsterilitatea la speciile sălbatice de floarea – soarelui și cele înrudite fiind aplicate la diferite dimensiuni a butonului floral de 0.7,0.8,0.9 și 1,0 cm în cazul <i>H. debilis</i> și 1,5, 2,0, și 2,5 cm în <i>H. argophyllus</i> , reprezentând diferite stadii de dezvoltare. În urma tratării se induce o sterilitate completă a polenului.	[134]
Porumb	Concentrație de 500 la 1000 ppm AG ₃ induce la porumb sterilitatea parțială. Stadiul critic de dezvoltare a plantelor pentru a induce sterilitatea masculină prin metode chimice este în faza imatură a inflorescenței masculine, de aproximativ 1 metru lungime.	[36]
Ceapă	Soluțiile apoase de AG ₃ induc temporar sau permanent sterilitatea masculină la plantulele de ceapă aflate în creștere, însă plantele cu sterilitate masculină permanentă sunt sărace în semințe.	[242]
Grâu	Aplicarea exogenă a AG ₃ pe florile superioare și inferioare prezintă eficacitate în inhibarea antezei, ceea ce previne formarea boabelor.	[141]

După cum s-a menționat mai sus, giberelinele reprezintă efectorul citoplasmatic, care realizează relații de inducție – represie în sistemul genetic ASC-Rf. În cazul prezenței lor în cantități suficiente în plante, tratarea exogenă se manifestă ca un factor de stres, iar în cazul determinantilor androsterilității citoplasmatică, tratarea reduce nivelul optimal. Efectul steril al androsterilității induse ce se manifestă doar în cazul când tratarea exogenă cu gibereline se efectuează la faza butonizării pe de o parte, și modificările esențiale ale raportului *in vivo*, corelat cu modificările conținutului proteinelor sumare și fracționare în condiții model (la fenocopii) pe de altă parte, demonstrează reglarea temporară dublă – genetică și fitohormonală a funcției cercetate [15].

În urma cercetărilor la floarea-soarelui s-a observat că tratarea cu gibereline, nu modifică substanțial cantitatea de ADN, pe când cea a ARN-ului crește mai mult de două ori peste 24 ore

din momentul tratării. În cazul dat s-a demonstrat o majorare considerabilă a activității funcționale ale aparatului genetic, intensificându-se procesul de transcripție, manifestat prin inducerea biosintezei de novo a unor proteine, care pot fi rezultatul inducției unor gene specifice responsabile pentru androsterilitate. De asemenea, s-a demonstrat că acidul giberelic influențează numărul și structura mitocondriilor, ceea ce reflectă activitatea aparatului proteosintetic și stimulează productivitatea plantelor [28].

Rezultatele obținute anterior, au stabilit că AG_3 este unul dintre factorii esențiali ce induc o dezvoltare incompletă a anterelor la formele androsterile. Tratarea cu gibereline determină creșterea sinergetică a conținutului de auxine și gibereline, induce o scădere a activității oxido-reducatazelor ca urmare producând o creștere a AIA, ceea ce determină dereglarea balanței de fitohormoni exogeni și dezvoltarea polenului steril. Aplicarea exogenă a giberelinelor majorează raportul AIA/ AG_3 la linia androfertilă și diminuează sau menține la același nivel acest raport la linia ASC [28, 126].

1.2.3. Androsterilitatea citoplasmatică la plantele de cultură

Primul caz de androsterilitate citoplasmatică a fost descris de C. Correns, care a descoperit în anul 1904 plante de cimbru (*Satureja hortensis* L.) cu polen neviabil. În urma polenizării plantelor androsterile cu polen de la plante fertile au fost obținute forme androsterile până în generația F₆, demonstrând astfel că sterilitatea masculină se moștenește pe linie maternă [30]. Ulterior, acest fenomen a fost descoperit și descris la o serie de plante din clasa mono- și dicotiledonatelor, anuale și perene, alo- și autogame. Androsterilitatea necromozomală a fost identificată la 153 specii, ce fac parte din 51 genuri și 22 familii, clasificându-le în funcție de originea lor în felul următor [2, 15, 23]:

- sterilitate apărută în rezultatul încrucișărilor dintre plante cu genom și citoplasmă incompatibilă;
- sterilitate care se manifestă spontan la hibridii intraspecifici;
- sterilitate determinată de mutații citoplasmatică. Androsterilitatea a apărut în condiții naturale diferite, fiind observată în populații sau la descendenții obținuți spontan în urma hibridărilor intraspecifică, interspecifică și intergenerică precum și în urma mutagenzei ca rezultat al reorganizării genelor citoplasmatică sau nucleare [23]. Pornind de la multitudinea surselor și diversitatea filogenetică, fenotipică și genotipică, au fost întreprinse mai multe încercări de a clasifica tipurile cunoscute de androsterilitate. În funcție de factorii care determină expresia acestui fenomen se disting [292]:

- androsterilitate genică sau nucleară, cauzată de gene nucleare în stare recesivă *msms* (*msms* – male sterile) care se transmit prin ereditate mendelian;
- androsterilitate citoplasmatică, determinată de gene citoplasmatică și gene nucleare restauratoare de fertilitate Rf ;
- androsterilitate modificalională sau indusă, determinată de factori abiotici și biotici ai mediului, indusă prin mutageneză sau prin aplicarea exogenă a giberelinelor;
- androsterilitate cromozomală, cauzată de diferite tipuri de aberații cromozomale apărute în meioză ca o consecință a hibridărilor îndepărtate.

Fiecare tip de androsterilitate are o importanță teoretică deosebită. Astfel, studierea androsterilității citoplasmatică permite elucidarea mecanismelor de interacțiune a genomului nuclear cu plasmonul, studierea androsterilității genice pune în evidență mecanismele de acțiune a genelor nucleare, iar în cadrul androsterilității modificalionale se examinează acțiunea diferiților factori asupra procesului de microsporogeneză. Pe lângă această, fenomenul de androsterilitate este folosit pe larg la crearea de hibrizi pentru producție, fără a se efectua castrarea manuală a florilor, determinând o creștere a eficienței economice. Actualmente, se apelează din ce în ce mai des la posibilitatea creării genotipurilor androsterile prin utilizarea tehnicilor moderne de genetică moleculară [263]. Astfel, a fost obținut un nou tip de ASC la *Nicotiana tabacum* L. prin hibridizarea somatică a protoplastelor. Se efectuează selectarea formelor ASC prin metoda androgenezei spontane [105]. La plantele de tutun transgenic au fost obținuți mutanți androsterili prin introducerea în genom a unor gene ce codifică ribonucleaze, restaurarea fertilității fiind determinată, în acest caz, de prezența la liniile restauratoare a unui inhibitor al ribonucleazelor [23]. Astfel, introducerea genei *rolC* de la *Agrobacterium rhizogenes* în formele androfertile de tutun cauzează androsterilitatea acestora [189].

Tipuri de androsterilitate citoplasmatică. ASC poate fi întâlnită atât la plantele monoice, cât și dioice din clasa mono- și dicotiledonate, anuale și perene, cu mod diferit de reproducere (plante alo- și autogame). Varietatea mare de tipuri de ASC, precum și clasificarea diferită a acestui fenomen, implică necesitatea cunoașterii surselor, formelor de ASC, modalitatea de transmitere a acestora și a genelor implicate în disfuncția mitocondrială, soldată cu întreruperea procesului de microsporogeneză, rezultând androsterilitatea plantelor. În funcție de originea genomului citoplasmatic și nuclear care interacționează, pot exista trei tipuri de androsterilitate citoplasmatică [23]:

- autoplasmică – apare când genomul citoplasmatic și cel nuclear fac parte dintr-o populație genetică;
- homoplasmică – apare când genomul citoplasmatic și cel nuclear fac parte din populație genetice diferite din cadrul aceleiași specii;
- aloplasmică – apare la interacțiunea genomului citoplasmatic cu cel nuclear care fac parte din specii diferite.

Primele două tipuri de androsterilitate reprezintă o consecință firească a proceselor evolutive în natură, de exemplu, cazul ginodioeciei – coexistența indivizilor hermafrodiți și femeli (androsterili), întâlnită frecvent la angiosperme. Natura interacțiunii dintre plasmagene și genele nucleare, inevitabilă în restaurarea fertilității, poate fi explicată în contextul teoriei conflictului genomic [122]. În numeroase populații cu ginodioecie indivizii femeli produc cu mult mai multe semințe viabile decât indivizii hermafrodiți. Acest avantaj al fertilității feminine stă la baza evoluției modelului de ginodioecie. El poate fi cauzat de:

- efectele sexului matern, care măresc funcționalitatea sexului femel sau viabilitatea indivizilor androsterili;
- efectele inbreeding-lui, indivizii femeli nu se pot autopoleniza și produc mai multe semințe viabile decât indivizii hermafrodiți.

Acest tip de androsterilitate este cunoscut atât la speciile de plante din flora spontană, cât și la plantele de cultură. Androsterilitatea aloplasmică se obține frecvent din încrucișările interspecifice sau din încrucișările genurilor apropiate [230]. Se consideră, că sterilitatea masculină aloplasmică este condiționată de disfuncții în activitatea mitocondriilor, determinate de coordonarea inefficientă dintre genomurile citoplasmatic și nuclear la nivelul transcripțiilor (expresia genelor mitocondriale) sau asamblarea produselor de translație în complexul lanțului respirator. Expresia fenotipică a androsterilității determinată de interacțiunea dintre citoplasmă și nucleul unei specii donatoare variază destul de larg, fiind asociată uneori și cu conversii homeotice ale staminelor în alte organe florale - structuri carpeloide sau petaloide [23].

ASC la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.). Prima sursă de ASC a fost descoperită de Leclercq în 1969 în urma încrucișării interspecifice dintre *Helianthus petiolaris* și *H. annuus*. Datorită folosirii aproape exclusive a acestei surse de androsterilitate pentru obținerea de semințe hibride, toți hibridii din cultură sunt strâns înrudiți în baza citoplasmei [149]. Eforturile în domeniul ameliorării vizează în special creșterea variabilității genetice a hibridilor de floarea-soarelui, prin dezvoltarea de noi sisteme ASC. Se cunosc cel puțin 62 de surse noi de ASC la

floarea-soarelui. Multe din ele sunt derivate din încrucișări interspecifice, altele au apărut spontan în populațiile sălbatice de floarea-soarelui sau au fost obținute prin mutagenză. Analiza citoplasmei PET1 la floarea-soarelui a relevat, că liniile androsterile se deosebesc de analogii androfertili printr-o inversie de 11kb și o inserție de 5 kb. Datorită inversiei, *orf 873* este translocat din poziția sa în fața genei *cob*, iar în poziția *orf 708* are loc inserția unde se creează un nou cadru de citire cu 522 de nucleotide - *orfH522* [140]. Primii 19 aminoacizi codificați de această genă sunt identici cu gena *atp8* și prezintă o proteină de 15-16 kDa. S-a constatat că regiunea rearanjată a ADN mitocondrial este flancată de repetiții inverse de 261pb și prezintă omologie cu unele secvențe din ADN nuclear sau mitochondrial. Prezența a 57 de nucleotide de la *orfH708* în aval de gena *atpA*, ca parte a *orfH522* în liniile androstrile și a 223 pb din secvența codificatoare a regiunii 3' *orfH708* de o parte și de alta a inserției de 5 kb demonstrează faptul că inserția a avut loc în *orfH708* după inversia acestei regiuni. Datorită fenomenului de recombinare, cea mai mare parte a *orfH708* a fost deletată sau translocată în altă regiune a genomului mitochondrial [47].

Spre deosebire de proteinele asociate cu androsterilitatea, unele plante, polipeptidul de 16 kD codificat de *orfH522* a fost detectat atât în țesuturile vegetative, cât și în cele generative, rezultate, care demonstrează modul constitutiv și nu tisular specific de expresie a genei respective. Totuși în florile de floarea-soarelui cu fertilitatea restaurată, nivelul sintezei acestui polipeptid de 16 kD este mai redus, comparativ cu cel pentru linia androsterilă. S-a constatat, că micșorarea conținutului stoichiometric al cotranscriptului *atpA-orfH522* se datorează poliadenilării, marcându-l astfel ca substrat - ținta pentru ARN-aza2. Produsul genei nucleare de restaurare la nivel post-transcripțional destabilizează noul transcript mitochondrial, fenomenul având specificitate tisulară. Nu s-a observat editarea diferențială a *orfH522* ca rezultat al restaurării fertilității de către genele de restaurare.

Restaurarea fertilității la liniile androsterile de floarea-soarelui este controlată de aranjamente complexe de gene ce reacționează diferențiat cu liniile ASC. Studiile de transmitere a restaurării fertilității sunt puse în dificultate de genele complementare existente în unele linii parentale femele, dar și de genele prezente în liniile de restaurare a fertilității.

Principalele linii androsterile la floarea-soarelui. După 1999, s-au raportat cel puțin 62 de noi surse CMS la floarea-soarelui. Multe din ele sunt derivate din încrucișări interspecifice, în timp ce altele au apărut spontan în populațiile sălbatice de floarea-soarelui sau au fost obținute prin mutagenză. Toate sursele de androsterilitate citoplasmatică prezentate în tabelul 1.3 au fost caracterizate din punct de vedere al interacțiilor nucleu-citoplasmă [23, 106].

- 9 surse CMS originare din *H.annuus* sălbatică, apărute spontan: PI432513: ANN2101, ANN2108, ANN2112, ANN2141 sau din forme cultivate de *H.annuus*: CMS G, CMS DP, CMS VL, CMS AN-126, denumite conform FAO: CMS-ANN14, ANN15, ANN17, ANN18, ANN19, ANN20, ANN21, ANN22.

➤ 7 surse CMS provenite din hibridizări interspecifice:

- de la *H.resinosus*. Această linie CMS s-a descoperit la descendenții rezultați din încrucișările între *H. resinosus* 243 și floarea -soarelui cultivată. Generațiile BC3 și BC4 rezultate din încrucișarea între *H.resinosus* și HA89, RHA271 și RHA801 ca părinți recurenți a produs progeneri masculi sterili (cod FAO: CMS-RES1).
- de la *H.mollis* s-au obținut prin hibridizări interspecifice ale plantelor masculine sterile cu linia HA89, hibridi masculi sterili. Prin încrucișarea cu *H.debilis vestitus*, *H.annuus* RHA274 și prin polenizare deschisă s-au obținut 100% progeneri masculi sterili. Sursa CMS a fost denumită CMS-MOL1.

➤ 3 alte surse CMS derivă din:

- *H.strumosus*. Această linie androsterilă a fost obținută prin încrucișările interspecifice dintre *H.strumosus* și floarea-soarelui cultivată (cod: CMS-STR1).
- *H.argophyllus* (cod FAO: CMS-ARG4)
- *H.praecox sp. Praecox*. Încrucișările interspecifice între *H.praecox* și *H.annuus* produc în generația F3, plante masculine sterile. Backcrossurile cu liniile B au generat în multe cazuri 100% plante masculine sterile. Noua sursă a fost denumită CMS-PRP2.

➤ 2 surse CMS derivă din :

- *H.praecox*. Toate încrucișările care implică *H.praecox* cu *H.annuus* produc plante sterile (cod FAO: CMS-PRA I).
- *H.petiolaris*. Toate încrucișările care implică *H.petiolaris* și *H.annuus* produc plante sterile (CMS-PET5).

➤ 3 surse CMS au fost induse prin mutageneză (raze gamma): CMS MUT3, MUT4, MUT 5.

În tabelul 1.3 sunt prezentate speciile de origine ale câtorva linii CMS la floarea-soarelui.

Primii hibridi produși prin sistemul CMS-restauratori de fertilitate au fost introduși în SUA în 1972. După 5 ani aceștia au reprezentat 80% din totalul hibridilor. Ei se caracterizează printr-o producție cu 20% mai mare decât cea obținută de la floarea-soarelui cultivată normal. Hibridii au fost înalt self-compatibili, rezistenți la mană și uniformi ca înălțime și mărimea inflorescenței la maturitate. Hibridul 894 a fost unul dintre cei mai populari hibridi obținuți prin această metodă.

Tabelul 1.3.
Sursele CMS de la floarea-soarelui

Denumirea uzuală a liniei CMS	Denumirea speciei	Cod FAO
KOUBAN	<i>H.annuus lenticularis</i>	ANL1
INDIANA 1	<i>H.annuus lenticularis</i>	ANL2
VIR 126	<i>H. lenticularis</i>	ANL3
397	<i>H.annuus salbatic</i>	ANN1
517	<i>H.annuus salbatic</i>	ANN2
519	<i>H.annuus salbatic</i>	ANN3
521	<i>H.annuus salbatic</i>	ANN4
NS-ANN-81	<i>H.annuus salbatic</i>	ANN5
NS-ANN-2	<i>H.annuus salbatic</i>	ANN6
FUNDULEA 1	<i>H.annuus texanus</i>	ANT1
AN-67	<i>H.annuus</i>	ANN10
AN-58	<i>H.annuus</i>	ANN11
AN-2-91	<i>H.annuus</i>	ANN12
AN-2-92	<i>H.annuus</i>	ANN13
CMS-G	<i>H.annuus</i>	ANN15
CMS-DP	<i>H.annuus</i>	ANN16
CMS-VL	<i>H.annuus</i>	ANN17
HEMUS	<i>H.annuus</i>	MUT1
PEREDOVICK	<i>H.annuus</i>	MUT2
STADION	<i>H.annuus</i>	MUT3
ANOMALUS	<i>H.anomalus</i>	ANO1
ARGOPHYLLUS	<i>H.argophyllus</i>	ARG1
BOLANDERI	<i>H.bolanderi</i>	BOL1
DV-10	<i>H.debilis</i>	DEB-1
EXILIS	<i>H.exilis</i>	EXI1
EXI2	<i>H.exilis</i>	EXI2
CMG2	<i>H.giganteus</i>	GIG1
CMG3	<i>H.maximiliani</i>	MAX1
MOLLIS	<i>H.mollis</i>	MOL1
NEGLECTUS	<i>H.neglectus</i>	NEG1
CANESCENS	<i>H.niveus canescens</i>	NIC1
FALLAX	<i>H.petiolaris fallax</i>	PEF1
PET/PET	<i>H.petiolaris petiolaris</i>	PEP1
CMS clasica	<i>H.petiolaris Nutt.</i>	PET!
CMG1	<i>H.petiolaris Nutt.</i>	PET2
PETIOLARIS BIS	<i>H.petiolaris Nutt.</i>	PET3
PET34	<i>H.petiolaris</i>	PET4
PRAECOX	<i>H.praecox</i>	PRA1
PHIR-27	<i>H.praecox hirtus</i>	PRH1

Sursa de androsterilitate citoplasmatică descoperită de Leclercq (1969) este aproape exclusiv folosită ca sursă în ameliorarea curentă ca și pentru producția de semințe [149]. Sterilitatea controlată citoplasmatic nu are efecte adverse asupra caracterelor agronomice. Actualmente sunt disponibile peste 60 de surse CMS, dar nu toate prezintă restauratori de fertilitate iar câteva surse CMS au efecte negative asupra unor caractere agronomice [47].

1.3. Concluzii la capitolul 1

Multe culturi auto-fertilizante sunt deosebit de sensibile la factorii de stres abiotic și la unele molecule semnal în faza de reproducere, ce cauzează pierderi semnificative de recoltă în întreaga lume. Nivelurile de ABA și giberelină pot fi modificate de frig și secetă, ceea ce influențează formarea celulelor mamă polinice și programul de dezvoltare a stratului tapetal. Multe gene care participă la reglarea dezvoltării tapetale și a microsporului sunt supresate de aplicarea exogenă a fitohormonilor. Totodată asemenea cercetări permit înțelegerea mai profundă a mecanismelor de reglare a expresiei diferențiate ale genelor la plantele superioare.

Așadar, studiul efectului aplicării exogene a giberelinei asupra microsporogenezei la floarea-soarelui *Helianthus annuus L.* poate fi realizat prin soluționarea următoarelor obiective:

- 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.

2. MATERIALUL ȘI METODELE DE CERCETARE

Cercetările în scopul stabilirii acțiunii giberelinei asupra microsporogenezei, la floarea-soarelui, la nivel genético-molecular au fost efectuate în laboratorul Genomică, Centrul Genetică Funcțională, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir” (Ex-Universitatea Academiei de Științe). Investigațiile prin metode și tehnici de analiză microscopică au fost realizate în laboratorul Biotehnologiei Vegetale, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, pe parcursul anilor 2011-2014.

2.1. Caracteristica materialului de cercetare

Obiectul de studiu, caracteristica generală. Pentru investigarea particularităților microsporogenezei la plantele de floarea-soarelui fertile, cu androsterilitate citoplasmatică (ASC), inclusiv efectul de acțiune al giberelinei asupra dezvoltării gametofitului masculin au fost luate în studiu două linii de *Helianthus annuus* ($2n=34$), genetic diferite (dupa gena *Rf*), 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) tratate 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) [29] direct pe inflorescența în faza de butonizare R-2 [207] în raport cu un număr similar de plante – martor (stropite cu apă distilată).

Cercetările mai multor autori privind obținerea unui grad maxim de androsterilitate indusă de gibereilne au pus în evidență diferite corelații dintre stadiul de dezvoltare a organelor generative, concentrația gametocidului și gradul de precocitate ale genotipului studiat. Din aceste considerente, identificarea etapei de dezvoltare reproductivă optime pentru inducerea androsterilității (ASI) prin aplicarea exogenă a AG_3 , s-a realizat printr-o analiză citologică (preventivă) a anterelor colectate din calatidii cu dimensiuni diferite (1,5-2,7 cm). Astfel, pentru a obține plante cu ASI au fost tratate inflorescențe care conțineau antere aflate în premeioză (calatidii cu diametrul de 2,2-2,5 cm, măsurat cu bractee și 1,6-2,0 cm respectiv, fără bractee).

Suplimentar analizei citologice a anterelor în diferite faze ale dezvoltării, 20-25 plante (cu inflorescență sub izolator) din fiecare caz experimental au fost monitorizate până la faza R-5 de înflorire, pentru confirmarea fenotipului fertil sau steril al plantelor martor și respectiv, tratate.

Condițiile de cultivare. Modelul experimental a constat în blocuri randomizate, fiecare parcelă cu 6 rânduri a câte 25 plante/rând cu distanța de semănat de 70 x 35 cm, fiind respectată tehnologia de cultivare recomandată pentru această cultură agricolă [248]. Creșterea și dezvoltarea plantelor a fost monitorizată în funcție de etapele fenologice principale VE, V, R1-5 [207] pentru a controla și evita dezvoltarea bolilor.

Condițiile climaterice. Vara anului 2011 în Republica Moldova a fost caldă și izolat cu deficit de precipitații. Temperatura medie a aerului a constituit +20,1.+22,2°C. Cantitatea de precipitații căzută pe 60% din teritoriul republicii (inclusiv regiunea municipiului Chișinău) a fost în normă, constituind 170-235 mm [297].

2.2. Metode de cercetare

2.2.1. Analiza macroscopică

Cercetarea fazelor succesive ale microsporogenezei și gametogenezei s-au efectuat pe aceeași inflorescență, prin selectarea și detașarea manuală a florilor tubulare de diferite dimensiuni, mai mici de 1 mm și de la 1 mm până la 5 mm.

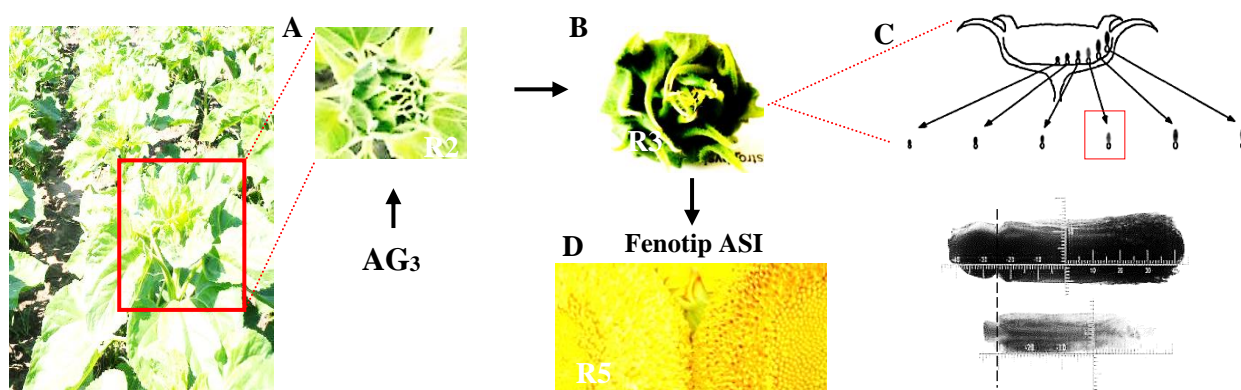


Fig. 2.1. Prezentare schematică a etapelor de obținere a probelor experimentale.

Notă: A- calatidii în faza de butonizare, tratate cu AG₃; B- calatidiu cu dimensiunea de 4,5 cm, care conține flori tubulare cu stamine în diferite faze ale micro- și macrosporogenezei; C- schema unei secțiuni și modul de pelevare a materialului experimental; D- fenotipul cu ASI în aspect comparativ cu cel fertil.

Butonii florali și anterele au fost măsurate inițial cu șublerul digital și ulterior la microscop (x64) prin intermediul programului de analiză morfometrică *Future Win Joe* (Future Optics Sci. & Tech. Co., Ltd). Măsurările au fost efectuate de la punctul de inserare a ovarului până la vârful butonului floral, iar în cazul anterelor - de la începutul filamentului (terminația bazală), până la vârful anterei (terminația apicală) (Figura 2.1).

Colectarea și conservarea probelor de material vegetal. Preliminar etapei de colectare a materialului experimental (Tabelul 2.1), au fost efectuate o serie de măsurări liniare a calatidiilor

și în secțiune a butonilor florali, pentru a identifica perioada optimă de analiză a inflorescențelor din care vor fi colectate flori cu antere în diferite etape ale microsporogenezei.

Tabelul 2.1.
Materialul biologic utilizat în analize la nivel citologic, histologic și molecular la plante fertile și sterile

Tipul de analiză	Material experimental inclus în studiu	Nr. de repetiții* (plante)	Nr. de probe analizate	
			pentru un caz exp.	total, 10 caz. exp.
Analiza macroscopică – stabilirea perioadei optime de aplicare a AG ₃ – stabilirea perioadei optime de analiză a inflorescențelor cu stamine (control și tratate) în diferite faze ale micro- și macrosporogenezei	Calatidii de 1,5-5,0 cm, flori tubulare mai mici de 1,0 mm și 1,0- 5,0 mm.	5	5 (1x5)	25
		5	5(1x5)	50
Analiza citologică - fazele meiozei (5 faze) morfometria meiocitelor și celulelor tapet (5 faze) - gradul de fertilitate a polenului prin colorare cu carmin acetic	preparate citologice temporare ale anterelor	3	225 (3i x 3b x 5f x 5a)	2250
			15 (3i x 5a)	150
Analiza moleculară Expresia a 11 gene, inclusiv gena de referință	probe de ARN total, probe de ADNc, Produce RT-PCR	3	3	30
			3 144 (3i x 11g x 4f)	30 1440

Notă: *sunt prezentate doar repetițiile biologice și nu sunt incluse în calcul repetițiile tehnice; i- inflorescențe; b – butoni floral; f-faze ale microsporogenezei; a-antere; g- gene.

Astfel, a fost stabilit că inflorescențele de interes pentru cele două linii analizate (tratate și netratate) sunt cele din faza R3 cu dimensiunea de 4,5 cm în diametru (Figura 2.1,B). De asemenea, un alt aspect important în asigurarea relevanței și reprezentativității datelor experimentale, constituie prelevarea materialului biologic calitativ și în cantități suficiente, fapt care a condiționat investigarea unui volum de material și număr de repetiții diferit în funcție de tipul de analize (Tabelul 2.1.).

2.2.2 Metode microscopice de cercetare

Obținerea preparatelor pentru analiza citologică. În fiecare caz experimental au fost analizate secțiuni din inflorescențele a trei plante din care s-au colectat butoni florali pentru fiecare valoare a dimensiunii investigate, corelată cu fazele microsporogenezei.

Anterele au fost fixate în etanol - acid acetic (3:1) la temperatura camerei pentru 12-24 ore, și ulterior supuse spălării în mai multe reprize (fiecare a câte 15-20 minute) cu alcool etilic de 70%. Preparatele provizorii au fost obținute prin metoda picăturii strivite și colorate în acetocarmină de 1%. Pentru asigurarea unei colorări mai intense, anterele au fost imersate în alaun

de fier de 8% timp de 40-60 minute.

Examinarea microscopică a diviziunilor meiotice și a evoluției în dezvoltarea grauncoarelor de polen, inclusiv obținerea fotografiilor s-a realizat la microscopul fonic (XSZ-206T, Ningbo Wason Optical Instrument Co.,Ltd) dotat cu camera CCD (MEM1300, Future Optics Sci. & Tech. Co., Ltd). Pentru analiza optică a preparatelor citologice au fost utilizate obiectivele cu factorul de mărire 10X, 40X, 100X la ocularul de 16X.

Obținerea preparatelor pentru analiza secțiunilor transversale semifine. Pentru studiul histologic al dezvoltării gametofitului masculin la plantele fertile, cu ASC și ASI au fost preparate secțiuni transversale ale anterelor de floarea-soarelui prin metode standard de incluzionare a materialului biologic în rășini și care în mod rezumativ includ procesele de:

1. **prefixare a probelor** în soluție de glutaraldehidă 2,5% în tampon cocodilat 0,1 M (pH 7,4) în decurs de 4 ore;
2. **spălarea probelor** în soluția tampon cacodilat de 0,1N, de 2 ori, a câte 15-20 min., pentru oprirea procesului de fixare și îndepărtarea excesului de fixator;
3. **postfixare a probelor** în decursul a 2 ore în soluție de OsO₄ de 1%;
4. **deshidratarea preparatelor** prin băi succesive de alcool etilic de diferită concentrație (30%; 40%; 50%; 70%; 90% și 100%) timp de 15 minute/concentrație. Pentru contrastare prealabilă în soluția de etanol de 70% a fost adăugat uranilacetat de 2%;
5. **incluzionarea în rășini epoxidice** desfășurată la temperatura camerei, timp de 24h în trei etape într-un amestec format din: EPON și propilenoxid. Polimerizarea rășinii epoxidice se realizează la + 67 °C, timp de 3 zile;
6. **piramidarea blocurilor** pentru a îndepărta surplusul de rășină care ar împiedica secționarea.
7. **secționarea blocurilor** realizată cu un cuțit de sticlă prin utilizarea ultramicrotomului Ultracut-R (UMTP4), fiind obținute secțiuni semifine de cca 0,70 μm și fixate ulterior pe lame portobiect pentru a fi studiate;
8. **colorarea secțiunilor** s-a realizat cu soluția de albastru de toluidină printr-o serie de proceduri consecutive ce includ tratarea termică (60°C timp de 10-30 min), spălarea în apă curgătoare și în acetonă 100%, imersarea în xilol, deshidratare prin sugativare;
9. **examinarea micropreparatelor** la microscopul fonic și fotodocumentarea s-a realizat la microscopul optic (XSZ-206T, Ningbo Wason Optical Instrument Co.,Ltd) dotat cu camera CCD (MEM1300, Future Optics Sci. & Tech. Co., Ltd).

2.2.3. Tehnici de analiză moleculară

Materialul biologic utilizat în studiul expresiei genelor a constituit butonii florali cu antere în diferite faze ale microsporogenezei (pachiten, diviziuni (metafaza I până la telofaza II), tetrade și microspor) colectați (cu ovarul secționat) de la inflorescențele din faza R3 și congelați imediat în azot lichid.

În fiecare caz experimental au fost utilizate anterele a trei plante separate (repetiții biologice) pentru izolarea ARN, obținerea ADNc și amplificarea cu primeri specifici în timp real (Real-Time PCR).

Izolarea ARN-ului s-a efectuat prin omogenizarea materialului în azot lichid și incubare cu *TRI Reagent (Ambion, Applied Biosystems)* conform recomandărilor producătorului. Purificarea probelor de ARN s-a realizat succesiv prin operații repetate de centrifugare, separare a fazelor cu cloroform, sedimentare cu izopropanol și etanol. Precipitatul de ARN a fost dizolvat în apă sterilă, tratată cu dietilpirocarbonat (30 μ l) și păstrat pentru analizele ulterioare la temperatura de -80°C .

Controlul calității probelor de ARN total s-a realizat prin metoda spectrofotometrică (puritatea) la 260, 280 și 230 nm și electroforeza (integritatea) în gel de agaroză de 1,4%, în prezența aldehidei formice. În calitate de soluție de migrare a fost utilizată soluția apoasă MOPS (1X) obținută din reagentul MOPS (10X): 400 mM MOPS, 100 mM acetat de sodiu și 10 mM EDTA- Na_2 . Probele au fost denaturate la 70°C timp de 5 min, preliminar separării prin electroforeză la tensiunea de 140 V. În calitate de marker molecular a fost utilizat RiboRuler High Range RNA Ladder, Ready-to-Use (*Fermentas*).

Obținerea ADNc

Pentru a obține ADNc calitativ (necontaminat cu ADN genomic), preliminar procesului de revers-transcripție, probele de ARN total (0,6 μg) au fost tratate cu RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 30 min la 37°C , conform recomandărilor producătorului.

Reacțiile de revers-transcripție au fost realizate la amplificatorul (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) prin incubarea probelor de ARN timp de 10 min la 25°C și 60 min la 42°C cu RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas) în soluția tampon corespunzătoare, în prezența primeriilor Oligo (dT)₁₈ (Fermentas), Random Hexamer (Fermentas) și alte componente ale mixului de reacție conform recomandărilor producătorului.

Probele de ADNc obținute, preliminar utilizării în reacțiile de amplificare în calitate de matriță cu primeri specifici, au fost diluate cu apă sterilă (nuclease free) în raport de 1:5.

Analiza nivelului de expresie a genelor (Real – Time PCR)

Expresia genelor de interes a fost analizată prin metoda PCR-lui cantitativ în timp real (qPCR) la amplificatorul cu detecția automată a fluorescenței DT-96 (DNA technology, Rusia).

Reacțiile de amplificare au fost realizate într-un volum de 25 μl care conținea 300 nM /0,3 μM de primeri specifici genelor de interes, 2 μl de ADNc și reagentul Maxima SYBR Green/ROX PCR Master Mix (Fermentas) conform recomandărilor producătorului.

Pentru cuantificarea transcripțiilor codificați de cele 10 gene studiate a fost utilizată aceeași probă de ADNc/variantă experimentală.

Programul de amplificare a constituit: 95°C – 10 minute; 5 cicluri la 95°C – 15 secunde și 64°C – 20 secunde urmate de 40 cicluri la 95°C – 15 secunde și 60°C – 40 secunde. Detecția fluorescenței s-a realizat în decursul elongării. În schema experienței au fost incluse probe de control negativ: care în calitate de matriță a servit ARN netranscris pentru a confirma absența ADN-lui genomic și probe în care a lipsit ADNc din mediul de reacție, în scopul verificării unei eventuale contaminări a mixului de reacție.

Reacțiile RT-PCR au fost realizate în trei repetiții tehnice pentru fiecare repetiție biologică. Lipsa produselor de amplificare nespecifică a fost confirmată prin analiza curbelor de disociere și electroforeză în gel de agaroză de 1,4 % soluția tampon - Tris-acetat-EDTA (TAE) conform protocolului standard, Marker ADN utilizat - MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

În calitate de genă de referință s-a utilizat gena actinei florii-soarelui (numărul de acces în baza de date NCBI: AF282624.1). Utilizarea genelor de referință este indicată pentru a ține sub control variațiile determinate de cantitatea, calitatea, integritatea ARN și eficiența reacției de revers-transcriere. Determinarea valorii Ct și a nivelului relativ de expresie a genelor studiate (exprimat în unități convenționale) s-a realizat prin programul Real Time_PCR v7.3 (DNA technology, Rusia). Pentru interpretarea diferențelor cantitative în expresia genelor de interes s-a apelat la metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ [152], modificări ale nivelelor de transcriere s-a realizat prin determinarea fold change (FC) dintre plantele cu androsterilitate indusă și plantele fertile, plantele cu androsterilitate citoplasmatică și plantele fertile.

2.2.4. Proiectarea *primeri*-lor specifici genelor de interes.

Secvența nucleotidică a primerilor specifici pentru genele de interes și cea de referință, utilizați în reacțiile de polimerizare prin RT- PCR a fost stabilită pe baza secvenței disponibile în bazele de date ale NCBI (National Center for Biotechnology Information) [296].

Pentru alegerea secvenței optime de oligonucleotide au fost utilizate programul Primer3Web v. 3.0.0. [292] și aplicația OligoAnalyzer 3.1 [295], respectând criteriile pentru Real-Time PCR cu SybrGreen.

Tabelul 2.2.
Primerii utilizați în identificarea secvențelor codificatoare a genelor de interes

Gena/EST	Nr. de acces GenBank	Secvența primerilor specifici S/A 5' → 3'	Dimensiunea ampliconului, pb
Ha Actin	AF282624.1	gctaacagggaaaagatgactc actggcataaagagaaagcagc	96
Ha cyclin D3	AY033440.1	tcatcttcattgggatttcttc gggtcgatttctctacaacac	135
CCFT9238.b1_K05.ab1	GE514022.1	tgagttgctgggtcatgttt atgttgcaaggagggttg	152
CHAY11842.b1_D10.ab1	DY915941.1	tggaagagaagcgggaga tccagcacaactgggaaga	209
CCFS4185.b1_B16.ab1	GE489553.1	atggtgcaatggaatcagg aggctgtggaatccagaaag	92
CCFS6501.b1_J18.ab1	GE494361.1	tgtgagcaaagcctccaag ccgacatcccacctttt	127
DH0AFF22ZF12ZZM1	CD856124.1	acgagaaaggcggatcaag tgcagtgcctagcgtttcc	100
DH0ALL23ZG05ZZM1	CD852039.1	gtaagcaactggcgacgaa gagcctctgaaagggaact	161
CCFU663.b7_M22.ab1	GE521943.1	acgagccaattttgactg cctccgatctgagaagca	97
CHWM9916.b1_H08.ab1	EE622917.1	tcttgctgagggtgaaaa ttaagctctcggtgtttgga	102
DH0AC015ZD03FM1	CD849086.1	caaaagcccacgcattct gggctgctgatctgacct	145

În tabelul 2.2 sunt prezentate denumirea și numărul de acces ale genei/EST, secvența primerilor specifici și dimensiunea produsului de amplificare.

2.2.5. Prelucrarea statistică a datelor experimentale

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic prin calcularea următorilor parametri: media aritmetică \bar{x} , varianța s^2 , abaterea medie pătratică s , coeficientul de variație V , eroarea mediei $s_{\bar{x}}$ [288]. Toate datele sunt prezentate ca medie \pm eroarea standard a mediei (SEM). Diferențele au fost evaluate prin testul t , în cazul activității transcripționale genele considerate statistic semnificative au avut un fold change de $\leq -1,5$ sau $\geq 1,5$ și valoarea lui p sub 0,05.

2.3. Concluzii la capitolul 2

1. Valorile numerice ale dimensiunii butonului floral și al anterei corelate cu etapele microsporogenezei au fost estimate prin utilizarea metodelor macro - și microscopice în vederea obținerii probelor experimentale.
2. Pentru stabilirea particularităților hitoanatomice ale dezvoltării anterelor de floarea – soarelui a fost aplicată metoda de ultramicrotomare.
3. Evaluarea profilului citogenetic al diviziunii meiotice la liniile fertile și sterile de floarea – soarelui, ce includ caracteristicile morfometrice ale celulelor sporogene, aberațiile cromozomiale, anomalii ale tetradelor și viabilitatea polenului a fost realizată prin metoda microscopiei optice.
4. În vederea identificării și evaluării genelor implicate în microsporogeneza la *Helianthus annuus* L. au fost utilizate următoarele metode: analiza bioinformatică a genelor de interes, extragerea ARN-ului, spectrofotometria și electroforeza în gel de agaroză a ARN-ului, PCR cantitativ.
5. În scopul validării datelor obținute au fost utilizate un șir de metode statistice de prelucrare a datelor.

Strategia generalizată a investigațiilor la nivel citologic, histologic și molecular, prezentate în lucrare poate fi redată astfel: Figura. 2.2:

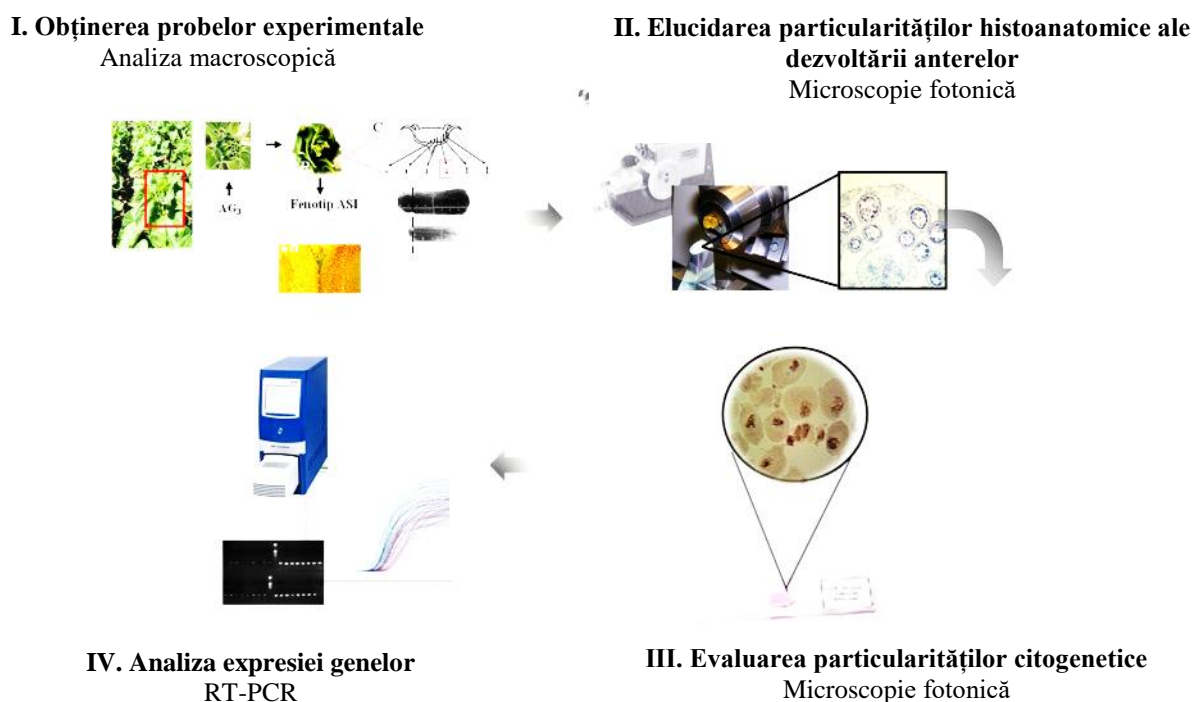


Fig. 2.2. Metodologia de cercetare prezentată schematic

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 [154].

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 [212]. 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 R. Horner, 1977 [107].

În cazul investigațiilor care prevăd microsporogeneza este necesară verificarea prin analiză citologică a corespunderii stadiilor meiozei cu markerul morfologic pentru fiecare genotip și ulterior estimarea unui interval de valori numerice cu limita de acoperire a fazelor/subfazelor pentru excluderea stărilor de tranziție (Figura 3.1).

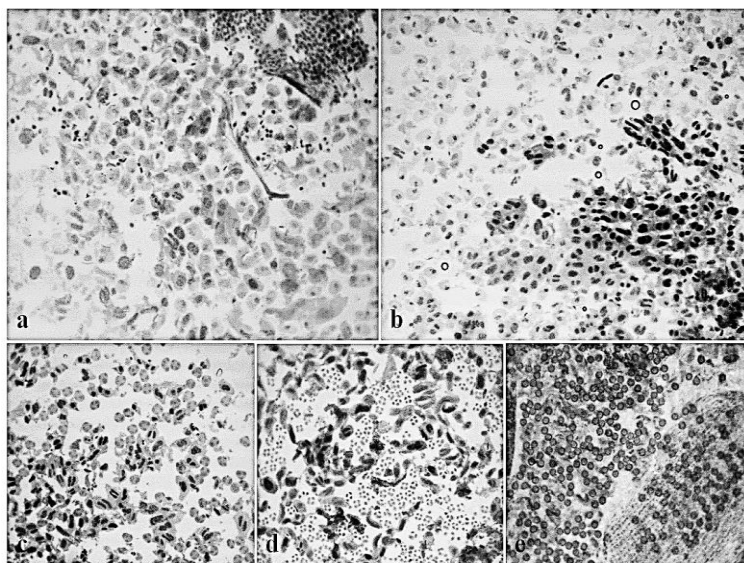


Fig. 3.1. Etape în care este evident un grad mai mare de sincronizare în evoluția meiocitelor/microsporilor la linia fertilă. X160

Notă: a – leptoten; b – pachiten; c – diviziuni; d – tetrade; e – microspor.

Analiza preparatelor citologice a pus în evidență fazele de diferențiere a meiocitelor până la grăunciorul de polen în cazul plantelor fertile (Figura 3.1) sau până la etapa de degradare a acestora (pachiten) la cele sterile. 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 [38, 148, 216].

Astfel, butonii floralii cu dimensiuni mai mici ca 1,0 mm conțin sporocite în premeioză, iar cei de 1,0 mm conțin preponderent meiocite în leptoten. La această etapă, rețeaua de cromozomi subțiri (spirem) s-a evidențiat la ambele linii izogene. Odată cu creșterea butonului floral (1,2 - 1,4 mm), crește și numărul meiocitelor în faza zigoten. Tranziția zigoten - pachiten (Figura 3.2, II) este caracterizată prin creșterea în dimensiune a butonului cu 15-20%. Populația heterogenă de meiocite în subfazele zigoten și pachiten devine omogenă în florile tubulare de 1,5 mm, care conțin preponderent meiocite în pachiten, tablou caracteristic pentru formele fertile sau sterile.

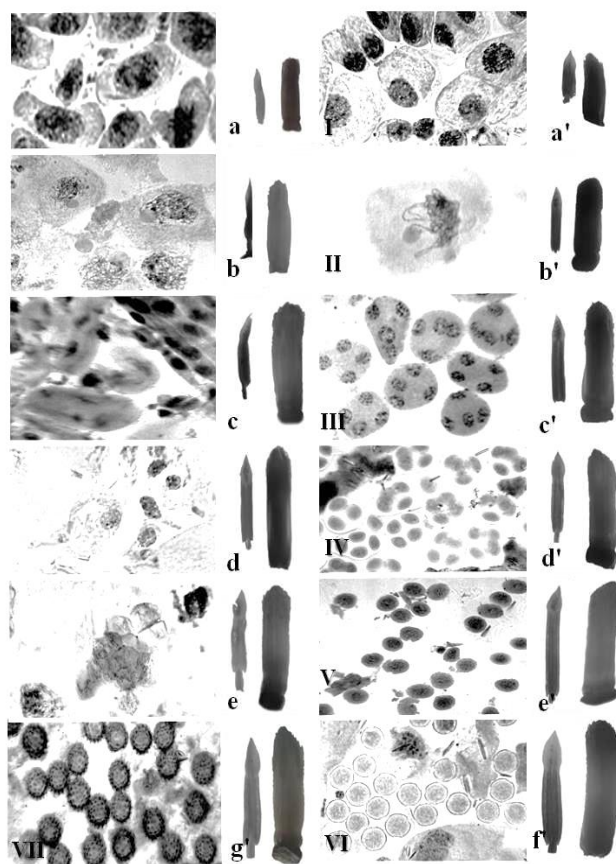


Fig. 3.2. Dimensiunea butonilor floralii (X64) și anterelor de floarea-soarelui asociată cu fazele de dezvoltare a CMP și polenului (X640).

Notă: I – leptoten; II – pachiten; III – diviziuni; IV – tetrade; V – microspor tânăr; VI – polen uninucleat. Linia SW501ASI: a – e; linia SW501: a' – e', g și f.

Creșterea și dezvoltarea ulterioară a organelor generative este asociată cu trăsături specifice microsporogenezei florilor fertile și sterile. Astfel, examinarea microscopică a microsporangiiilor la linia izogenă SW501ASC atestă distrugerii ale meiocitelor în subfazele pachiten, pachiten-diploten în proporție de 80-90%, care rămân blocate pe tot parcursul diviziunilor meiotice. Totuși, unii butoni florali cu dimensiuni mai mari de 2,5 mm conțin un număr mic de microsporocite în diachineză, metafază, anafază, telofază din ambele diviziuni meiotice, toate prezentând alterări ale formei, dimensiunii, anomaliilor și aberațiilor ale cromozomilor etc. Evenimentele celulare constatate se soldează cu sterilitatea deplină a liniei SW501ASC.

La plantele fertile, diachineza în tranziție spre metafază și următoarele faze succesive din meioza reduțională, inclusiv cele ale meozei ecuacionale, premergătoare formării tetradelor au fost observate în preparatele obținute din butonii florilor tubulare de 2,4-2,9 mm. Anterele, în aceste faze ale meozei, care decurg foarte rapid comparativ cu profaza I, conțin populații mixte de meiocite, din care cauză, în studiul nostru au fost incluse într-o fază generală - diviziuni.

O sincronizare evidentă în meioza II a meiocitelor la toate plantele studiate a fost observată în faza de tetrade, identificată în anterele din florile tubulare cu dimensiuni începând de la 3,0 mm la linia SW501. Faza de microspor tânăr și etapele ulterioare de dezvoltare a sporilor până la polenul matur au fost constatate la anterele din butonii florali mai mari de 3,5 mm.

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 (x64) demonstrează o relație de linearitate *buton floral-anteară*, cu valori pozitive înalte ale coeficientului de corelație (r) mai mari de 0,97 și a coeficientului de regresie liniară (R^2) mai mari de 0,95 (Figura 3.3).

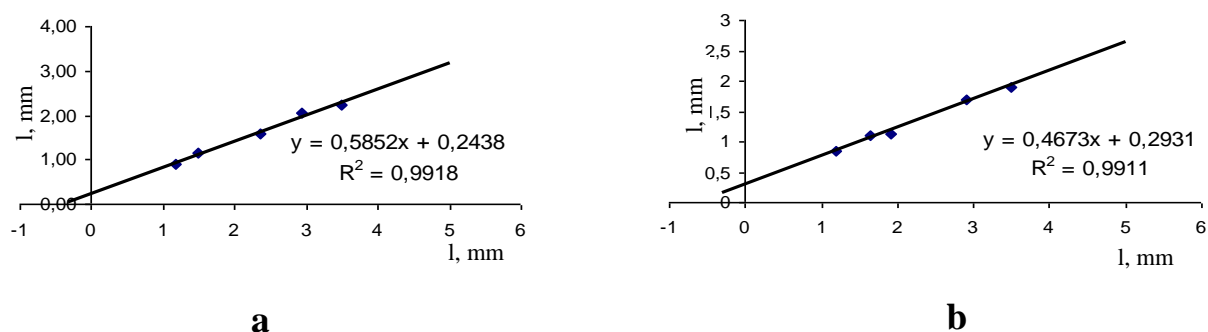


Fig. 3.3. Corelația liniară dintre ritmul de creștere și dezvoltare a anterelor și butonului floral.
 Notă: a – linia SW501, b – linia SW501ASC, Axa ordonatelor – lungimea anterei, mm; axa absciselor – lungimea butonului floral, mm.

Rezultatele demonstrează un nivel înalt de potrivire a dreptei de regresie cu datele reale, ceea ce indică asupra acurateții 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 [65]. Pentru o precizie mai mare, atunci când cercetarile prevad subetape ale fazelor în care diviziunile decurg asincron, lungimea anterei în calitate de criteriu este mai oportună în comparație cu cea a butonului floral, dar acest fapt implică dificultăți tehnice în colectarea materialului în cantități mai mari pentru diverse analize biochimice și moleculare, cu păstrarea condițiilor de asigurare a calității înalte a acizilor nucleici în special a ARN-ului.

Identificarea și descrierea/stabilirea caracterelor morfologice ale organelor reproductive în calitate de indicator pentru determinarea stadiului de dezvoltare al microsporului este descrisă într-un șir de lucrări de specialitate [38, 187, 123]. Astfel, la *Nicotiana* există o relație de dependență între stadiul de dezvoltare al anterei și lungimea mugurelui floral [105]. La tomate (*Lycopersicon esculentum*), atât lungimea anterei cât și a butonului floral este corelată semnificativ cu stadiul de dezvoltare și creștere a anterei [205].

Mai mulți parametri morfologici, inclusiv media celor două petale mari la *Lesquerella fendleri* (familiei *Brassicaceae*), sunt corelați cu stadiul de microspor [271]. Ivers și colab., 1974, pentru prima dată au stabilit caracteristicile externe ale butonului floral la soia (*Glycine max*) corespunzătoare cu etapa microsporogenezei [116], deși observațiile realizate de către Sunderland (1974) indică precauție în utilizarea acestui indice ca criteriu de identificare a etapelor de dezvoltare [222]. Rezultate contradictorii au fost constatate și la *Datura*, unde stadiul microsporilor variază de la plantă la plantă la aceeași dimensiune a butonului floral. Aceste variații sunt determinate de vârsta plantei/precocitate, factorii de mediu, etc [222].

Expresia fenotipică a androsterilității citoplasmatică la nivel celular este diferită în funcție de genotip și de factorul care determină sterilitatea polenului. De exemplu, Paun (1974) a descris blocarea microsporogenezei la floarea-soarelui în premeioză la patru linii sterile [188], iar Meric (2003) a constatat degenerarea meiocitelor la linia sterilă în faza de tetrade [167].

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 dimensiunii florilor/anterelor cu fazele meiozei, separat pentru fiecare genotip.

3.2. Histoanatomia microsporangiumului la plantele de floarea-soarelui

Identificarea particularităților de structură a gametofitului masculin în cursul dezvoltării reproductive reprezintă unul din obiectivele de studiu al microsporogenezei la plantele de floarea-soarelui fertile și cu sterilitate masculină, care s-a realizat în asociere cu investigațiile citogenetice. 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 meiocitelor (Figura 3.4a-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.

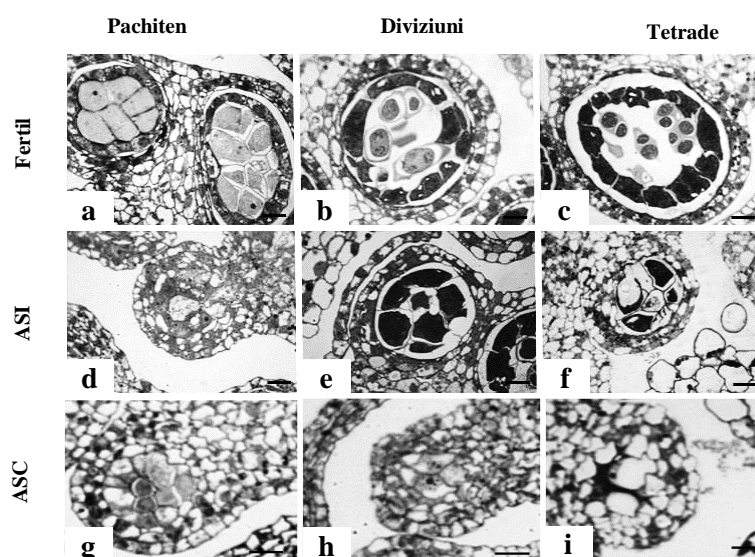


Fig. 3.4. Secțiune transversală a anterelor de floarea-soarelui a liniei SW501 și SW501ASC.

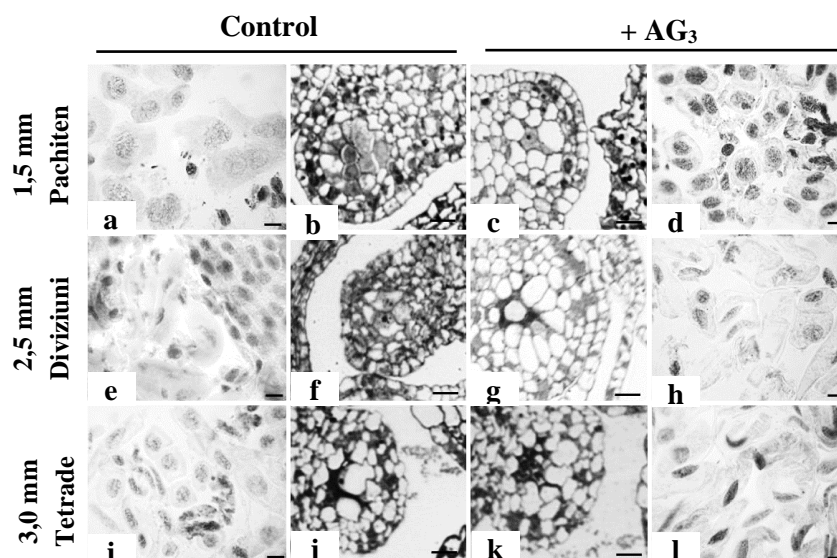
Notă: a – stadiul pachiten la linia SW501, celule tapetale (T) cu puține vacuole mici; b – celulele mamă polinice (CMP) în faza de diviziuni la plantele martor; c – loculi anterei în stadiul de tetrade, tetradele (Td) sunt înglobate în stratul de caloză, celulele tapetale (T) sunt binucleate (N) și conțin un număr mic de vacuole (V); d – stadiul de pachiten la plantele tratate; e – stadiul de diviziuni la plantele tratate, straturile de mijloc și tapetal sunt puternic vacuolizate; f – anterele plantelor cu androsterilitate indusă în stadiul de tetrade, doar câteva tetrade pot fi observate, stratul tapetal începe să degradeze; g - faza pachiten – linia SW501ASC, încep să apară primele semne de degradare a meiocitelor; h – etapă de diviziuni, țesut sporogen și tapetal dens; i – faza de tetrade, straturile tapetal și sporogen aglutinat la centrul lobului anterei. Scara: 50 μm.

Tratarea cu AG_3 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 endoteciu au prezentat deformații cu diferit grad de severitate, iar statul tapetal a manifestat o formă distorsionată cu semne de colaps prematur. Populațiile heterogene de meiocite, 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: microsporii 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.

La linia cu androsterilitate citoplasmică SW501ASC au fost relevate disfuncționalități evidente în pachiten. În majoritatea celulelor mamă polinice, meioza este inițiată și aparent decurge normal până la faza leptoten, însă doar un număr mic de celule ajung în faza pachiten. Spre deosebire de analogul fertil, la linia cu sterilitate citoplasmică numărul celulelor sporogene antrenate 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 3.4, h, i, j).

La plantele cu ASC, AG_3 a inhibat dezvoltarea post-histogeneză a țesuturilor microsporangiumului, inclusiv a celui sporogen, astfel încât în meiocite nu a fost inițiată meioza. Ulterior chiar în faza de pachiten țesutul tapetal este puternic hipertofiat, cu particularități apoptotice accentuate caracteristice și celorlalte straturi ale anterei.

Aspectele histoanatomice ale microsporogenezei au fost studiate la un șir de plante sterile și fertile (petunie [282], rapiță [170], orz [158], ceapă [243], soie [116]). La unele linii și hibrizi de floarea-soarelui, de asemenea au fost descrise particularitățile pereților anterelor și originea procesului abortiv al polenului [107, 188]. Studiul histoanatomic comparativ al microsporangiumului de floarea-soarelui la linia izogenă fertilă, cu androsterilitate indusă prin aplicarea exogenă a giberelinei și sterilă reprezintă o premieră. Astfel, zonalitatea histoanatomică a microsporangiumului exprimată prin: epidermă, endoteciu, straturile median și tapetal confirmă principiul identității anterelor fertile.



3.5. Secțiuni transversale ale anterei la plantele cu ASC (SW501ASC).

Notă: a, b – faza pachiten, încep să apară primele semne de degradare a meiocitelor, e, f – etapă de diviziuni, țesut sporogen și tapetal dens, i, j – faza de tetrade, straturile tapetal și sporogen aglutinat la central lobului anterei c, g, k – faza de pachiten, de diviziuni și tetrade la plantele tratate, la toate fazele tapetul și țesutul sporogen degradate și aglutinate, epiderma, endoteciul și stratul de mijloc par să nu aibă modificări semnificative, d, h, l – diferite stadii ale microsporogenezei cu meiocite blocate în premeioză. a, e, i, d, h, l – scara 10μ, b,c f, g, j, k – Scara 50 μ.

La plantele sterile au fost evidențiate transformările selective și succesive ale anterelor. Astfel, la plantele cu ASI straturile epidermic și endoteciul au prezentat deformații cu diferit grad de severitate în profaza I, faza de diviziuni și tetrade, iar statul tapetal a manifestat o formă distorsionată cu semne de colaps prematur incompatibile cu fertilitatea polenului. La plantele cu ASC efectul pronunțat de accelerare a degenerării țesuturilor microsporangiului s-a evidențiat începând cu faza timpurie, iar în faza de tetrade au manifestat o tendință accentuată de aglutinare, iar tapetul a fost exagerat de hipertrofiat cu grad sporit de poliploidizare.

Caracteristica citologică a celulelor mamă polinice și a stratului tapetal la plantele fertile, cu androsterilitate indusă și androsterilitate citoplasmatică. La linia fertilă SW501 meiocitele generate din celulele țesutului sporogen se individualizează prin formarea unui perete calozic fin, care treptat în perioada incipientă a meiozei I se separă atât între ele, cât și de stratul tapetal. La această fază a microsporogenezei celulele tapetale se află în diferite stadii ale mitozei, preponderent în profază.

În faza leptoten majoritatea celulelor tapetale sunt uninucleate. În următoarea fază – pachiten, tapetumul este colorat mai intens, binucleat și mai rar cu trei sau patru nuclee de dimensiune și formă diferită: sferică, ovală sau alungită (Figura 3.6, a, b).

La sfârșitul meiozei II printr-o citochineză simultană și depozitarea calozei se separă patru

nuclei haploizi formându-se tetradele cu microspori. (Figura 3.6, d). Plasmalema fiecărei celule tapetale devine din ce în ce mai alungită, astfel încât se extinde în interiorul lojei staminale, rămânând totuși periferică. Spre sfârșitul fazei de tetrade aceste celule cu formă neregulată, aspect de plasmodiu și cu nuclee intens poliploidizate sunt separate una de alta pe suprafețele lor radiale, în timp ce stratul median este subțire și degenerat.

Microspori bine conturați, colorați intens, au fost observați, după digestia peretelui calozic, în microsporangium anterelor din florile fertile mai mari de 3,5 mm (Figura 3.6, e).

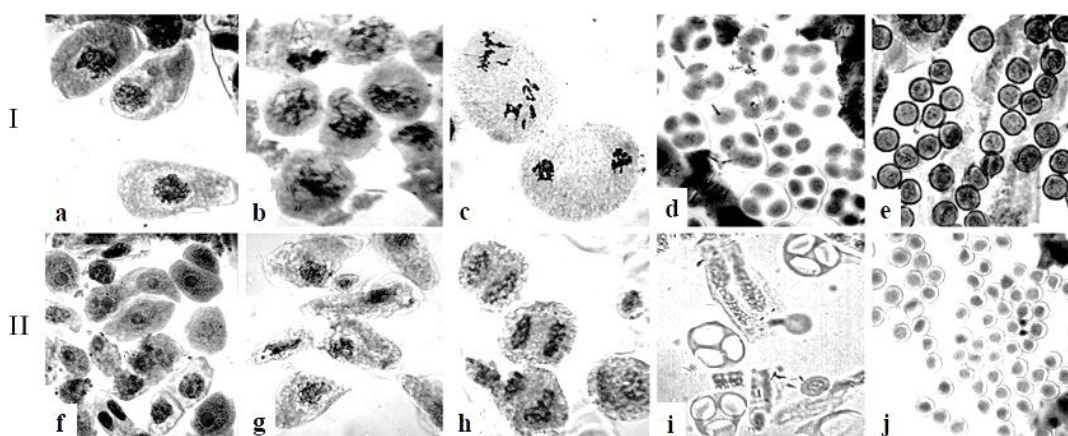


Fig. 3.6. Celule mamă polen în diferite etape ale microsporogenezei.

Notă: I – plante fertile, II – plante cu ASI; a,f – leptoten; b,g – pachiten; c,h – diviziuni; d,i – tetrade; e,j – microspori x1600 (c, f); x640 (a, b, d, e, g, h, i, j)

Dezvoltarea postmeiotică a microsporilor: individualizarea și eliberarea acestora din tetradă, depunerea exinei primare, formarea echinulațiilor evoluează corespunzător speciei, fiind pusă în evidență dezintegrarea treptată, sincronizată a țesutului tapetal.

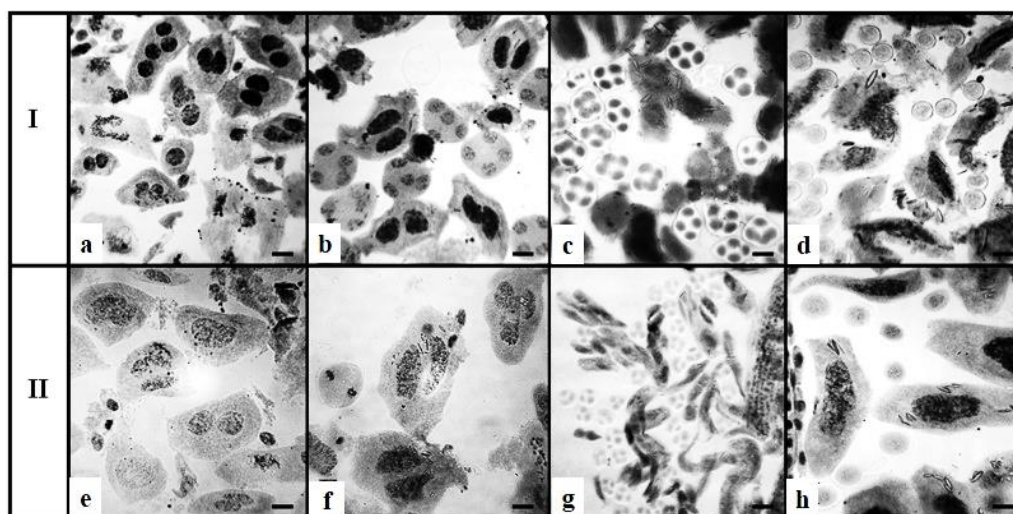


Fig. 3. 7. Celule tapetale în diferite faze ale microsporogenezei

Notă: I – plante fertile; II – plante cu ASI; a, e – profaza I; b, f – diviziuni; c, g – tetrade; d, h – stadiul de microspor. Scara 15 = μm .

La linia fertilă SW501 cu androsterilitate indusă meiocitele și stratul tapetal au prezentat o forma distorsionată cu semne de colaps prematur. Particularitățile structurale anormale, caracteristice sterilității masculine au fost evidențiate în toate etapele microsporogenezei, stabilite prin asociere cu dimensiunea florilor tubulare similar plantelor fertile (Figura 3.6 f, g, h, i, j).

Astfel, în dinamica desfășurării microsporogenezei la plantele cu ASI, analiza citologică a anterelor din butonii floralii de 1,0 mm până la 1,5 mm în lungime (corespunzător fazei leptoten la plantele control) a relevat preponderent meiocite în premeioză și doar un număr foarte mic (unul sau două în câmpul de vedere) de meiocite de dimensiuni mari în leptoten. De asemenea, au fost constatate conglomerate de membrane și celule aglutinate. O caracteristică importantă la acest stadiu de dezvoltare, constă în faptul că celulele tapet slab colorate conțin un număr mai mare de nuclee față de cele ale plantelor fertile, care sunt mononucleate.

În anterele colectate din florile tubulare de 2,0 -2,5 mm (corespunzător fazei de diviziuni la varianta fertilă) celulele tapet sunt neuniform colorate și hipertrofiate, astfel încât ocupă aproape în totalitate cavitatea lojei staminale/sacului polinic. Similar anterelor din plantele netratate, celula tapetală a avut preponderent două nuclee, dar diferite ca formă, care este mult mai alungită iar în unele cazuri cromatina indică o stare de condensare ireversibilă (picnoză) (Figura 3.7).

La linia SW501 fertilă, spre deosebire de anterele aflate în meioza timpurie, cele din faza mai avansată a microsporogenezei par a fi mai sever afectate de tratamentul cu AG₃, întrucât tetradere sunt observate doar ocazional. Hipertrofia celulelor tapet este asociată de conglomerate de nuclee și celule aglutinate fără citoplasmă și pereți.

Dintre caracteristicile semnificative, din post-meioză, ale sterilității masculine induse relevate în studiul nostru sunt: microspori plasmolizați fără o structurare adecvată a peretelui, conglomerate de membrane calozică și nuclee aglutinate, incapacitatea de a menține o citoplasmă intens-colorată (care demonstrează activitate metabolică redusă), tapetum persistent și deteriorat selectiv.

Este important de remarcat că, în preparatele unor antere tratate, mai mari de 3,5 mm se constată loculi cu populații omogene de spori sterili adiacent celor lipsiți total de microspori.

La plantele liniei cu androsterilitate citoplasmatică SW501ASC au fost constatate disfuncționalități în procesul foarte timpuriu al microsporogenezei, acestea fiind deja evidente în profaza I a meiozei. Astfel, în majoritatea microsporocitelor, meioza este inițiată și aparent decurge normal până la faza de leptoten, însă doar un număr mic de celule ajung în faza de pachiten. De remarcat faptul că, spre deosebire de analogul fertil, la linia cu sterilitate citoplasmatică numărul celulelor sporogene aflate în diviziune este mult mai mic (Figura 3.7, h).

Creșterea în dimensiuni a florilor tubulare este asociată cu deteriorarea morfologică progresivă atât a meiocitelor, cât și a celorlalte țesuturi ale anterelor. Se constată un proces intens de vacuolizare anormală și hipertrofie, în special a tapetului, asociat și cu alte efecte distructive, așa ca polarizarea materialului citoplasmatic, subțierea pereților care devin, în unele cazuri, mai puțin distincți între celulele adiacente.

Spre deosebire de anterele androfertile la care în stadiul de tetradă tapetul este în proces inițial de formare a plasmodului și cu semne certe de degenerare și consumare în calitate de nutrient, în cele ale liniei ASC, acest țesut specializat prezintă caracteristici de apoptoză accentuate.

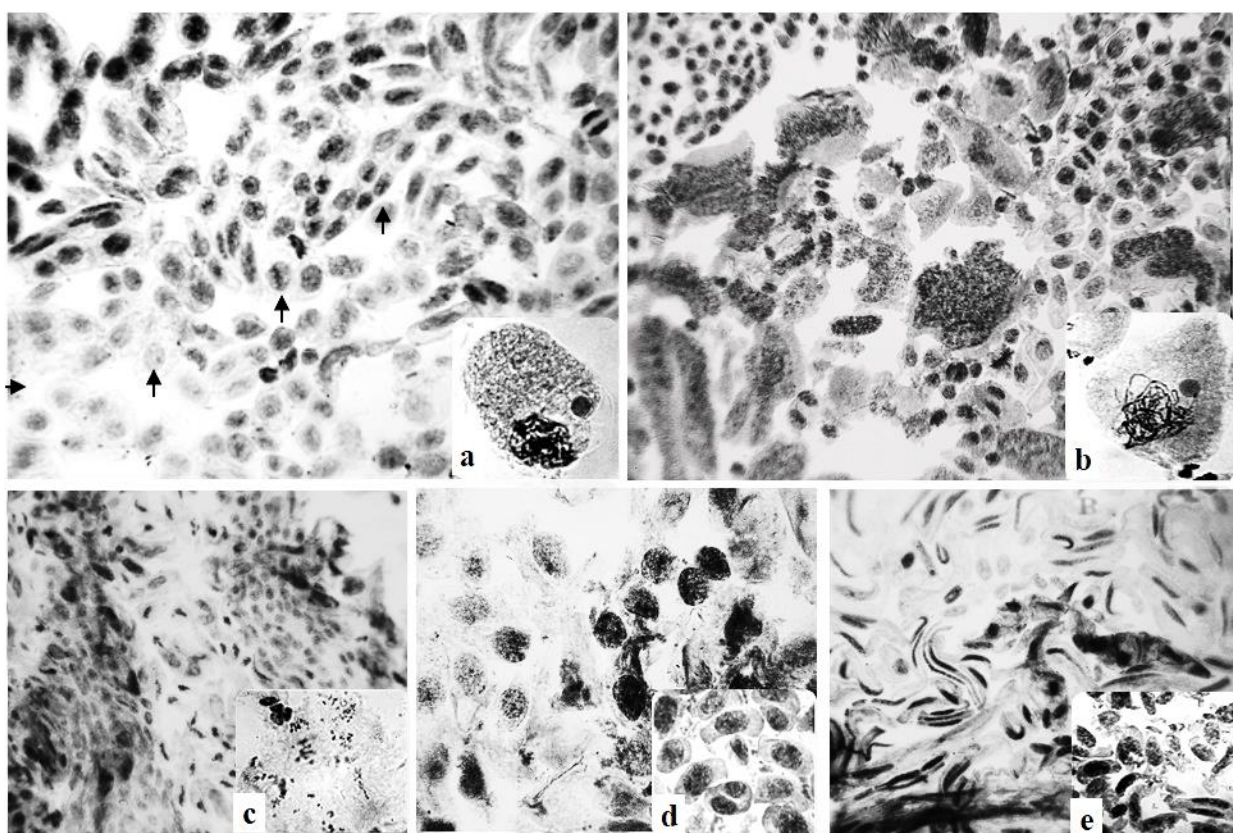


Fig. 3.8. Meiocitele liniei izogene SW501ASC în diferite etape ale microsporogenezei
 Notă: a – leptoten; b – pachiten; c – meiocite aglutinate, buton floral de 2,0 - 2,5 mm (corespunde fazei de diviziuni la lina fertilă); d – meiocite blocate în premeioză, flori 3,0 - 3,5 mm (corespunde fazei de tetrade la lina fertilă); e – meiocite degradate flori 3,7 mm (corespunde fazei de microspor la lina fertilă). x1600 (a, b); x640 (c, d, e).

Majoritatea celulelor sporogene degenerază, însă în unii butoni floralii cu dimensiuni mai mari de 2,5 mm a fost remarcat un număr foarte mic de microsporocite în diachineză, metafază, anafază, telofază din ambele diviziuni meiotice, toate prezentând alterări ale formei, dimensiunii, anomalii și aberații ale cromozomilor etc. Tetrade nu au fost depistate (Figura 3.8, d).

Fitohormonul de sinteză chimică AG₃ aplicat pe inflorescențele plantelor cu ASC a

afectat/inhibat dezvoltarea post-histogeneză a țesuturilor microsporangiului, inclusiv a celui sporogen, astfel încât în meiocite nu a fost inițiată meioza, iar ulterior în faza pachiten țesutul tapetal este exagerat de hipertofiat, cu tendință accentuată de aglutinare.

De remarcat faptul, că în unele preparate au fost observate celulele tapet cu un nucleu și cu mai mulți (2-3 nuclee faza pachiten) alături de celule degradate și conglomerate de nuclee expulzate din celule.

Creșterea anterelor până la dimensiuni corespunzător fazelor de diviziuni, tetrade și microspori indică unul și același tablou: meiocite blocate în premeioză, unele cu dimensiuni reduse iar altele mult mai mari, celule cu nucleu periferic, citoplasmă transparentă, fragmente de membrane, nuclee libere și degradate.

Cu toate că celulele sporogene la plantele sterile tratate degenerază complet în stadiul premeiotic determinind lipsa totală a meiozei, celelalte țesuturi ale anterei, în special endotecium și epiderma, continuie să persiste, astfel încât antera la maturitate își menține conturul.

Generalizarea informației obținute în rezultatul analizei histo- și citologice comparative ale anterelor colectate de la plantele androsterile (ASI, ASC și ASC+AG₃) indică asupra acțiunii inhibitoare a AG₃ cu efect pronunțat de accelerare a proceselor degenerative a microsporangiului la plantele cu ASC și întârziere semnificativă a fazelor de dezvoltare a microsporilor, asociată cu diverse anomalii de structură, incompatibile cu fertilitatea polenului fenotipului cu ASI. De asemenea, trebuie de menționat că a fost observată și sporirea gradului de poliploidizare al celulele tapetale la acțiunea acestui hormon.

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

Anomaliile de structură constatate în procesul dezvoltării țesuturilor anterelor la plantele cu ASI și ASC demonstrează fără echivoc faptul că diferențierea celulelor meiotice necesită interacțiuni intra- și intertisulare, fiziologic coordonate și orice deficiență în asigurarea spațio-temporală a acestora afectează gradul de fertilitate. Constatările efectuate indică asupra prezenței unor abateri inevitabile în defășurarea normală a meiozei și formarea gameților masculini. Din acest considerent, se justifică un alt obiectiv al investigațiilor – examinarea profilului citologic al diviziunii meiotice la plantele de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă în comparație cu cele fertile în vederea identificării prezenței/absenței aberațiilor cromozomiale, tipului și frecvenței acestora.

Întrucât procesul de microsporogeneză la plantele cu androsterilitate citoplasmatică SW501ASC, inclusiv variantele acestora tratate cu giberelină, a fost inhibat în etapa incipientă a meiozei sau stopate în premeioză, determinarea frecvenței aberațiilor cromozomiale și analiza

morfometrică nu a putut fi efectuată. La aceste plante în preparatele citologice a fost posibil de observat doar un număr redus de celule în leptoten și pachiten (varianta control) și conglomerate de celule distruse cu nuclee picnotice.

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

Până în prezent analize morfometrice s-au realizat în special la celulele umane, care pot servi drept indicatori prognostici pentru diagnosticul clinic și patologic. La plante, spre deosebire de regnul animal, există foarte puține informații referitor la analiza morfometrică a celulelor sexuale. Astfel de cercetări au fost realizate în scopul asocierii formei și dimensiunii tetradelor și grăuncioarelor de polen cu gradul de fertilitate [198]. Considerăm că abordarea descriptivă completată cu parametrii selectați sporesc relevanța caracterizării microsporogenezei la plantele cu ASI în raport cu cele fertile, oferind criterii cuantificabile, care pot susține o diferențiere a anomaliilor 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 în 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 - $1145,6 \mu\text{m}^2$. Microsporiile 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 AG_3 (Figura 3.9).

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 (Figura 3.9).

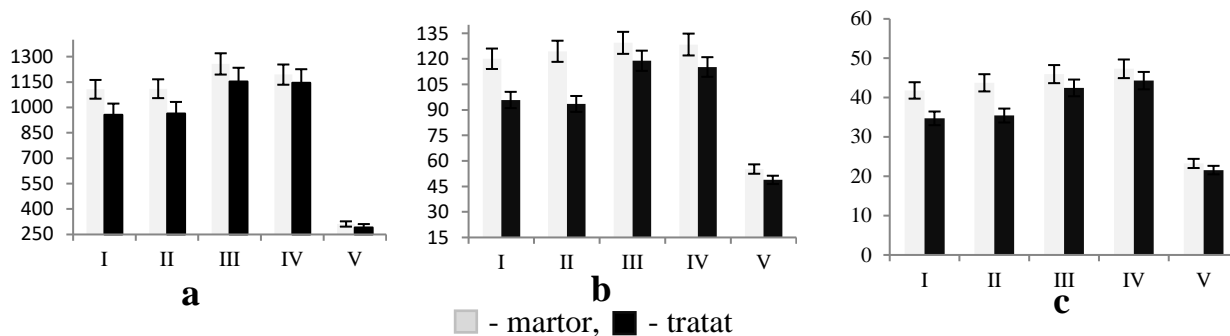


Fig. 3.9. Analiza comparativă a parametrilor morfometrici ai meiocitelor și microsporilor la plantele cu ASI în raport cu cele fertile.

Notă: a – aria, μm^2 ; b – perimetru, μm ; c – lungimea, μm . Fazele microsporogenezei: I – leptoten; II-pachiten; III – diviziuni; IV – tetrade; V – microspor.

Al treilea indice analizat este lungimea, care a variat neesențial în primele faze ale microsporogenezei, (leptoten 41,8 μm – tetrade 47,3 μm) 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 μm , iar tetradele 44,3 μm . În următoarea fază a microsporogenezei micșorarea diametrului microsporilor de la 21,1 μm la varianta martor până la 16,4 μm la cea tratată a fost asociată cu inducerea androsterilității și formarea polenului steril.

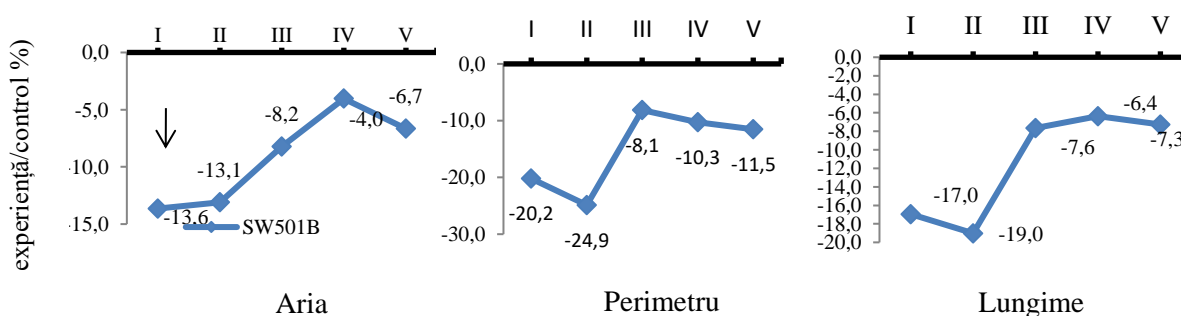


Fig. 3.10. Analiza comparativă a diferenței valorilor parametrilor morfometrici ai meiocitelor și microsporilor la plantele cu ASI în raport cu cele fertile (control).

Notă: Axa ordonată: diferența experiență-control, unde controlul este considerat 100%. Axa absciselor: fazele microsporogenezei I – leptoten; II – pachiten; III – diviziuni; IV – tetrade; V – microspor.

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 3.10). 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 microsporilor 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 [175].

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) (Tabelul 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 disjunția secvențială și nu simultană a bivalentilor în anafaza I [248].

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 3.11, 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 întârziați în anafaza I reprezintă cel mai adesea cromozomi univalenți, neîmperecheați, în curs de expulzare [248].

Tabelul 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	
		meiocite			
		analizate (nr.)	cu anomalii (%)	analizate (nr.)	cu anomalii (%)
Total, meocite 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> <i>Cromozomi lipicioși</i>	302,46 ± 0,54	1,76 ± 0,17	155,00 ± 0,83	55,05 ± 0,68 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</i> <i>precoce</i> <i>Cromozomi lipicioși</i>	305,40 ± 1,00	0,69 ± 0,16	154,93 ± 0,90	33,09 ± 0,58 - 32,53 ± 0,41
Anafaza II	<i>Cromozomi retardatari</i> <i>Punți cromozomale</i>	315,40±1,00	-	155,26 ± 0,82	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 $p \leq 0,05$

Tratarea cu AG₃ a determinat, de asemenea, un proces intens de heterocromatizare în faza leptoten, urmat de aglutinarea unei mase variabile de cromozomi. Heterocromatizarea indică procese certe de alterare a ADN – ului, ceea ce duce la migrarea din celule a unei părți din cromozomi prin citomixie. Transferul cromatinei dintr-o celulă în alta în timpul microsporogenezei a fost considerat cauza diferitor aberații cromozomiale, reducând viabilitatea și dimensiunea grăuncioarelor de polen [215].

Celulele cu punți ana-telofazice identificate în observațiile noastre , ar putea fi rezultatul fie a unei separări deficiente a cromozomilor, fie a sudurii porțiunilor terminale ale cromatidelor surori care au suferit deleții terminale. De asemenea, în metafaza I au fost observați bivalenți neorientați și migrări precoce ale cromozomilor.

La această variantă în diviziunea homotipică au fost observate și fenomene de asincronie în aceeași celulă, de ex. cromozomii la un pol în metafaza II și la celălalt în anafaza II (Figura 3.11, e). Procesul de citomixie a fost observat doar în stadiul timpuriu al profazei I, plantele tratate (Figura 3.11, a). Se consideră că fenomenul de citomixie reprezintă un factor important, care trebuie luat în considerare în analiza încrucișărilor, deoarece determină modificarea numărului de cromozomi și apariția unor anomalii în împerecherea cromozomilor, iar în final sterilitatea polenului. De asemenea, citomixia este considerată și o modalitate de a conserva heterozigoția genetică a gameților [16]. Conform cercetătorului Kravets (2013), acest proces este important pentru evoluția filogenetică a cariotipurilor din cauza reducerii sau creșterii gradului de ploidie, creând aneuploizi și poliploizi în cazul căruia se obține variabilitatea organismelor [144].

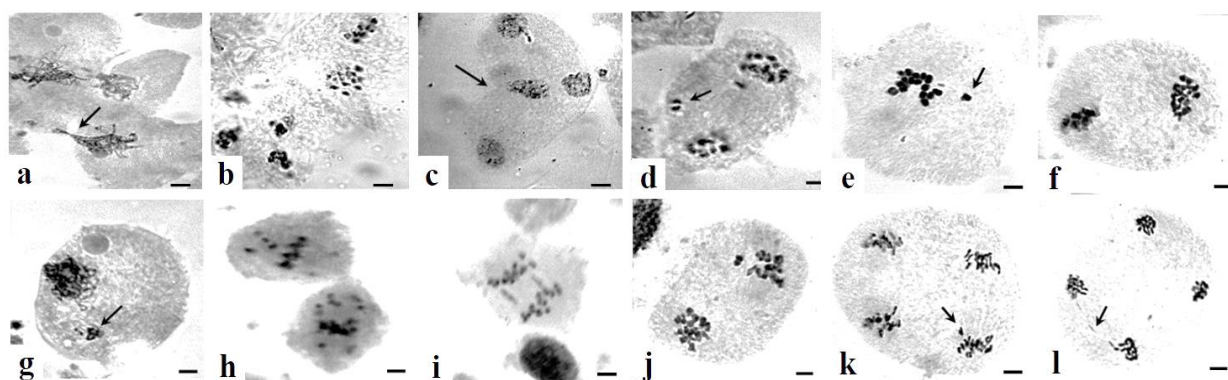


Fig. 3. 11. Aberații cromozomiale în meioză la plantele de floarea-soarelui cu ASI.

Notă: a – transferul cromatinei între două celule mamă polinice în pachiten; b – picnoza; c – telofaza II cu poziție iregulară a nucleilor; citoplasma în proces de dividere/citochineză asimetrică /inegală formând celule cu unu și trei nuclei; 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 μm (a,b,c, e, f, g, j); 5 μm (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* [146].

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 microspori 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. La sfârșitul celei de a doua diviziuni meiotice, printr-o citochineză de tip simultan, se formează patru microspori - potențiale grâncioare de polen, aranjate tetraedric. 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 3.12, a). Tetradele au fost considerate ca fiind normale atunci când au prezentat patru microspori cu dimensiuni egale și fără micronuclei.

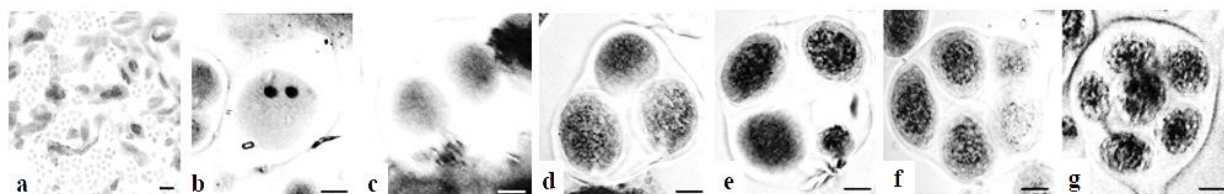


Fig. 3.12. Faza de tetrade în antere la linia SW501.

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).

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 3.12). 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, linia SW501 tratată cu gibberelină, au fost determinate 6,89% de diade și 10,35% triade (Figura 3.12, c, d). Rezultate similare au fost raportate și pentru unele linii de porumb cu sterilitate masculină parțială [36], la unele populații de triticales cu sterilitate masculină și la hibridii interspecifici de *Viola pubescens* [283], *Carica papaya* și *Vasconcellea monoica* [56]. 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. Acest fapt reprezintă de obicei un semn al evenimentelor genotoxice și al instabilității cromozomiale. Astfel la variantele martor au fost depistate tetrade cu micronuclei, însă acest nivel a fost foarte mică (0,40%), comparativ cu plantele tratate (9,91%) (Tabelul 3.2). Astfel, prezența micronucleelor a dus la formarea meiocitelor cu anomalii și prin urmare, a grăuncioarelor de polen anormale. Acest fapt reprezintă o dovadă a acțiunii gametocide a fitohormonului și al instabilității cromozomiale.

Tabelul 3.2.

Ponderea a 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±0,08	0,40±0,08	-	-	0,37±0,05	0,42±0,05	-
SW501+AG ₃	71,31±4,06	9,91± 1,11	20,04±1,57	9,12±1,49	9,12±1,49	10,35±1,31	14,10±1,41

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

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 3.13, a).

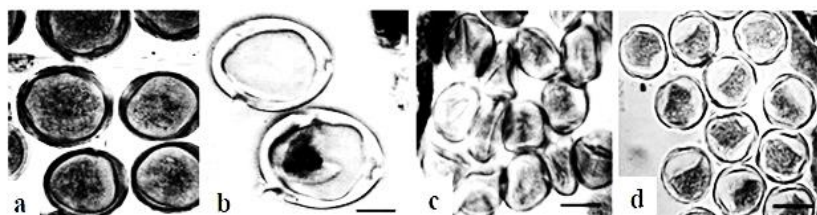


Fig. 3.13. Aspectul morfologic al grăuncioarelor de polen, linia SW501.

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

Analiza gradului de fertilitate a polenului în anterele atrofiate de acțiunea AG₃ la linia SW501 a evidențiat valori foarte mici – 2,31% 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 3.13, c), lipsa sau degenerarea materialului genetic și grăuncioare de polen goale (Figura 3.13, b), plasmolizare intensă, cu formarea spațiilor libere între membrană și citoplasmă, lipsa echinulațiilor caracteristice la maturitate și alte aspecte.

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 [268] și la formele cu sterilitate indusă de către agentul chimic de hibridizare SQ-1 la grâu [253].

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 μm. În variantele tratate chimic acest parametru s-a micșorat cu 3% (Figura 3.14). 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.

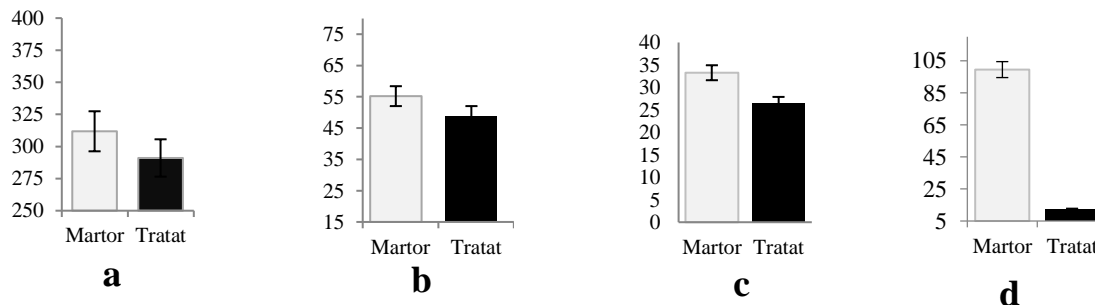


Fig. 3.14. Parametrii dimensionali ai grăuncioarelor de polen și gradul de fertilitate (%) la linia SW501.

Notă: a – aria, μm²; b – perimetru, μm; c – diametru, μm; d – gradul de fertilitate, %

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 [64].

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Au fost stabilite valorile numerice ale dimensiunii butonului floral și anterei corelate cu etapa de diferențiere a microsporilor la liniile izogene (SW501 cu analogol androsteril SW501ASC), care trebuie să fie verificată pentru fiecare genotip și cu diferit tip de androsterilitate etc.
2. La anterele fertile s-a identificat o structură diferențiată, tipică a peretelui, din patru straturi: epidermă, endoteciu, stratul median și tapetul, care rămân distincte pe întreaga perioadă a microsporogenezei.
3. Tratarea cu AG₃ a inflorescențelor plantelor fertile a determinat modificări structurale a țesuturilor la nivelul întregului lob al anterei. Particularitățile structurale anormale, caracteristice sterilității masculine au fost evidențiate în toate etapele microsporogenezei și în celulele mama polinice stabilite prin asociere cu dimensiunea florilor tubulare similar plantelor control.
4. La linia cu androsterilitate citoplasmică SW501ASC au fost relevate disfuncționalități evidente începând cu profaza I. Tratarea cu giberelina a inhibat dezvoltarea post-histogeneză a țesuturilor microsporangiului, inclusiv a celui sporogen, astfel încât în meiocite nu a fost inițiată meioza.
5. Investigațiile citogenetice asupra plantelor fertile și cu androsterilitate indusă de floarea-soarelui au pus în evidență aberațiile cromozomiale precum: cromozomii retardatari, punțile meiotice, migrarea cromozomală precoce și micronucleii, precum și prezența produselor post-meiotice anormale așa ca monadele, diadele, triadele și poliadele.
6. Gradul de fertilitate foarte mic (12%) asociat cu procentul înalt de anomalii cromozomiale (64%) în diferite faze ale procesului de microsporogeneză a plantelor tratate demonstrează efectul gametocid al giberelinei, prin formarea unui număr mic de grăuncioare de polen sterile, plasmolizate, cu aspect membranos și neuniform.

4. ACTIVITATEA TRANSCRIȚIONALĂ A UNOR GENE CU ROL ESENȚIAL ÎN DEVOLTAREA MICROSPORIILOR 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 elucida bazele genetice ale acestui proces fiziologic, este necesar studiul entităților moleculare cu rol de supresie și/sau stimulare a diferitelor evenimente celulare.

Anomaliile constatate în dezvoltarea microsporilor, asociate cu un fenotip modificat al anterei, la femele sterile și cele cu androsterilitate indusă de către AG₃ demonstrează elocvent că diviziunile meiotice și mitotice care precedă și asigură dezvoltarea polenului se află sub un control genetic riguros și secvențial. În această ordine de idei, prezintă interes studiul 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.

4.1. Principii de selectare a genelor de interes

Floarea-soarelui, cu toate că are genomul secvențiat, rămâne a fi puțin studiată în aspect transcriptomic al genomului. De aceea, în prima etapă, a fost analizată informația din literatura de specialitate și bazele de date NCBI: EST, UniGene, Gene, Nucleotide [298] privind genele cu rol funcțional în ciclul celular la plante, dividerea meiotică și dezvoltarea post-meiotică a gameților masculini. Acest studiu analitic a pus în evidență un șir de gene cu funcție de reglare, în calitate de factori de transcripție sau codificatoare de proteine specifice unui proces biochimic (Tabelul 4.1).

În a doua etapă de analiză, criteriul de bază în selecția genelor de interes a constituit particularitățile fenotipului meiotic al plantelor cu ASC și ASI relevate prin microscopie optică: aberații cromozomiale, hipertrofia țesutului tapetal, vacuolare excesivă a straturilor anterei, anomalii la nivelul membranelor, efecte de întârziere până la blocarea dezvoltării meiocitului într-o anumită fază a meiozei.

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 programul 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.

Tabelul 4.1.
Gene implicate în microsporogeneză (*A. thaliana*)

Gene	Funcția	Efectul	Referință
<i>SYN1/DIF1</i>	Împerecherea și condensarea cromozomilor	Eroare în meioza feminină și masculină	[34]
* <i>SWITCH1/DYAD</i>	Coeziunea cromatidelor surori	Eroare în meioza feminină și masculină	[3]
<i>ASYNAPTIC1(ASY1)</i>	Sinapsa cromozomilor omologi	Eroare în meioza feminină și masculină	[202]
* <i>AHP2</i>	Formarea bivalenților	Eroare în meioza feminină și masculină	[208]
<i>DSYNAPTIC(DSY1)</i>	Sinapsa cromozomilor omologi	Eroare în meioza feminină și masculină	[22]
<i>DSY10</i>	Sinapsa cromozomilor omologi	Eroare în meioza feminină și masculină	[22]
(<i>SDS Homologue synapsis</i>)	Recombinarea și formarea bivalenților	Eroare în meioza feminină și masculină	[40]
<i>SPO11</i>	Sinapsa cromozomilor omologi, recombinația și formarea bivalenților	Eroare în meioza feminină și masculină	[142]
<i>AtRAD50</i>	Repararea și menținerea telomerilor	Eroare în meioza feminină și masculină	[247]
<i>AtMRE11</i>	Repararea catenelor duble	Eroare în meioza feminină și masculină	[201]
<i>AtRAD51</i>	Împerecherea și sinapsa cromozomilor	Eroare în meioza feminină și masculină	[247]
<i>AtDMC1</i>	Formarea bivalenților	Eroare în meioza feminină și masculină	[33]
* <i>ASK1</i>	Segregarea cromozomală	Eroare în meioza masculină	[97]
<i>ATK1</i>	Formarea axului meiotic	Eroare în meioza masculină	[43]
<i>TAM1</i>	Sincronizarea diviziunii celulare în meioza masculină	Eroare în meioza masculină	[37]
<i>CDC45</i>	Sinteza ADN-ului în meioză	Eroare în meioza feminină și masculină	[213]
<i>STUD/TES</i>	Citokineza în meioza masculină	Eroare în meioza masculină	[276]
<i>MMD1/DUET</i>	Progresia ciclului de diviziune celulară	Eroare în meioza masculină	[250]
* <i>MND1</i>	Recombinarea cromozomilor	Eroare în meioza masculină	[245]
<i>AMI</i>	Tranziția de la leptoten la zigoten	Eroare în meioza masculină	[87]
<i>ZYP1</i>	Sinteza elementului proteic transversal al CS ^d	Eroare în meioza masculină	[12]

Notă: * Genele pentru care au fost identificate EST-uri de la floare-soarelei în baza gradului de omologie a secvenței.

Din acest considerent, s-a decis de a analiza EST-urile (Expressed Sequences Tag) din diferite colecții de ADNc la *Helianthus annuus* (DNAC libraries) [226] în vederea prognozării unei funcții similare cu cele ale secvențelor genice de la alte plante, care au indicat cel mai înalt grad de omologie. De asemenea, pentru realizarea obiectivului, în paralel cu bazele de date integrate de platforma NCBI, a fost consultat și portalul bioinformatic specializat pentru genul *Helianthus* – HeliaGene [296], elaborat pentru analiza cluster-elor de EST-uri, iar ulterior după translare și a familiilor de proteine. Acest portal integrează inclusiv datele de expresie bazate pe secvență (ARNm-ADNc) cu rezultate experimentale de transcriptomică (expresie în diferite organe și țesuturi ale plantei). Grație consolidării efortului laboratoarele din SUA (Compositae Genome Project [294] și din Franța (programul Genoplante) [299] un număr mare de EST-uri de *Helianthus sp.* sunt disponibile în bazele de date publice.

Ca rezultat, au fost selectate nouă EST-uri pentru care au fost stabilite nivele semnificative de omologie (valoare $E < 1.0 \cdot 10^{-10}$ și/sau scorul BLAST > 100) cu secvențe cunoscute și adnotate de la alte plante. În tabelul 4.2 sunt prezentate unele date caracteristice privind gradul de similaritate stabilit în rezultatul utilizării blastx, care efectuează căutarea în toate colecțiile de secvențe non-redundante din GenBank, PDB (Protein Data Bank), SwissProt (protein sequence database), etc. Analiza ontologiei genelor (funcția moleculară, implicarea în procese biologice, localizarea celulară), care au prezentat cel mai înalt grad de similaritate a secvenței cu EST-urile de interes, este redată în tabelul 4.2.

Tabelul 4.2.
EST-uri incluse în analiză și secvențele omoloage (*A. thaliana*, blastx)

EST (denumire / nr. de acces GenBank)	<i>A. thaliana</i> (denumire / nr. de acces NCBI)	Scor/scor total	Grad de acoperire, %	Valoarea E	Gradul de similaritate, %
CCFT9238.b1_K05.ab1/GE514022.1	expansin A1/ NP_177112.1	345/345	86	1e-125	85
CHAY11842.b1_D10.ab1/ DY915941	meiotic nuclear division protein 1/ NP_194646.2	292/292	77	3e-105	79
CCFS4185.b1_B16.ab1/GE489553.1	DYAD / NP_568757.2	98,6/190	46	2e-27	59
CCFS6501.b1_J18.ab1/GE494361.1	callose synthase 3/ NP_196804.6	463/543	99	9e-155	88
DH0AFF22ZF12ZZM1/CD856124.1	histone H1-3/ NP_179396.1	115/115	29	4e-37	72
DH0ALL23ZG05ZZM1/CD852039.1	histone H3 / NP_189372.1	267/267	82	6e-98	98
CCFU663.b7_M22.ab1/GE521943.1	proliferating cellular nuclear antigen 1 /NP_172217.1	410/442	90	1e-151	89
CHWM9916.b1_H0/EE622917.1	homologous-pairing protein 2-like protein /NP_172791.1	325/325	91	1e-118	73
DH0AC015ZD03FM1/CD849086.1	S-phase kinase-associated protein 1/ NP_565123.1	128/128	62	7e-44	84

Acest algoritm identifică genele codificatoare de proteine prin translarea secvenței în toate cadrele de citire posibile și compararea acestora cu secvențele proteice din bazele de date.

Genele-test selectate pentru studiul transcripțiilor în diferite faze ale microsporogenezei la *H. annuus* mediază o gamă largă de procese biologice, incluzând proliferarea celulară, silențierea cromatinei, segregarea cromozomială, silențierea post-transcripțională a genelor, reglarea replicării ADN-ului, reglarea ciclului celular precum și organizarea peretelui celular, sugerând rolul de marker molecular al acestora în *pattern*-ul de formare a gameților masculini în microsporogeneză [51].

Tabelul 4.3.
Funcția moleculară, procesul biologic, localizarea celulară a genelor de la *A. thaliana*, similare cu Ha *EST*-uri de interes

Secvența omoloagă	Notații	Funcția	Procese biologice	Localizare	Referințe
HaEST: CHAY11842.b1_D10.ab1					
Meiotic nuclear division protein 1-like protein	<i>ATMND1</i>	Legarea proteinelor	Recombinarea ADN-ului, ciclul celular meiotic, dezvoltarea polenului	Nucleu, nucleol	[186]
HaEST: CCFS4185.b1_B16.ab1					
SWI1 protein DYAD	<i>DYAD</i>	Activitatea fosfolipazei C	Coeziunea cromatidelor surori, recombinația	Nucleu	[3]
HaEST: CCFS6501.b1_J18.ab1					
Callose synthase 3	<i>GSL12</i>	Activitatea 1,3-beta-D-glucan sintetazei, activitatea transferazei	Organizarea peretelui celular Reglarea formei celulare	Component integral al membranei Membrana plasmatică	[104]
HaEST: DH0AFF22ZF12ZZM1					
Histona H1-3	<i>HIS1-3</i>	Legarea ADN-ului Legarea ADN-ului nucleozomal	Asamblarea nucleozomală, Răspunsul la insuficiența apei.	Nucleu, nucleozom,	[281]
HaEST: DH0ALL23ZG05ZZM1					
Histona H3	<i>H3.1</i>	Legarea ADN-ului	Asamblarea nucleozomală	nucleozom	[181]
HaEST: CCFU663.b7_M22.ab1					
Proliferating cellular nuclear antigen 1	<i>PCNA1</i>	Legarea ADN-ului Activitatea ADN - polimerazei, legarea de proteinele	Reglarea replicării ADN, reglarea ciclului celular	citoplasmă, nucleol, nucleu	[137]
HaEST: CHWM9916.b1_H08.ab1					
Homologous-pairing protein 2-like protein	<i>AHP2</i>	Funcție moleculară (catalizare, legare etc.)	Asamblarea chiasmelor	Nucleu	[208]
HaEST: DH0AC015ZD03FM1					
S-phase kinase-associated protein 1	<i>SKP1/ASK1</i>	Activitatea proteinei ubiquitin-ligaze, legarea proteinelor	Segregarea cromozomială, reglarea recombinării ADN-ului, mitoză, meioza masculină	Citoplasmă nucleu, fusul de diviziune	[277]

Cu toate că, majoritatea produșilor genelor studiate au fost identificați în mai mult decât într-un compartiment celular, 7 dintre aceștia sunt prezenți inclusiv în nucleu/nucleol, demonstrând implicarea directă în reglarea activității genelor.

Conform informației disponibile, la plantele de *A. thaliana* produsul genei *SWII/DYAD* îndeplinește funcția analoagă genei menționate, în pofida unui grad foarte mic de similaritate - aproximativ 30% identitate în partea centrală a proteinei (acoperire sub 1%).

În rezultatul analizei bioinformaticice, pentru investigarea profilului transcripțional asociat proceselor de formare și dezvoltare a microsporilor la floarea-soarelui, au fost selectate următoarele gene/EST-uri: *PCNA1*, *Cyclin D3*, *HIS1-3* și *H3.1* (organizarea cromozomilor reglarea replicării și metabolismului ADN), *AHP2*, *MND1*, *SWII/DYAD*, *ASK1* (recombinarea ADN-ului, formarea chiasmelor, coeziunea cromatidelor surori, segregarea cromozomală); *EXPA1* și *GSL12* (formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare).

4.2. Gene implicate în procese de organizare a cromozomilor și reglare a metabolismului ADN

Diviziunea celulară la eucariote constă dintr-o secvență extremă de reglare a evenimentelor ce au loc într-o ordine corespunzătoare [95]. Tranziția de la o fază la alta a ciclului celular este controlată prin mecanisme specifice, care acționează în unele puncte de control și verifică dacă anumite procese sunt terminate înaintea începerii altora sau dacă nu există alterări ale componentelor "mașinăriilor" de replicare și segregare cromatidiană [17].

Însă în ceea ce privește cercetările moleculare ale genelor, care joacă un rol important în reglarea procesului meiotic la *Helianthus annuus* L., deocamdată dispunem de informații parțiale.

Identificarea și cercetările moleculare ale unor astfel de gene duc spre obținerea multor informații noi ce îmbogățesc cunoștințele existente despre organizarea moleculară și activitatea funcțională a aparatului meiotic la plante.

4.2.1. Caracteristica bioinformatică a genelor *CycD3*, *PCNA1*, *HIS1-3*, *H1.3*

Cyc D3 (Cyclin D3) [Helianthus annuus: AAK54466.1]

În baza de date NCBI pentru floarea-soarelui există doar două adnotari: *cyclin* [*Helianthus annuus*: ADX86908.1] și *cyclin D3* [*Helianthus annuus*: AAK54466.1] care fiind comparate prin BLASTP prezintă un grad foarte mic de similaritate (Scor 43.1/43.1, acoperire 18%, valoarea E 7e-09, similaritate 28%).

Conform rezultatelor obținute la identificarea peptidelor translate *in silico* pentru a identifica domene conservate (*Results for peptides search*) pe portalul specializat [298] (analiza cluster-elor de EST) s-au depistat 31 de peptide cu mențiunea Cyclin-like.

Astfel, în contextul informației analizate, studiul nostru a avut ca obiectiv evaluarea expresiei genei *Ha cyclin D3*: AY033440.1 (cu o lungime de 1193 pb mRNA) care codifică proteina cu aceeași denumire *cyclin D3* [*Helianthus annuus*: AAK54466.1], ca reflectare a nivelului de activitate în faza proliferativă și influența giberelinei în reproducerea celulară.

PCNA (Proliferating cellular nuclear antigen 1)[HaEST: CCFU663.b7_M22.ab1]

Analizând datele existente pentru gena *PCNA* în decursul studiului bioinformatic a fost identificată o secvență de ADNc ipotetic codificatoare de *PCNA1* la *H. annuus*. Clona ADNc CCFU663. b7_M22.ab1 [GE521943.1] ce reprezintă un transcript cu grad înalt de similaritate - 89% cu gena care codifică *PCNA1* la planta model *Arabidopsis* [A.th: NP_172217.1]. De asemenea, în baza de transcripti - Unigene sunt stocate 5 secvențe (EST) considerate *Sunflower putative protein-coding gene* din trei librării ADNc (UniGene 3583663 - Han.9951) (Figura 4.1).

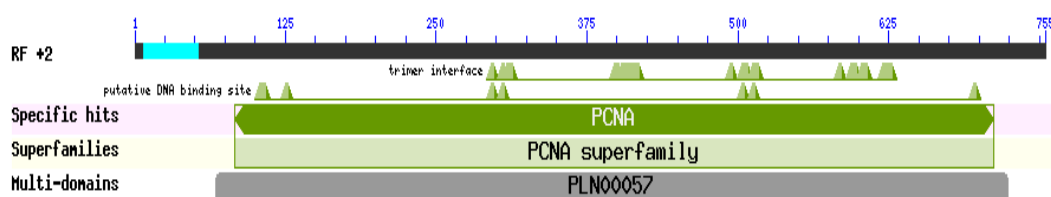


Fig. 4.1. Alinierea secvențelor de interes pentru gena *PCNA*.

O corelație între expresia genelor *PCNA* și proliferarea celulelor a fost observată și la alte specii de plante. Aceasta a fost identificată la fasole, care au prezentat transcripti *PcPCNA1* cu niveluri scăzute la începutul germinării semințelor [221].

EST-ul de interes prezintă domeniul conservat *PCNA*, similar genelor identificate la alte organisme eucariote.

Alinierea secvențelor prin programe-soft de recunoaștere a exonilor în secvența genomică de interes, a pus în evidență o listă de o sută de secvențe cu nivel foarte înalt de similaritate la diverse plante (*Nicotiana sylvestris*, *Eucalyptus grandis*, *Daucus carota*, *Vitis vinifera*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Pisum sativum*, *Brassica napus* etc.). Din această listă de gene cel mai înalt grad de similaritate structural-funcțională - 96% este indicat pentru secvența *Proliferating cell nuclear antigen*, *PCNA* la *Cynara*

cardunculus var. scolymus [GenBank: KVI03665.1], iar cel mai mic - 87% la *Oryza brachyantha*, presupusă: proliferating cell nuclear antigen [XP_006648073.1]. Aceste date prezintă o informație suplimentară în favoarea selectării corecte a EST-lui în calitate de genă candidat la funcția de *Proliferating cell nuclear antigen* (Figura 4.1).

Analiza datelor gestionate de portalul Heliagene [296] pentru căutarea - Proliferating cell nuclear antigen, *PCNA*, a pus în evidență 5 secvențe, HaT131011930_1_AA; HaT131075564_1_AA; HaT131066461_1_AA; HaT131106993_1_AA; dintre care două HaT131010567_1_AA și HaT131011930_1_AA se expresează în staminele de floarea-soarelui și în polen cu o valoare foarte mică de 0,08.

Ambele prezintă similaritate de 97% (scor 441/460, acoperire 90%, $1e-163$) cu transcriptul studiat în această lucrare.

Caracteristicile descrise sunt:

- procese biologice: reglarea replicării ADN-ului;
- componentul celular: complexul PCNA;
- funcția moleculară: legarea ADN-ului și activitatea ADN-polimerazei.

HIS1-3 (Histona 1) [HaEST: DH0AFF22ZF12ZZM1]

Studiul bioinformatic al genei *HIS1-3* realizat cu ajutorul instrumentului BLASTx a evedențiat un ADNc, HaEST: DH0AFF22ZF12ZZM1 (726 pb) similar cu gena care codifică la *A. thaliana* - histona *HIS1-3* [NP_179396.1] în proporție de 72% identitate și 29% acoperire. Trebuie de menționat că astfel de rezultate s-au obținut și în cazul altor secvențe genice care codifică histona *H1* de la diverse specii (*Prunus mume*, *Capsicum annuum*, *Theobroma cacao*, *Solanum chilense*, *Solanum tuberosum*, *Malus domestica*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Beta vulgaris subsp. vulgaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Plantago major*, *Beta vulgaris*, *Vitis vinifera*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Cucumis melo*, *Glycine soja*, *Zea mays*, etc). Astfel, din primele o sută de secvențe, cea cu nivelul cel mai înalt grad de similaritate - 89% se constată la *Eucalyptus grandis*: XP_010029700.1 adnotată ca PREDICTED: histone H1, și o valoare mai mică al acestui indice - 68% la *Picea sitchensis*: ADM77361.1, histone H1-like protein.

Similaritatea de structură a secvenței la toate aceste specii de plante este determinată de prezența unei familii de domene proteice conservate H15 și anume domenele linker histone 1 și histone 5 (Figura 4.2).

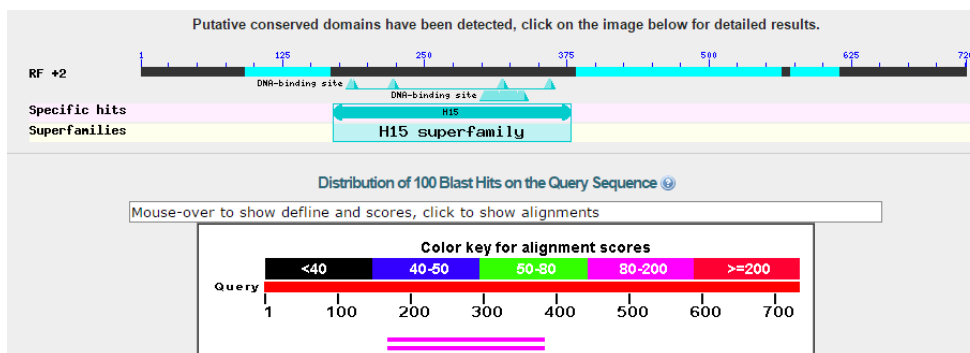


Fig. 4. 2. Familii de domene proteice conservate H15.

H1/H5 sunt proteine asociate cromatinei care se leagă la exteriorul nucleozomilor și stabilizează în mod însemnat stările puternic condensate ale fibrelor cromatinei. Stabilizarea plierii în ordine superioară are loc prin neutralizarea electrostatică a segmentelor ADN-ului de legătură, printr-un domeniu carboxi-terminal încărcat foarte pozitiv cunoscut ca helix AKP (Ala, Lys, Pro) [294].

```

1  GAACTAACTCCAATTAATCACAAAATCAAGTTTCTAGCACCTTCGAGAGACTAAACGAT
61  GTCGTCCACTGTAGAAGCCAAAAACCTCAACGCTGCCGTTGAGAAAACGGTGAAGGAGAA
121 GAAGGCTAAAGTTCCGAAAGAGAAGAAGGCGAAAACCTGCTAAAACTGCTTCTCATCCTCC
181 TTATTTTCAGATGATCAAAGAAGCTCTGCTAGCTCTGAACGAGAAAGCGGATCAAGCCC
241 CCACGCAATCGGAAAATACTTGAAGACAACACAAGCAGTACTTCCAGCCAAATTCAG
301 GAAAACGCTAGCACTGCAGTTGAAGAACTCTGCTTCAAAGGCCAACTTATCAAAGTCAA
361 AGCTTCATACAAGCTATCTGACGCCACTAAGAAATCAAATCACCAGCAGCCGGTAAGAA
421 GTCCACCAAGGCAGCAAGAGCCACCGCCACTACCACCGCGGCCGTAAGAAGGCTACTAA
481 AGCAACTCCGGCGAAGAAGGCTGTTAAAGCTGTGAAAACAACCTCCGATGAAGAAGACTAA
541 GAAGATGACTCCGGCGAAAGCGAAACAGCCGAAGTCGATCAGGTCACCGGCTGCTAAGAG
601 GGCTAAGAAGGCGAGTGTTTAAGTTTGTGACGGCTTAAGTTTGTGAAGACAGCAGAAGT
661 TATTATTTAGTATGTTTTTGATGCCGCTCTCTTTANTTGGGNGGNTGGGCAAGGGGA
721 TCCCCC

```

Fig. 4.3. Secvența de nucleotide a ARNm: DH0AFF22ZF12ZZM1.

Notă: Cu litere aldine sunt indicate nucleotidele din regiunea conservată H15, cele marcate indica poziția primerilor sens și antisens.

Pentru a evita obținerea unor produse de amplificare nespecifice, amorsele pentru reacția PCR au fost proiectate din această regiune conservată (Figura 4.3). Alinierea secvenței genice luate în studiu prin programele BLASTn și BLASTX la *Helianthus annuus* L., nu a prezentat similaritate cu secvențe genice adnotate cu alte funcții, ceea ce poate reprezenta un argument în plus în favoarea selectării EST-ului și elaborării corecte a primerilor.

Rezultatele căutării pentru peptide translate *in silico* histone *HIS1-3* pe portalul Heliagene nu a indicat nici o potrivire [296].

H3.1 (histona H3) [H0ALL23ZG05ZZM1]

Analiza filogenetică a secvențelor proteinei histone H3 demonstrează originea independentă a genelor *histone H3* de substituție la animale și plante. Localizarea multiplilor introni ai genei histone H3 la animale prezintă un model diferit de cel identificat la plante [26].

Bazele de date genomice nu conțin adnotări ale genei codificatoare pentru gena *histone H3.1*. Astfel, utilizând gena care codifică *histone H3.1* la *Arabidopsis thaliana* [NP_189372.1] în calitate de secvență, test pentru căutare, a fost identificat transcriptul (ARNm) de 495 nucleotide la *H. annuus* DH0ALL23ZG05ZZM1, GenBank: CD852039.1, care a prezentat un grad de omologie structurală și funcțională mare (acoperiere: 82%, identitate: 98%, scor: 267/267, valoare E: 3e-90).

Reieșind din caracterul de predicție al resurselor bioinformatiche specializate a fost realizată alinierea BLASTn a secvenței candidate pentru proteina histone H3 (DH0ALL23ZG05ZZM1) cu cea pentru *histone H1-3* atribuită ipotetic transcriptului DH0AFF22ZF12ZZM1 în scopul excluderii unui eventual nivel de similaritate de secvență. Rezultatul obținut este negativ.

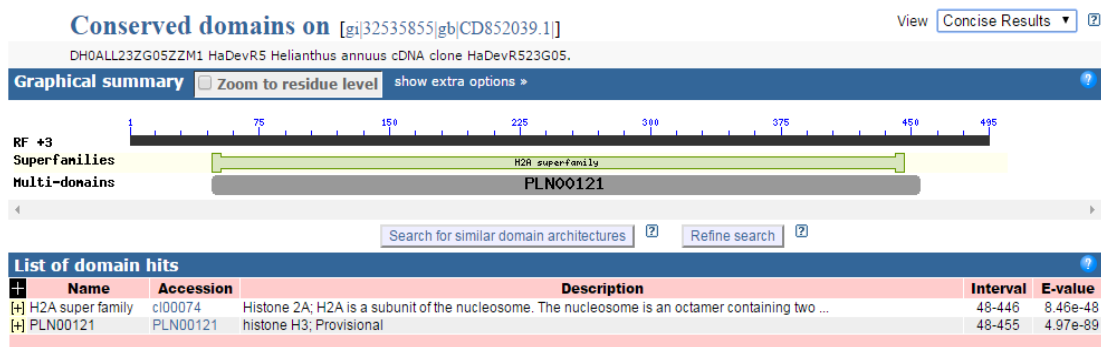


Fig 4.4. Domene conservate pentru gena *H3.1 (histona H3) H0ALL23ZG05ZZM1*.

Analiza prezenței domnelor conservate a relevat domeniul proteic reprezentativ pentru familia Histone 2A (H2A) o subunitate a nucleozomei, cu rol esențial în menținerea integrității structurale a nucleozomului, condensării cromatinei și legarea proteinelor specifice asociate cromatinei. Alte domene proteice fac referință la Histonele 3 (Figura 4.4).

BLASTx a relevat similaritate de secvență foarte înaltă (93-98%) la peste o sută de specii de plante și alte eucariote (*Theobroma cacao*, *Gossypium raimondii*, *Capsella rubella*, *Brassica oleracea*, *Eucalyptus grandis*, *Eutrema salsugineum*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus clementina*, *Brassica rapa*, *Cucumis sativus*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Ricinus communis*, *Fragaria vesca*, *Prunus persica*, *Malus domestica*, *Cucumis melo*, *Populus euphratica*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*).

Căutarea Blastn în colecția de nuncleotide la *H.annuus* a indicat lipsa genelor cu grad semnificativ de omologie (Figura 4.5), fiind astfel asigurată specificitatea primeri-lor pentru materialul biologic analizat.

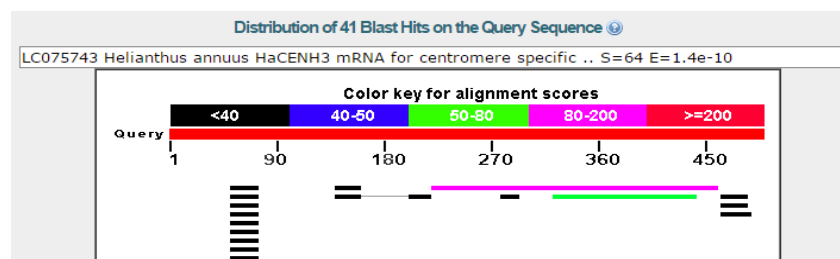


Fig. 4.5. Analiza *in silico* a secvenței proteice H3.

În anul 2015 în baza de date care stochează informația despre proteine UniProtKB a fost inclusă secvența unei proteine la *H.annuus*, numită Centromere specific histone H3 variant (A0A0S3P5L6_HELAN) cu numărul de identitate/ acces al genei *HaCENH3* (mRNA, complete cds, 432 nucleotide) – LC075743.1. Prezența acestei proteine în proteomul *H. annuus* se confirmă experimental doar la nivel de transcripție (HaCENH3 mRNA/ ADNc) [174].

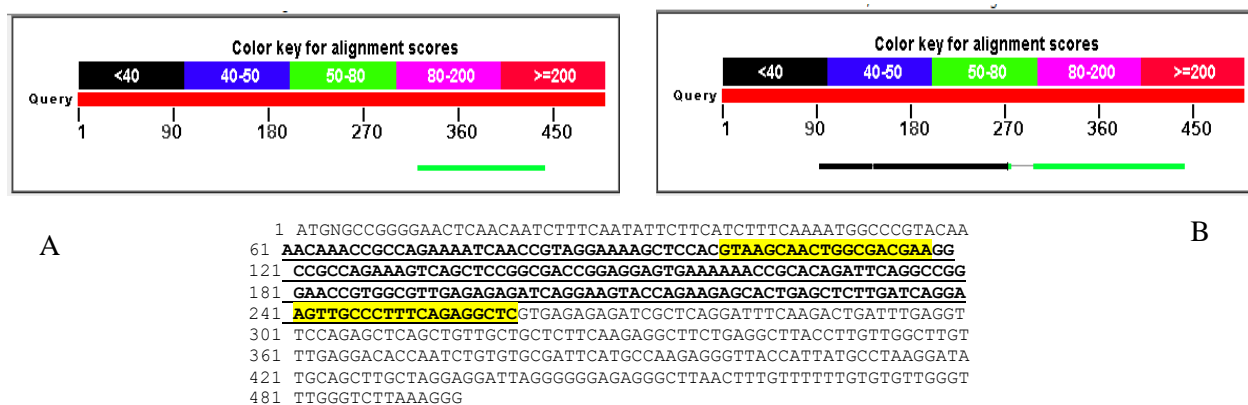


Fig. 4.6. Anliza *in silico* a *est-ului* DH0ALL23ZG05ZZM1 versus Centromere specific histone H3.1 variant

Notă: Programele Blast 2 sequences, blast N (A) și TBLASTx (B). Secvența produsului de amplificare specifică transcriptului DH0ALL23ZG05ZZM1 (C, cu litere aldine este evidențiat produsul amplificat, iar cei marcați sunt primerii).

Analiza EST-ului studiat (DH0ALL23ZG05ZZM1, *histone H3*) versus Centromere specific histone H3 variant, prin programele Blast 2 sequences, blast N (scor: 64.4/64.4, acoperire: 24%, valoare E: 8e-15, Identitate: 72%) și TBLASTx a indicat valori ne semnificative ai indicilor de aliniere (Score: 75.8/281, acoperire: 65%, 4e-32). Astfel, prin alinierea la nivel de secvență

nucleotidică și după translare la nivel de aminocizi este demonstrată lipsa ortologiei între EST-ul de interes și varianta Centromere specific histone H3. De asemenea, s-a optat în proiectarea primerilor pentru amplificarea regiunii de 161 pb, absolut specifică (de la nucleotida 100 până la 261) ARNm de interes (Figura. 4.6).

Portalul Heliagene a prezentat rezultat pozitiv la accesarea cuvintelor cheie **Histone 3** *helianthus*, prezentând exemple de translări a EST-urilor din diferite colecții și adnotarea peptidelor cu funcție ipotetică Histone H3; Histone-fold. Aceste secvențe prezintă nivele diferite atât ca structură cât și ca nivel de expresie în diverse organe la floarea-soarelui.

4.2.2. Analiza rezultatelor de expresie

Evenimentul primar în stimularea diviziunii celulare este reprezentat de activarea procesului de transcriere a genelor ciclone de tipul D, de către semnale venite din exterior. În culturile celulare de *Arabidopsis*, s-a dovedit că transcrierea genei *CycD3* este indusă în faza G1, cu puțin timp înainte de intrarea celulei în faza S, prin intermediul citokininelor și al sucrozei. Experiențele de hibridizare *in situ* au demonstrat exprimarea genei *CycD3* în țesuturile proliferative ale meristemului apical, primordiilor foliare, mugurilor laterali, ale procambiului și ale țesuturilor vasculare din frunzele mature. Astfel, la *Antirrhinum*, s-a constatat o expresie diferențiată a genelor *CycD3a* și *CycD3b* în zone diferite ale meristemului floral. Un alt mecanism care asigură tranziția către meristemul floral este sugerat de scăderea drastică a concentrației de citokinine în timpul acestui proces, deși ritmul de diviziune celulară se amplifică. S-a dovedit faptul că stimularea puternică a expresiei genei *CycD3* modifică necesitățile pentru citokinină ale calusurilor în creștere [257]. Formarea calusului din țesut foliar la nivelul căruia proteina *CycD3* se acumulează în cantități mari, precum și creșterea acestui calus este citokinin-autotrofă, caracteristică întâlnită în cazul tumorilor la plante [60].

Dereglarea expresiei *cycD3* poate perturba tranziția de la G1 la S, contribuind la dezvoltarea tumorii. Din acest punct de vedere, există o asemănare cu ceea ce se întâmplă la animale, unde dereglarea ciclului celular, inclusiv pe calea ciclonele de tip D, este un element important al procesului tumorigen. La om, gena *CycD1* și probabil și alte gene care codifică ciclone aparținând tipului D, sunt potențiale proto-oncogene, posibil activate prin dereglarea transcrierii acestor gene [265]. Prin analogie, gena *CycD3* de la plante poate fi privită ca o proto-oncogenă. Proteina *CycD3* reprezintă veriga de legătură între citokinine și procesul de dezvoltare la plante. Plantele care realizează o exprimare exagerată a genei *CycD3*, prezintă procese extinse de încrețire a frunzelor, meristeme dezorganizate, creșterea numărului de frunze, înflorire târzie și senescență întârziată. Toate acestea indică un anumit rol al *CycD3* în procesele de diferențiere la plante. Exprimarea

puternică a altor gene cu rol în dirijarea ciclului celular, cum ar fi *cdc2a* și *cycB1*, conduce la perturbări în privința numărului de celule prezente în mod normal într-o anumită regiune a plantei, dar nu afectează creșterea și dezvoltarea în ansamblu a plantei. Aceasta sugerează faptul că reglarea morfogenezei la plante este independentă de rata de diviziune celulară. Cercetările ulterioare vor stabili dacă ciclina *CycD3* joacă sau nu un rol privilegiat la interfața dintre diviziunea celulară și dezvoltarea plantei [129].

Conform datelor din literatură nivelul de expresie al ciclinelor de tipul D crește de mai multe ori în timpul tranziției între fazele G1-S când celulă pasivă intră în faza proliferativă. Reglarea expresiei genei *CycD3* pare a fi un mecanism cheie prin care fitohormonul citochinina influențează proliferarea celulelor [52]. Giberelinele s-a dovedit că induc o expresie diferențiată a ciclinelor la orez [278].

Evaluarea nivelelor de expresie pentru genele implicate în reglarea meiozei la floarea-soarelui a arătat că gena *CycD3* a avut cel mai mic nivel de expresie, atât în funcție de linie, cât și de fază studiată (Figura 4.7, a). Conform cercetărilor realizate la *Brassica napus* expresia genei *CycD3* prezintă valori mai scăzute în celulele aflate în diviziune la liniile cu androsterilitate citoplasmatică [230].

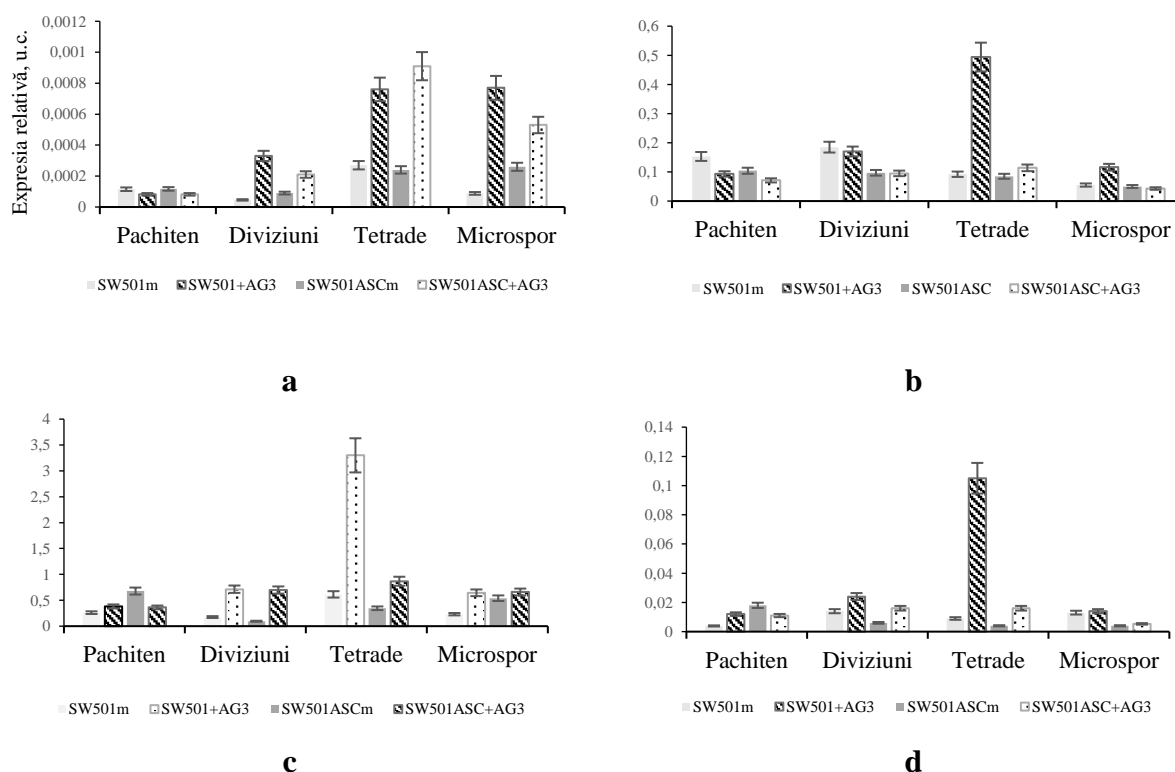


Fig. 4.7. Activitatea transcripțională a genelor implicate în organizarea și reglarea metabolismului ADN sub acțiunea giberelinei.

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

Analiza expresiei genice a relevat faptul că gena histonă *HIS1-3* a avut o activitate transcripțională mai înaltă la toate fazele studiate, însă s-a constatat diferențe semnificative de exprimare între linia fertilă SW501 și cea sterilă SW501ASC, în dependență de faza de dezvoltare a microsporului. În același timp, gena histonă *H3.1* a arătat un nivel scăzut al expresiei genice, ceea ce indică deosebiri funcționale între tipurile de histone (Figura 4.7, d).

Evaluarea RT-PCR a urmărit expresia a patru gene implicate în organizarea și reglarea metabolismului ADN sub acțiunea giberelinei. Rezultatele obținute au fost considerate semnificative pentru toate genele cu un nivel de expresie (*fold change*) cuprins între -1.5 și 1.5 cu valoarea lui p sub 0,05, 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 2,0 până la 8,8 (Figura 4.8, a). Astfel, la linia izogenă SW501 tratată cu AG_3 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 matorului.

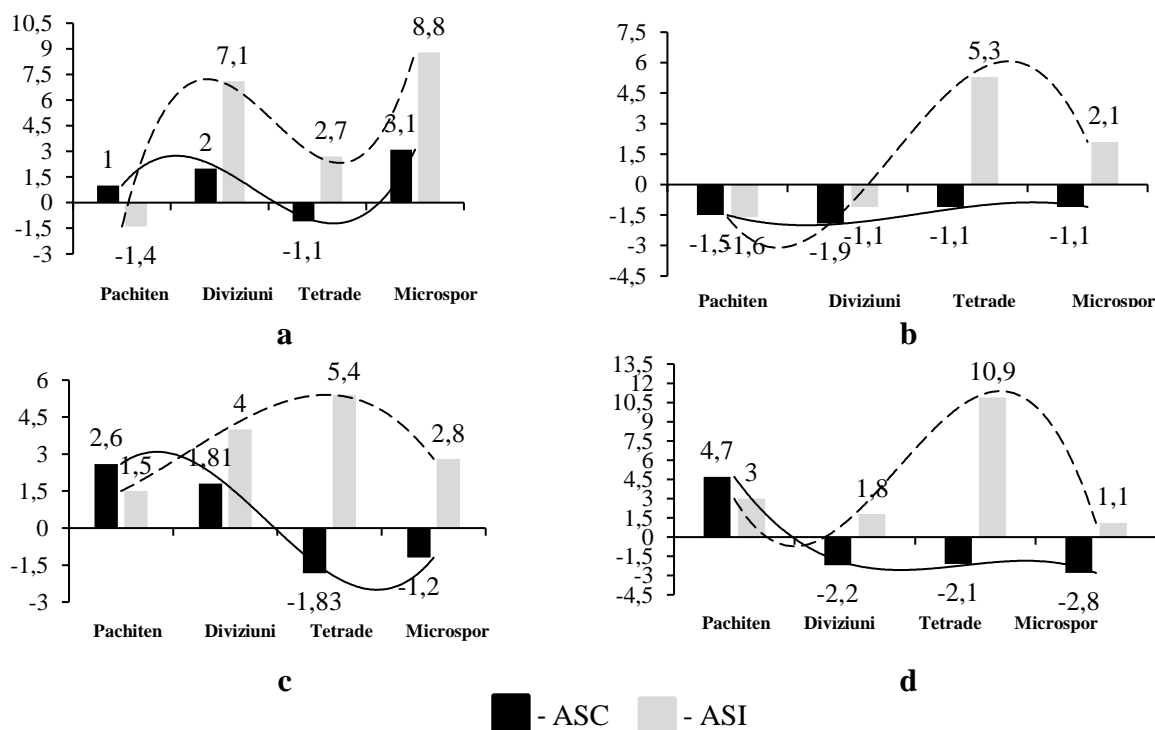


Fig. 4.8. Modificarea activității transcripționale experiență/control (*fold change*) a genelor implicate în organizarea cromozomilor și reglarea metabolismului ADN la linia SW501ASC și SW501ASI în diferite faze ale microsporogenezei.

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, deasemenea 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 4.8, b).

Exprimarea genelor *PCNA* în toate organismele este corelată cu proliferarea celulară și astfel cu sinteza ADN-ului în timpul replicării genomului în faza S a ciclului celular. La porumb genele *PCNA1* și gene *PCNA2* au fost exprimate în rădăcini, inflorescențe tinere și știuleți, dar nu și în frunze, inflorescențe mature sau polen. Mai mult decât atât, sa demonstrat că transcrierea *PCNA* se realizează intens în rădăcini la orez, dar nu și în frunzele mature [137]. De asemenea, datele prezentate de Shimizu și Mori [237], care au studiat nivelurile de transcriere a genei *PCNA* în mugurii auxiliari în faza latentă, a confirmat corelația dintre expresia genei *PCNA* și proliferarea celulară. Deși cantitatea de noi date experimentale, care extinde cunoștințele noastre cu privire la rolul *PCNA* în celulele vegetale a crescut în ultimii ani, multe aspecte ale funcției sale în plante încă rămâne obscure [211].

Cercetările genetice au demonstrat că valoarea redusă a histonei *H1* în celule duce la scurtarea spațiului dintre nucleozomi, structuri modificate ale cromatinei și modificări ale expresiei genelor [73]. Studiile recente au arătat că gena *H1* nu poate fi pur și simplu definită ca un represor de transcripție universal, deoarece aceasta este de asemenea implicată în activarea transcripție [74, 96]. Nivelul redus al histonei *H1* poate afecta modelele de metilare ale ADN – ului ale unor gene la mamifere și plante, iar creșterea volumului nuclear și scăderea conținutului de heterocromatină indică decondensarea cromatinei în celulele mamă polinice similară cu celulele mamă megasporale. Unele studii au demonstrat că stoechiometria nativă a histonelor linker este critică pentru cursul corect al meiozei masculine și dezvoltarea ulterioară a grăuncioarelor de polen funcționale [259].

Histona H3 este una dintre cele cinci proteine histone principale implicate în structura cromatinei la eucariote [181].

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 gibberelinei s-a obținut un profil similar de expresie a genelor *HIS1-3* și *H3.1* de supraexprimare la toate fazele microsporogenezei (Figura 4.8, 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 gibberelinei perturbă cantitatea

de transcripți 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* – supraexpesate. 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* (Figura 4.8).

Din totalul variantelor analizate (patru gene și patru faze ale microsporogenezei) la plantele cu ASC genele au manifestat 31,25% supraexpresare, 37,5% subexpresare 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.

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

Profaza I reprezintă una din cele mai importante faze ale meiozei, care ocupă până la 90 % din întregul proces și este împărțită în cinci sub-faze: leptoten, zigoten, pachiten, diploten și diachineză, în care are loc procesul complex de împerechere cromozomială, sinapsis-ul și recombinarea omoloagă [106, 206]. Studiile anterioare au arătat că, chiasma – o structură vizibilă din punct de vedere citologic observată în timpul recombinării omoloage este de asemenea importantă pentru segregarea corectă a cromozomilor [102].

Segregarea cromozomială în meioză este esențială pentru stabilitatea ploidiei asupra ciclurilor de viață reproductive. La plante, segregarea defectuoasă a cromozomilor provocată de mutațiile genetice sau de alți factori conduce la formarea gameților neechilibrați sau reduși, creând, respectiv, descendenți aneuploizi sau poliploizi. Segregarea exactă necesită executarea coordonată a proceselor conservate care au loc în cele două diviziuni celulare meiotice [102]. Sinapsa și

recombinarea asigură stabilirea chiasmelor care dețin împreună cromozomii omologi, permițând separarea lor corectă în prima diviziune meiotică, care este, de asemenea, strâns reglată de eliberarea dependentă a ciclului celular și de atașamentul monopolar al kinetocorilor la microtubuli [133].

Recombinarea și sinapsis-ul sunt bine studiate, dar împerecherea cromozomilor omologi prezintă în continuare mai multe lacune. Înțelegerea bazei moleculare a segregării comozomiale ne-ar permite să manipulăm cu acest mecanism cu repercusiuni importante asupra eforturilor de creștere a plantelor [260, 261].

4.3.1 Caracteristica bioinformatică a genelor

MND1 (meiotic nuclear division protein 1) [CHAY11842.b1_D10.ab1]

Gena *MND1* a fost indentificată la un șir de plante, însă pentru genul *Helianthus* nu sunt informații în bancile de gene.

Programul BLASTX a identificat un transcript CHAY11842.b1_D10.ab1: DY915941 (808 pb) similar în proporție de 79% cu o secvență proteică ATMND1 (meiotic nuclear division protein 1-like) de la *Arabidopsis th*: NP_194646.2 9 (scor 292/292, valoare 3e-105, acoperire 77%). Gradul de prezumție în atribuirea funcțională a transcriptului utilizat în studiu crește cu atât mai mult cu cât este mai mare numărul de specii cu acoperire și identitate semnificativă. Astfel, primele o sută de exemple de homologie cu secvența ARNm de interes au un grad de acoperire inclus în limitele de la 83% [*Cynara cardunculus var. scolymus* KVH88835.1] - 64% [*Medicago truncatula*: XP_013453217.1] și de identitate de la 91% și 75% respectiv (Figura 4.9).

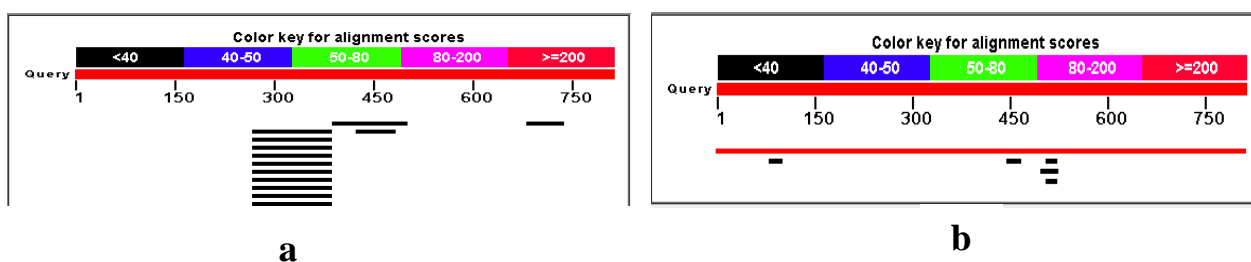


Fig. 4.9. Analiza bioinformatică a secvenței de interes CHAY11842.b1_D10.ab1.

Notă: a – blastn; b – tblastx.

Speciile care au prezentat cel mai înalt grad de similitudine sunt: *Cynara cardunculus*, *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annuum*, *Solanum pennellii*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Populus euphratica*, *Glycine max*, *Eucalyptus grandis*, *Glycine soja*, *Prunus persica*, *Fragaria vesca*, *Ricinus communis*, *Gossypium hirsutum*, *Phaseolus vulgaris*, *Brassica*

napus, Vigna radiata, Vitis vinifera, Malus domestica, Beta vulgaris, Capsella rubella, Medicago truncatula, Medicago truncatula, Brassica rapa, Brassica rapa, Theobroma cacao, Cucumis melo, Oryza sativa Japonica, Sorghum bicolor etc.

Scorul mare de omologie este determinat de domenele proteice conservate COG 5124 și Mnd1 cu rol funcțional în recombinarea meiotică [234].

Analiza (blastn și tblastx) a secvenței de interes CHAY11842.b1_D10.ab1 nu a prezentat similaritate semnificativă cu alte secvențe din colecția de nucleotide neredundante la acest gen - *Helianthus annuus* și nici din colecția de EST-uri (blastn) (Figura 4.9).

Consultarea portalului specializat <https://www.heliagene.org/HaT131/> pentru Meiotic Nuclear Division Protein 1 a indicat două secvențe HaT131075422_1_AA și HaT131034429_1_AA.

Pentru prima secvență HaT131075422_1_AA profilul de expresie (Retrieves cluster expression using Bios RNA-seq repository) a indicat o activitate de transcripție foarte mare în polen (3,61u.c.) și mult mai mică în stamine (0,15u.c.). Pentru secvența a doua HaT131034429_1_AA indicele de expresie arată valori de 0,02 pentru polen și 0,6 pentru stamine și cele mai mari valori (8,1) în limbul foliar.

Program BLASTN al secvenței de interes CHAY11842.b1_D10.ab1 verso HaT131075422_1_AA a indicat 95% identitate pe o porțiune de doar 27% (77-295 nc). În cazul secvenței a doua din arhiva portalului heliagene.org - HaT131034429_1_AA procentul de similaritate este de 98% (eroarea -0) pe întreaga regiune (100%) indicând astfel că este identic la nivel de secvență a nucleotidelor cu transcriptul studiat de către noi (*in silico* primerii se conțin, și generează un produs de amplificare cu aceeași dimensiune, 209 pb). Acest argument este demonstrat și prin analiza secvențelor Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences (Figura 4.10).

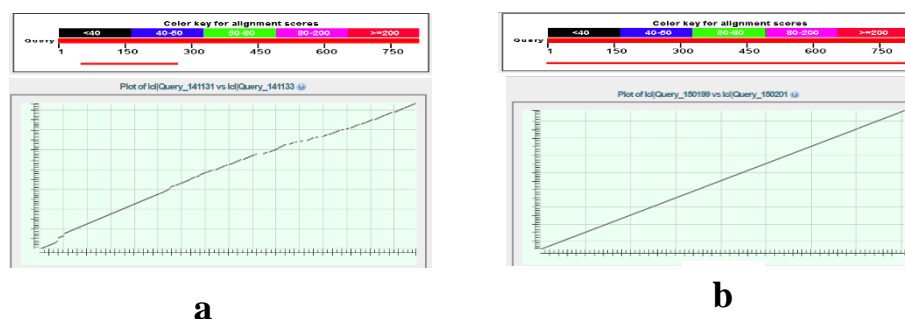


Fig 4.10. Analiza secvenței de interes prin programul BLASTN și Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences.

Notă: a – CHAY11842.b1_D10.ab1 verso HaT131075422_1_AA; b – HaT131034429_1_AA.

AHP2 (homologous-pairing protein 2) [CHWM9916.b1_H08.ab1]

În urma analizelor bioinformatică secvența ARNm omoloagă (BLASTX) proteinei de la *Arabidopsis thaliana*: NP_172791.1 AHP2 (homologous-pairing protein 2-like protein) care a fost luată în studiu este transcriptul de la *Helianthus argophyllus* - CHWM9916.b1_H08.ab1 (744 pb) cu un scor: 325/325 acoperire: 91%, valoare E:1e-118 și identitate: 73%. Adicional la simbolul de notație a genei *Arabidopsis AHP2* mai sunt și notațiile *Hop2*; *T6J4.9*; *T6J4_9* (Figura 4.11).

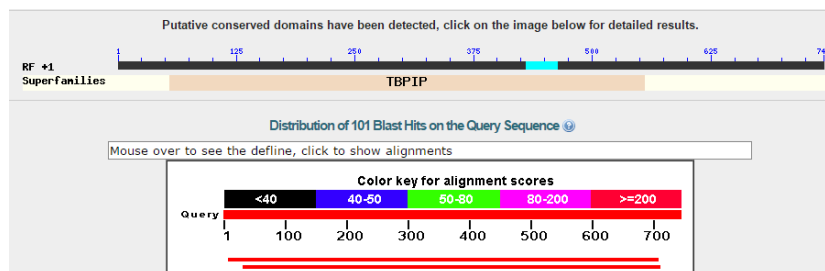


Fig. 4.11. Domeniul proteic conservat pentru gena *AHP2*.

Domeniul proteic conservat este TBPIP (Tat binding protein 1(TBP-1)-interacting protein, InterPro:IPR010776) care și determină gradul mare de similaritate 86% - 77% (indicat reieșind din primele 100 de secvențe) la numeroase specii: *Cynara cardunculus*, *Daucus carota*, *Sesamum indicum*, *Erythranthe guttata*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana sylvestris*, *Capsicum annuum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Glycine max*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Vigna angularis*, *Brassica rapa*, *Capsella rubella*, *Medicago truncatula*, *Populus euphratica*, *Beta vulgaris*, *Cucumis melo*, *Fragaria vesca*, *Gossypium arboreum*, *Ricinus communis*, *Cucumis sativus*, *Spinacia oleracea*, *Citrus clementina*, *Prunus mume*, *Prunus persica*, *Eucalyptus grandis*, *Malus domestica*, *Medicago truncatula* etc.

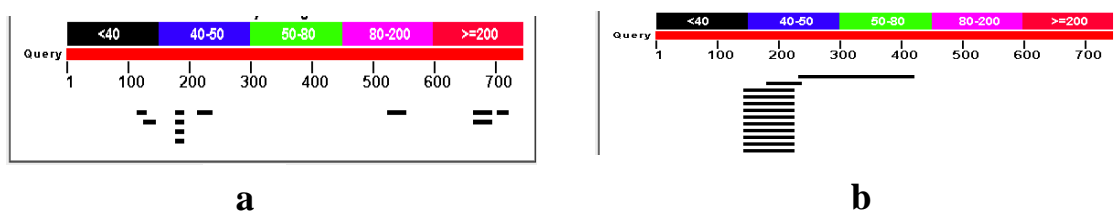


Fig. 4.12. Analiza secvenței CHWM9916.b1_H08.ab1.

Notă: a – Programul BLASTN; b – TBLASTX.

Explorarea (BLASTN și TBLASTX) colecției de nucleotide neredundante pentru *Helianthus*, cu utilizarea secvenței -test CHWM9916.b1_H08.ab1 nu a relevat secvențe similare semnificative (Figura 4.12).

Portalul Heliagene [295] conține o singură secvență (413 nc) tradată *in silico* pentru căutarea: homologous-pairing protein 2 (1 hits in peptides index) HaT131057293_1_AA: Tat binding protein 1-interacting, care comparată cu secvența utilizată în studiul nostru prezintă similaritate la nivel de 99% pe 55% din lungime (determinat de faptul că este mai scurt), începând cu nc. 322 până la nc. 732, cu scorul 747/747 (valoarea E-0). Teoretic aceste date sugerează asupra prezenței unui transcript în *H. annuus* omolog celui din *H. agrofilius*.

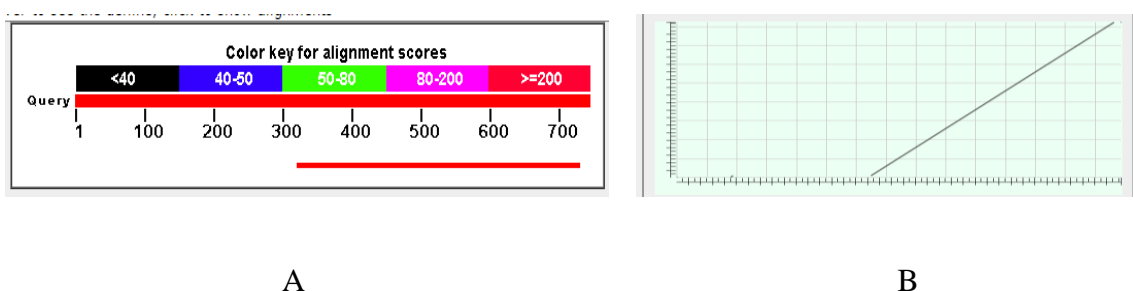


Fig. 4.13. Analiza secvenței de interes CHWM9916.b1_H08.ab1 prin Program BLASTN (A) Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences (B).

Primerii elaborați pentru secvența din studiul nostru generează un amplicon de 102 pb pentru regiunea cuprinsă între 177-278 nc.

Pentru secvență HaT131057293_1_AA profilul de expresie (Retrieves cluster expression using Bios RNA-seq repository) a indicat o activitate de transcripție foarte mare în frunze (2,6 u.c.) și lipsa expresie în stamine și polen.

ASK1/SKP1(S-phase kinase-associated protein 1) [DH0AC015ZD03FM1]

Secvența transcriptului analizat conține domenele caracteristice familiei SKP1 (proteina kinetocor necesară pentru progresia ciclului celular) și omologul elongin C (subunit of RNA polymerase II transcription factor SIII) (Figura 4.14).

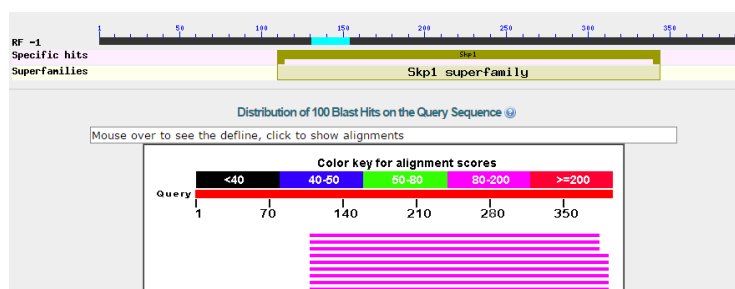


Fig. 4.14. Domene caracteristice familiei SKP1.

Transcriptul studiat DH0AC015ZD03FM1 este similar cu S-phase kinase-associated protein 1 de la *Arabidopsis thaliana*: NP_565123.1 (128/ 128 62% 7e-44 84%). Sunt cunoscute câteva notații ale genei: *SKP1*; *ASK1*; *ATSKP1*; *S phase kinase-associated protein 1*; *SKP1*; *SKP1A*; *T4O12.17*; *T4O12_17*; *UFO INTERACTING PROTEIN 1*; *UIP1*.

De fapt mai mare similaritate are cu *ASK2 /SKP1-like protein 1B* [*Arabidopsis thaliana*: NP_568603.1](139/139, 62%, 8e-48 , 91%).

Compararea tblastx și blastn în Nucleotide Collection (NC) cu cele din *Helianthus* nu indică similarități semnificative.

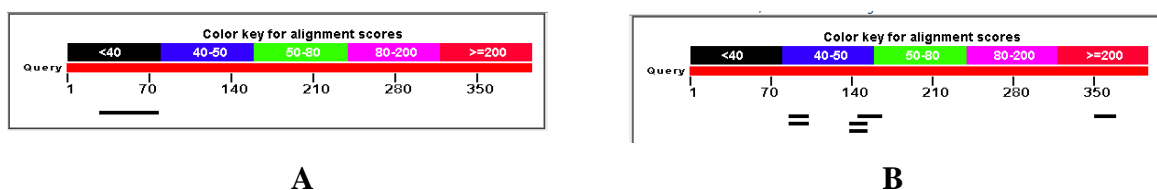


Fig. 4.15. Analiza secvenței DH0AC015ZD03FM1 prin Programele BLASTN (A) și TBLASTX (B).

Analiza a 11 *EST*-uri stocate pe site-ul <https://www.heliagene.org/HaT131> (11 hits in clusters index) a pus în evidență un ARNm HaT131010000_1_AA de 768 nt cu grad mare de similaritate (666/687, 97% ,0.0, 99%) 394pb /768 Program BLASTN 2.4.0 catena plus/minus. BLASTX indică acoperire cu T131010000_1_AA de 69%, identitate 100%, scor 167/167, E:1e-58 (Figura 4.15).

DYAD [*HaEST*: CCFS4185.b1_B16.ab1]

Conform datelor din literatură, exprimarea genei *DYAD* este specifică meiocitelor feminine și masculine, cercetări referitor la această genă sunt în mare parte pentru meioza feminină. Acest lucru reprezintă un inbold pentru studierea genei *DYAD* în microsporogeneza la floarea – soarelui [3].

Programul BLASTX a evedențiat ARNm, clona CCFS4185.b1_B16.ab1 (776 nc) care prezintă similaritate cu *Arabidopsis th.*: NP_568757.2 (scor 98.6/190, acoperire 46% 2e-27 identitate 59%). Această genă se întâlnește în literatura de specilaitate că *DYAD*; *MFG13.3*; *MFG13_3*; *SWI1*; *SWITCH1*.

Alte specii de plante la care este cunoscută secvența nucleotidică ce codifică pentru proteina DYAD-like (protein DYAD, PREDICTED: protein DYAD-like) și prezintă similaritate cu secvența genică studiată pe o regiune de 27-40 % sunt *Vitis vinifera*: [XP_010647369.1] cu 59%

similaritate, *Pyrus x bretschneideri* [XP_009372240.1] - 69%, *Erythranthe guttata* [XP_012858696.1] - 64%, *Malus x domestica* [XP_008360558.2] -70%.

Căutarea la peste 20 specii și genuri diferite de plante a unor domene proteice specifice acestei categorii funcționale de proteine nu a dat rezultat pozitiv.

Secvența genică supusă studiului a indicat un domen proteic DUF3611 (Protein of unknown function), caracteristic unei familii de proteine identificate la bacterii și eucariote. Proteinele care aparțin acestei familii, de obicei au între 180 și 205 aminoacizi în lungime.

Consultarea portalului Heliagene [295] după cuvintele cheie DYAD, a rezultat 3 secvențe cu IPR022051:Protein of unknown function DUF3611, dintre care HaT131024628 de 1298 nt a indicat 95% identitate cu secvența studiată (776 nc) pe o regiune de 92% (scor 1126, E = 0). Pentru secvența HaT131024628 profilul de expresie (Retrieves cluster expression using Bios RNA-seq repository) a indicat o activitate de transcripție foarte mare în polen (4,4 u.c.).

4.3.2. Analiza rezultatelor de expresie

În efortul de a descoperi noi principii care guvernează expresia genelor *AHP2*, *MND1*, *DYAD* și *ASK1* cu rol în segregarea cromozomilor, au fost integrate și analizate datele obținute la diferite faze de dezvoltare a microsporului la plantele cu androsterilitate citoplasmatică și cu androsterilitate indusă.

Studiile realizate referitor la expresia genei *MND1* în mare parte s-a realizat la planta model *Arabidopsis thaliana*. Nivelul de bază a exprimării genei respective a fost observată în țesuturile reproductive. În plus, expresia puternică a *AtMND1* a fost determinată în lobiile anterelor aflate în meioză. Cea mai mare creștere a expresiei a fost detectată în celulele sporogene la stadiul 4 al anterei [225]. Expresia puternică a fost observată în anterele din stadiul 5 în celulele mamă polinice și, de asemenea, în tapet. Un nivel ridicat de exprimare a continuat să fie observat în celulele meiotice a anterei din stadiul 6, care a scăzut după meioză. O creștere a exprimării *AtMND1* a fost de asemenea detectată în celulele mamă megasporale, deși nu la fel de puternic cum sa observat în microsporocite [186].

Deasemenea utilizând metoda RT-PCR unii cercetători au comparat expresia genei *AtMND1* între frunzele din rozetă și inflorescență, la *Arabidopsis*. Astfel rezultatele indicat o expresie de 9 ori mai mare a genei *AtMND1* în țesuturile reproducătoare față de frunze, ceea ce indică un rol posibil în dezvoltarea reproductivă [186].

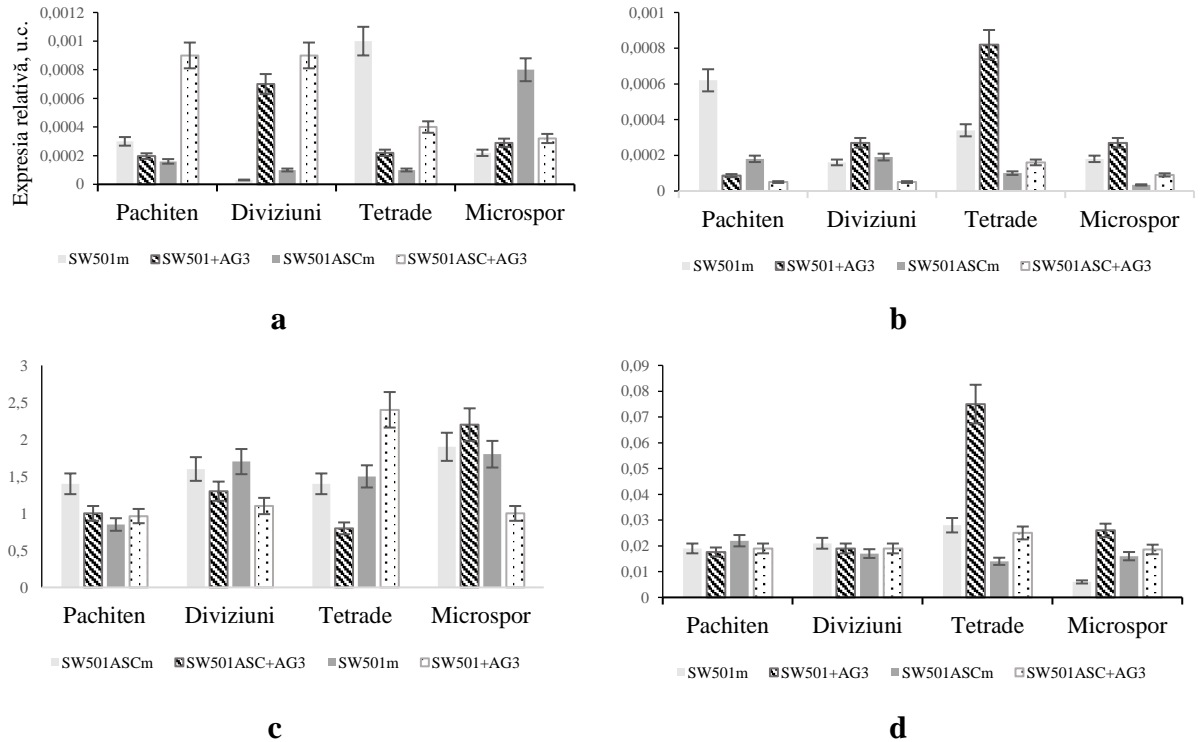


Fig. 4.16. Activitatea transcripțională a genelor cu rol în segregarea cromozomilor la plantele de floarea-soarelui.

Notă: a – *MND1*; b – *AHP2*; c – *ASK1*; d – gena *DYAD*.

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 4.16, 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. Din grupul genelor cu rol în segregarea cromozomilor cea mai mare activitate a genelor a fost prezentată de gena *ASK1*, iar genele *MND1* și *AHP2* au avut cantitatea de transcripții cea mai joasă (Figura 4.16, a,b).

Activitatea transcripțională pentru gena *AHP2* a fost similară pentru plantele cu ASC și ASI în pachiten (subexpresie) și în faza de diviziuni (supraexpresie, 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 4.17, b).

La *Arabidopsis* Shommer și colab. (2003) au detectat prin PCR semi - cantitativ o expresie comparabilă a genei *AHP2* în țesuturile reproductive și vegetative. Astfel, s-a demonstrat expresia genei respective în mugurii floralii. Având în vedere comunicarea extinsă permisă de canalele citomixice, este probabil că nivelul de silențiere a genei *AHP2* este foarte similar în meiocitele aceleiași antere [208]. Canalele citomixice permit mișcarea materialului nuclear între celulele interconectate până când meiocitele sunt complet izolate de peretele calozic. Cu toate acestea, la *Arabidopsis* s-a observat un amestec de meiocite normale și anormale, care este însoțit ulterior de un amestec de polen viabil și neviabil. Aceste observații sugerează că există un prag al funcției *AHP2*, atunci când acesta este atins se produce meioza normală și formarea polenului viabil, însă când este sub pragul funcției se induce o meioză aberantă și formarea polenului neviabil [220]. Deasemenea cercetările acestor savanți au dus la concluzia că plantele mutante *ahp2* în stare homozigotă prezintă atât sterilitate masculină, cât și feminină și nu formează bivalenți, rezultate similare au fost observate și pentru forma mutantă *mnd1* [133]. Astfel, s-a constatat că în meiocitele *ahp2* în anafaza I și II prezintă aberații extinse a cromozomilor așa ca fragmentare, punte cromatinică și segregare dezechilibrată.

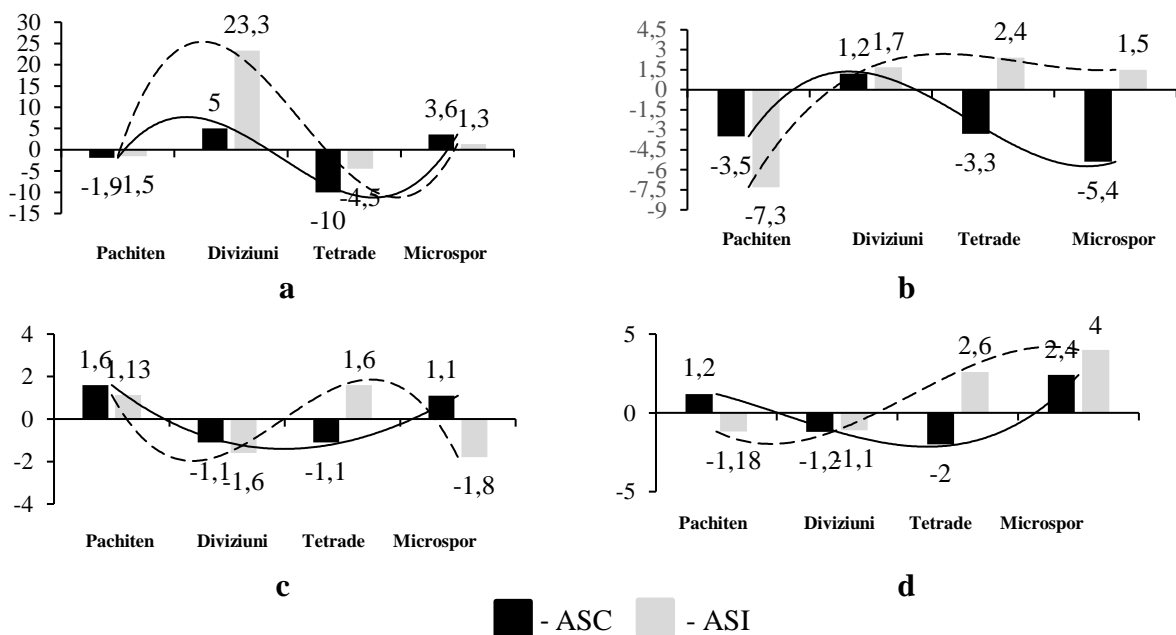


Fig. 4.17. Modificarea activității transcripționale experiență/control (*fold change*) a genelor în segregarea cromozomilor la linia SW501ASC și SW501ASI în diferite faze ale microsporogenezei.

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

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 ne semnificativ 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 4.17, c).

Yang și colab. (1999) au demonstrat că gena *ASK1* este necesară pentru separarea cromozomilor omologi în timpul meiozei masculine. *ASK1* controlează acest proces prin degradarea proteinelor necesare, direct sau indirect, pentru asocierea omologilor înainte deanafaza I [275]. La formele mutante *ask1* omologii sunt distribuiți neuniform și separarea cromatidelor este anormală în timpul meiozei II. În contrast, mutația *ask1-1* determină producerea tetradelor cu un număr variabil de microspori care au dimensiuni variate și par să aibă diferite cantități de ADN, ca rezultat duce la formarea polenului neviabil și la sterilitatea masculină [285]. Studiile indică faptul că gena *ASK1* este importantă pentru controlul structurii cromatinei meiotice și reorganizarea generală a cromozomilor în timpul leptotenului, incluzând deacetilarea histonei *H3* în timpul profazei I, migrarea telomerilor din nucleol, structura și organizarea ADNc, eliberarea cromatinei din nucleol și membrana nucleară. *ASK1* se presupune că controlează structura cromozomului meiotic în mai multe moduri. În primul rând, *ASK1* ar putea regla degradarea unei proteine care controlează tranziția din leptoten la zigoten [285]. La drojdie, gena *SKP1* unică promovează progresia ciclului celular mitotic prin facilitarea degradării unui inhibitor al ciclinelor în fază S, permițând astfel replicarea ADN-ului [160]. Modificările observate în structura/reorganizarea cromatinei ar fi o consecință a acestei tranziții. Alternativ, *ASK1* ar putea regla interacțiunea cromozomilor meiotici cu matricea/membrana nucleară.

În plus față de implicarea sa în răspunsul hormonal și dezvoltarea florilor, gena *ASK1* este, de asemenea, necesară pentru meioza masculină și gradul de fertilitate [277]. Mutația *ask1-1* produce poliade care conțin microspori cu mărime și număr variabil, ce duc la formarea grăuncioarelor de polen neviabil și sterilitate masculină.

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 4.17, 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 finalizarea procesului meiotic [166]. Studiile efectuate de către Agashe și colab.,

sugerează că gena *DYAD* acționează în mod specific în meioză având funcția în coeziunea cromatidelor [3]. Coeziunea dintre cromatidele surori joacă un rol-cheie în organizarea și segregarea cromozomilor în timpul meiozei. Mutații în gena respectivă duc la absența formării bivalenților și la pierderea precoce a coeziunii dintre cromatide în timpul meiozei masculine. Momentul expresiei genei *DYAD* corespunde fazei premeiotice sau profazei meiotice timpurii.

Lipsa completă a etapelor de zigoten și pachiten și observarea a zece univalenți ce reprezintă o clasă majoră în meiocitele feminine indică în mod clar o eroare al sinapsis-ului la mutantul *dyad*.

Cercetările realizate prin hibridizarea a ARN *in situ* s-a demonstrat că exprimarea genei *DYAD* în inflorescență este specifică meiocitelor feminine și masculine [3].

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 linia 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 4.17, 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 *MNDI* 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 *ASKI* 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% subexpresie 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.

4.4. Evaluarea nivelului de expresie a genelor cu funcții în formarea și activitatea 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 [206, 236].

Dezvoltarea polenului a exercitat un mare interes datorită importanței sale fundamentale în reproducerea plantelor, interacțiunea unică între generația diploidă și haploidă și potențialul său ca un sistem model pentru studii în polaritatea celulelor, soarta celulară și de model de semnalizare [20]. Grăuncioarele de polen sunt înconjurate de un perete, care protejează gametofitul masculin de diferiți factori de mediu, de atacuri microbiene și facilitează, de asemenea, polenizarea. Dezvoltarea peretelui grăunciorului de polen necesită metabolismul lipidic și polizaharidic, iar unele gene-cheie și proteine care participă la aceste procese au fost recent identificate [104].

4.4.1. Caracteristica bioinformatică a genelor *EXPA1*, *GSL12*

GSL12 (callose synthase 3) [CCFS6501.b1_J18.ab1]

Pe parcursul meiozei are loc depozitarea calozei, astfel încât fiecare dintre microsporiile tetradei să fie înconjurați de către acest polizaharid. Studiile biochimice și moleculare realizate la mai multe specii de plante indică faptul că caloza este sintetizată de o clasă de enzime, denumite caloz-sintaze. La planta model *Arabidopsis thaliana*, au fost identificate doisprezece gene *GSL* (glucan synthase-like), care codifică enzima dată [104]. Majoritatea studiilor efectuate pe *Arabidopsis* au demonstrat că mai multe gene *GSL* sunt implicate în dezvoltarea polenului. Enns și colaboratorii au raportat că gena *GSL1* și *GSL5* sunt necesare în dezvoltarea polenului și sunt responsabile pentru formarea peretelui din caloză care separă microsporiile din tetrade [70].

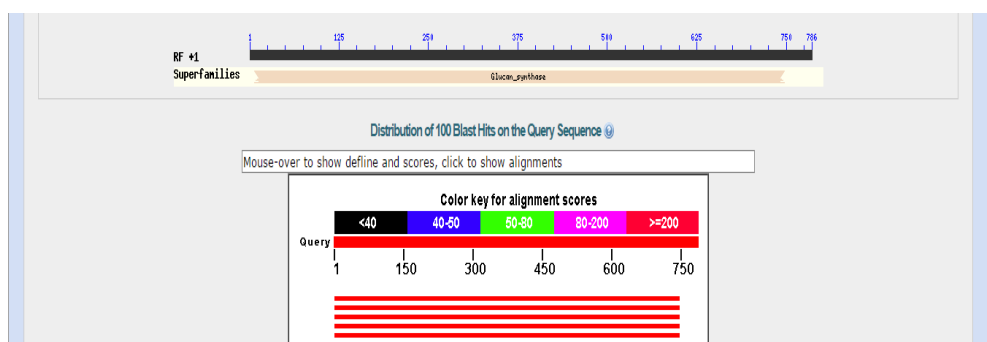


Fig. 4.18. Domene proteice conservate pentru familia Glucan_synthase.

CCFS6501.b1_J18.ab1 (786 nc) callose synthase 3 prezintă secvență omoloagă cu *A. thaliana* NP_196804.6 (463/543 99% 9e-155 88%) cunoscută de asemenea ca *ATGSL12*; *glucan synthase-like 12*; *gsl12*; *GSL12*; *T24H18.170*; *T24H18_170*.

Conține domeniul proteic conservat pfam02364: Glucan_synthase 1,3-beta-glucan synthase component. Această familie constă din diferite componente de 1,3-beta-glucan sintaza, incluzând *Gls1*, *Gls2* și *Gls3* la drojdie. 1,3-beta-glucan sintetaza EC: 2.4.1.34, de asemenea, cunoscută sub

numele de calozo-sintaza, catalizează formarea unui polimer beta-1,3-glucan, care este o componentă majoră a peretelui celular fungic. Reacția catalizată este: - UDP-glucoza + {(1,3)-beta-D-glucosyl}(N) \rightleftharpoons UDP + {(1,3)-beta-D-glucosyl}(N+1) (Figura 4.18).

EXPA1 (expansin A1) [CCFT9238.b1_K05.ab1]

Pentru plantele de *Helianthus annuus* nu este adnotată în baza de date NCBI secvența genei codificatoare pentru proteina expansin A1.

BLASTX a pus în evidență prezența unui ARNm, clona CCFT9238.b1_K05.ab1 (786 nc) similară la nivel de 85% cu proteina expansin A1 de la *Arabidopsis th.*: NP_177112.1 (scor 345/345, acoperire 86%, valoare E: 1e-125). Acest grup de proteine sunt localizate în peretele celular, regiunea extracelulară, membrane și sunt implicate în destinderea și organizarea peretelui celular, răspunsul la giberelină, răspunsul la lumina infraroșie, formarea sincițiului și creșterea unidimensională a celulei. Este expresată în cotiledoane, hipocotil, baza și apexul limbului foliar, apexul rădăcinii, carpele, inflorescență, stamine, polen, petale, flori, celule de protecție, rădăcină, semință, sepale, etc.

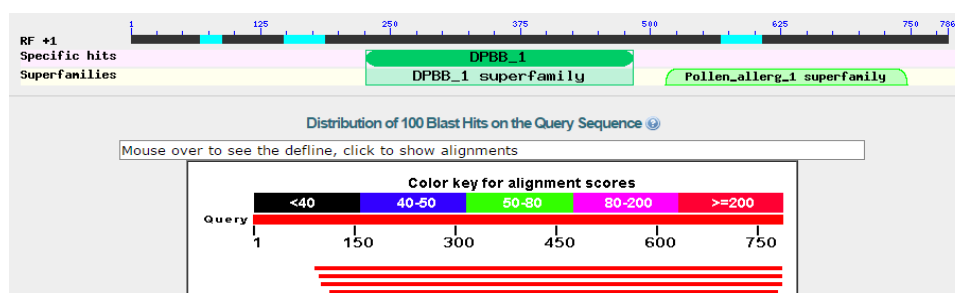


Fig 4.19. Domene proteice conservate pentru familia Expansine.

De asemenea, un grad mare de similaritate a transcriptului se constată la un număr mare de specii, inclusiv cu Expansin-A15 -like protein la *Gossypium arboreum*: KHG01029.1 (scor: 349, acoperire: 84%, valoare E: 3e-119, identitate: 87%) și Expansin-A10 -like protein de la *Gossypium arboreum*: KHG18125.1 (scor: 349, acoperire: 84%, valoare E: 3e-119, identitate: 86%) (Figura 4.19). În colecțiile UniGene se identifică în total 6 *EST*-uri din 4 librării ADNc, care reprezintă ipotetic, gena codificatoare de proteină - expansin A1 la *H. annuus* (sunflower putative protein-coding gene).

Căutarea BLASTN în colecția de nucleotide *Helianthus annuus* a unor posibile secvențe ale genei codante de expansine similare cu transcriptul analizat - CCFT9238.b1_K05.ab1. ce nu a prezentat omologii semnificative (Figura 4.20, A).

Căutarea prin cuvinte cheie a pus în evidență locusul: ACO58770.1, care codifică o secvență proteică de 68 aminoacizi definită ca expansin A4-like protein, parțial [*Helianthus annuus*]. BLASTX al secvenței transcriptului luat în studiu cu expansin A4-like protein [*Helianthus annuus*] indică un grad foarte mic de similaritate (scor: 72.4/72.4, acoperire: 25%, valoare E: 7e-22, identitate: 66%) (Figura 4.20, B).

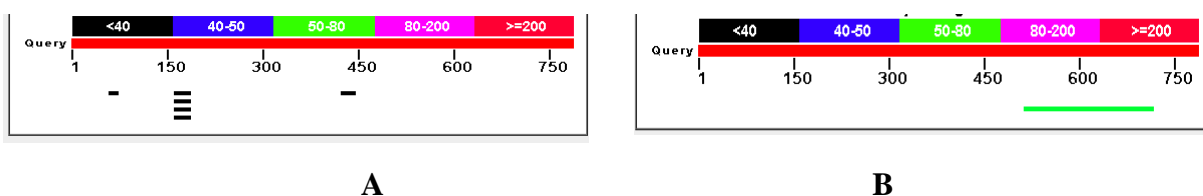


Fig. 4.20. Analiza secvenței CCFT9238.b1_K05.ab1. prin Programele BLASTN (A) și TBLASTX (B).

Baza de date HELIAGENE [295] prezintă transcripți la floarea-soarelui ipotetic atribuiți funcțional la expansine, cu diferit grad de expresie în diferite organe, dar secvența genică a acestora nu prezintă similaritate cu transcriptul studiat în această lucrare.

4.4.2. Analiza rezultatelor de expresie

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.

Caloza reprezintă o sursă de carbohidrați necesară pentru dezvoltarea microsporilor [177]. Ireșibilitățile de depunere a calozei în jurul celulelor mamă polen și distrugerea prematură a acesteia, pare a fi responsabilă pentru inducerea sterilității masculine. Experiențele oținute la liniile antrosterile de *Petunia hybrida* demonstrează că CMP nu erau înglobate în peretele calozic după profaza I. Prezența acestor anomalii se presupune că se datorează lipsei de caloză atât la petunie sterilă masculină, cât și la linia de sorg cu androsterilitate. La plantele fertile, enzima calazei apare numai în stadiul de tetrade, în timp ce la plantele sterile este detectată o activitate puternică a calazei în timpul profazei I. Astfel, s-ar putea concluziona că activarea precoce a enzimei calazei

este responsabilă pentru instalarea sterilității citoplasmice masculine la petunie. Cu toate acestea, nu se știe dacă acesta este singurul factor care contribuie apariția androsterilității [70].

Datele analizelor cantitative obținute pentru genele cu funcții în formarea și activitatea membranelor celulare, relevă că cea mai mare concentrație de transcripți a fost înregistrată pentru gena *EXPA1* (Figura 4.21, b).

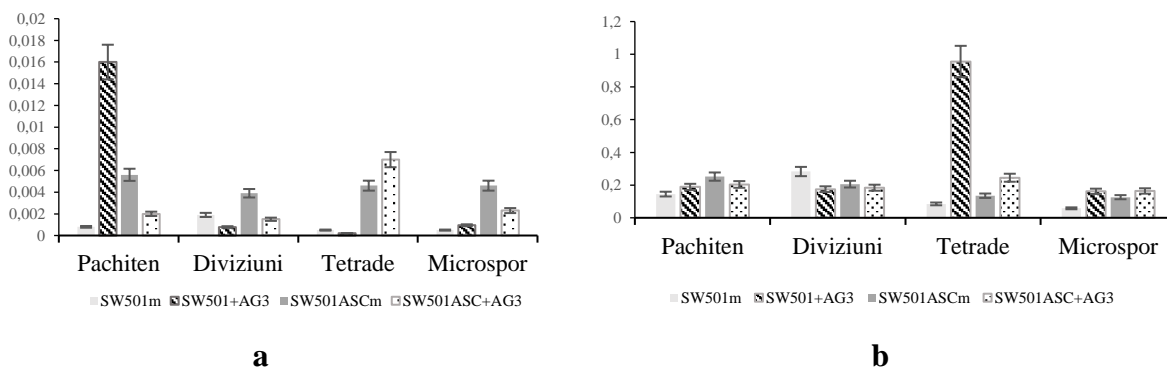


Fig. 4.21. Activitatea transcripțională a genelor cu funcții în formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare

Notă: a – *GSL12*; b – *EXPA1*.

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.

Integrând 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.

Expansina reprezintă o proteină ce intră în componența peretelui celular, care reprezintă un factor de reglare a creșterii celulare. Aceasta joacă un rol important în extensia peretelui celular de plante [149]. Diferite tipuri de proteine modificatoare ale peretelui celular, cum ar fi proteina expansina și alte enzime, sunt implicate în dezasamblarea peretelui celular. Expansinele sunt implicate în procese de polenizare și fecundare, dezvoltarea frunzelor și a rădăcinii, etc [48].

Expansiniile sunt cunoscute ca aparținând unei familii de proteine multigenice și astfel s-a demonstrat că au *patterne* de expresie cu specificitate de organ [267], țesut [44] și celulă [150]. Expresia unor expansine este, de asemenea reglată de fitohormoni [10], care reflectă prezența

elementelor răspunsului auxinei, giberelinei, etilenei și acidului abscisic în promotorii corespunzători [150].

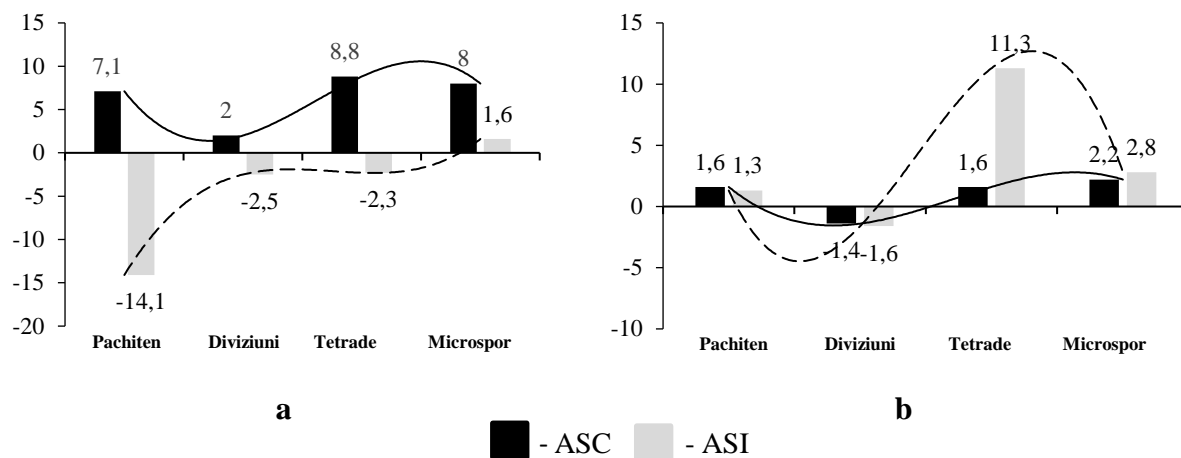


Fig. 4.22. Modificarea activității transcripționale experiență/control (*fold change*) a genelor în formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare la linia SW501ASC și SW501ASI în diferite faze ale microsporogenezei.

Notă: a – *GSL12*; b – *EXPA1*.

Rezultatele obținute în studiul dat prezentate în figura 4.22 b 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 [82].

Conform datelor din literatură expresia genei *CpEXPI* la *Chimonanthus praecox* este mai mare în organele reproductive decât în petale [155]. În stamine s-a înregistrat o expresie maximă între toate organele florilor studiate, care erau de aproape 70 de ori mai mari decât cele din cotiledon. De asemenea, nivelurile de transcripție ale genei *CpEXPI* din mugurii floralii au crescut treptat în primele etape ale dezvoltării florale de la etapa 1 până la etapa 4 și au prezentat maximum

de expresie la etapa 4. Similar expresiei *GgEXPA1* la gladiole [10], expresia *CpEXP1* a scăzut după etapele de înflorire (etapele 5 până la 6) în procesul de la inflorescență la senescență [155].

Luată 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 nesemnificative 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.

Generalizând rezultatele obținute s-a constatat că din totalul variantelor analizate (zece gene, patru faze ale microsporogenezei și două linii cu fenotip steril) genele au manifestat 47,5% supraexpresie, 27,5% subexpresie și 25% nu au atins pragul semnificației statistice (Tabelul 4.4). Au fost identificate gene (*CycD3*, *MND1*, *EXPA1*) cu tendință de expresie similară la ambele tipuri de androsterilitate pe tot parcursul microsporogenezei.

Tabel 4.4.
Direcția de modificare a expresiei genelor asociate cu sterilitatea masculină la plantele cu ASC și ASI

Gena	Pachiten		Diviziuni		Tetrade		Microspor	
	ASC	ASI	ASC	ASI	ASC	ASI	ASC	ASI
<i>CycD3</i>	0	0	+	+	0	+	+	+
<i>PCNA</i>	-	-	-	0	0	+	0	+
<i>H1</i>	+	+	+	+	-	+	0	+
<i>H3</i>	+	+	-	+	-	+	-	0
<i>MND</i>	-	-	+	+	-	-	+	0
<i>AHP2</i>	-	-	0	+	-	+	-	+
<i>ASK1</i>	+	0	0	-	0	+	0	-
<i>DYAD</i>	0	0	0	0	-	+	+	+
<i>GSL12</i>	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>EXPA1</i>	+	0	0	-	+	+	+	+

Notă: - subexpresie; + supraexpresie; 0 - statistic nesemnificativ.

Necâtând la faptul că fenotipic ambele linii sunt sterile, *pattern*-ul de expresie a genelor implicate în diverse etape ale microsporogenezei este diferit, ceea ce ne sugerează că mecanismul de inducere a androsterilității nu este similar. Astfel, investigarea profilului de expresie a zece gene la patru faze ale microsporogenezei a plantelor cu androsterilitate comparativ cu cele fertile a demonstrat activitatea transcripțională în dependență de tipul de sterilitate. S-a constatat că numărul genelor supraexpresate la plantele cu ASC descrește începând cu pachiten până la faza de tetrade (50 – 20%), iar la plantele cu ASI este în creștere (20 – 80%). Însă la plantele cu androsterilitate indusă numărul genelor subexpresate descrește începând cu prima faza până la

ultima (40 – 10%). Astfel, putem remarca că mecanismul de inducere a androsterilității prin aplicarea giberelinelor nu este similar cu cel al androsterilității citoplasmatică.

Analiza activității transcripționale în dependență de grupul de gene a permis identificarea în dinamica expresiei genelor implicate în organizarea cromozomilor și reglarea metabolismului ADN. La plantele cu ASC numărul genelor supraexpresate, subexpresate și cu nivel de expresie nesemnificativ a fost aproximativ același (supraexpresie 31,25%, subexpresie 37,5% și expresie neschimbată 31,25%). Supraexpresia genelor (75%), implicate în organizarea cromozomilor și reglarea metabolismului ADN, la plantele cu ASI duce destabilizarea echilibrului între sinteza abundentă a produselor de expresie și menținerea replicării ADN-ului pentru compactizarea corectă a cromozomilor. Aplicarea exogenă a giberelinelor a determinat supraexpresia (43,75%) și subexpresia (31,25%) genelor cu rol în segregarea cromozomilor, fapt ce perturbă concentrația de transcripți care duce la fragmentarea cromozomilor și incapacitatea de recunoaștere a cromozomilor omologi, ca rezultat formându-se polen neviabil.

La plantele cu ASC supraexpresia genelor (85%) implicate în biosinteza calozei, formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare este asociată cu identificarea conglomeratelor de caloză în preparatele citologice și prezența anterelor mici și subțiri, comparativ cu plantele fertile. La plantele cu ASI formarea grăuncioarelor de polen sterile poate fi asociată de sinteza insuficientă a calozei sintetizată de genele subexpresate (50%), și prezența anterelor mici și subțiri asemănător plantelor cu ASC, de genele supraexpresate (37,5%). S-a identificat o tendință similară de expresie la plantele cu ASI a genelor *PCNA* și *H3.1* implicate în organizarea și reglarea metabolismului ADN, la plantele cu ASC a genelor cu rol în segregarea cromozomilor – *ASK1* și *DYAD*, și a genelor cu funcții în formarea și activitatea peretelui/membranelor celulare – *GSL12* și *EXPA1*.

Aceste gene prezintă diferite *patterne* de expresie în timpul ciclului celular, reflectând anumite funcții, precum trecerea de la meioza I la meioza II, controlul replicării ADN – ului, etc.

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.

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 crește/scade sinteza proteinelor, în urma cărora se formează grăuncioare de polen neviabili sau lipsa acestora la liniile sterile.

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 4.23).

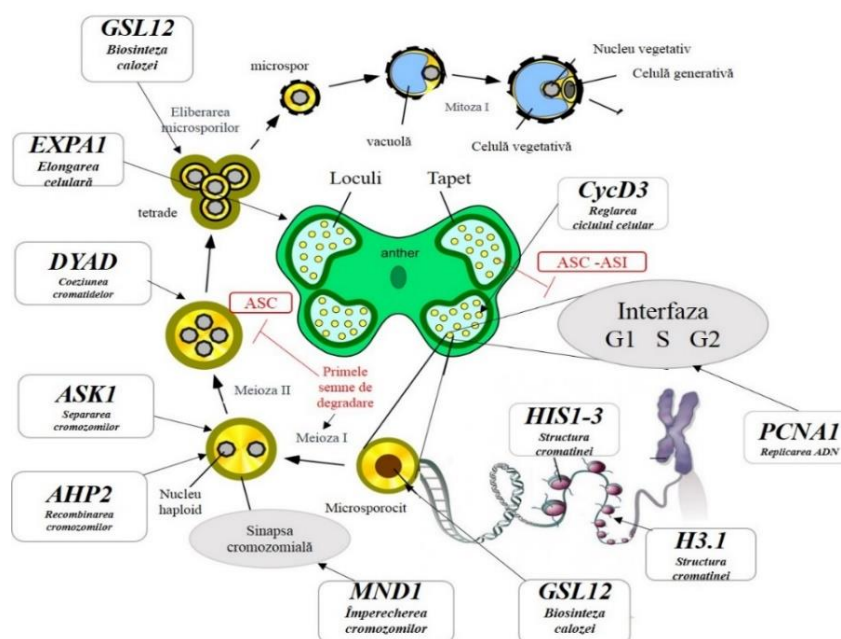


Fig. 4.23. Gene implicate în reglarea ciclului celular, segregarea cromozomilor și inducerea androsterilității la floarea-soarelui.

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*, *SWII/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.

4.5. Concluzii la capitolul 4

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.

1. Rezultatele expresiei a trei grupuri de gene implicate în microsporogeneză au determinat 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.

2. 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.
3. 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 obținerea modificată în dimensiuni a anterelor la plantele cu ASC și ASI.

CONCLUZII GENERALE

Cercetările fenologice, histoanatomice, citogenetice și moleculare au pus în evidență efect gametocid semnificativ al giberelinei (AG_3), 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 [289].
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 [64].
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 [175].
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 [66].

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” [64, 65, 175, 176, 289].
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 [66].

BIBLIOGRAFIE

1. Aarts M.G., Hodge R., Kalantidis K., et al. *The Arabidopsis* MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. In: *Plant J.*, 1997, vol. 12, p. 615-623.
2. Abdel-Ghani A.H., Frey F.P., Parzies H.K. Effect of temperature on the expression of cytoplasmic male sterility in cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Plant Breeding*, 2012, vol. 132, p. 42–47.
3. 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.
4. Almendral J.M., Huebsch D., Blundell P.A., et al. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1987, vol. 84, p. 1575-1579.
5. Amjad M., Akhtara J. Integrating role of ethylene and ABA in tomato plants adaptation to salt stress. In: *Scientia Horticulturae*, 2014, vol. 172, p. 109-116.
6. Andronic L. Evidence of meiotic recombination in virus infected tomato. In: *Buletinul AȘM*, 2010, vol. 2(311), p. 8-15.
7. 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.
8. Arunika H.L., Gunawardena A.N., Pearce D.M., et al. Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). In: *Planta*, 2001, vol. 212(2), p. 205-214.
9. Avila C.M., Atienza S.G., Moreno M.T. Development of a new diagnostic marker for growth habit selection in faba bean (*Vicia faba* L.) breeding. In: *Theor. Appl. Genet.*, 2007, vol. 115(8), p. 1075-1082.
10. Azeez, A., Sane, A. P., Tripathi, S. K., et al. The gladiolus *GgEXPA1* is a GA-responsive alpha-expansin gene expressed ubiquitously during expansion of all floral tissues and leaves but repressed during organ senescence. In: *Postharvest Biol. Technol.*, 2010, vol. 58, p. 48-56.
11. Bajpai A., Singh A. K. Meiotic behavior of *Carica papaya* L.: spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in north Indian conditions. In: *Cytologia*, 2006, vol. 71, p. 131-136.
12. Barakate A., Higgins J.D., Vivera S., Stephens J. The synaptonemal complex protein ZYP1 is required for imposition of meiotic crossovers in barley. In: *Plant Cell*, 2014, vol. 2, p. 729-740.

13. Barbacaru N., Belousova G. Identificarea la porumb a unor transcripti 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.
14. 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.
15. Baydar H., Gokman O.H. Hybrid seed production in safflower following the induction of male sterility by gibberellic acid. In: Pl. Bred., 2003, vol. 122, p. 459-461.
16. Bellucci M., Roscini C., Mariani A. Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. In: J. Hered., 2003, vol. 94(6), p. 512-516.
17. Bertoli C., Skotheim J.M., de Bruin R.A. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. In: Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2013, vol. 14, p. 518-528.
18. Bhat V., Dwivedi K. K., Khurana J. P. Apomixis: An enigma with potencial applications. Special section: Embriology of flowering plants. In: Current Science, 2005, vol. 89(10), p. 1879-1893.
19. Bhatt A.M., Canales C., Dickinson H.G. Plant meiosis: the means to 1N. In: Trends Plant Sci., 2011, vol. 6, p. 114-121.
20. Blackmore S., Wortley A.H., Skvarla J.J. Pollen wall development in flowering plants. In: New Phytol., 2007, vol. 174(3), p. 483-498.
21. Blázquez M.A., Trénor M., Weigel D. Independent Control of Gibberellin Biosynthesis and Flowering Time by the Circadian Clock in *Arabidopsis*. In: Plant Physiology, 2002, vol. 130(4), p. 1770-1775.
22. Boateng K.A., Makaroff K. The *dys10* mutation affects sister chromatid cohesion and synapsis during meiosis in *A. thaliana*. In: The FASEB Journal, vol. 20(5), 2006, p. 894-895.
23. Bohra A., Jha U.C., Adhimoolam P. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. In: Plant Cell Rep., 2016, vol. 35, p. 967-993.
24. Bonciu E. Aspects of the pollen grains diameter variability and the pollen viability to some sunflower genotypes. In: J. of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 2013, vol. 17(1), p. 161-165.
25. Boonstra J. Progression through the G (1)-phase of the ongoing cell cycle. In: J. Cell. Biochem., 2003, vol. 90, p. 244-252.
26. Borde V., Robine N., Lin W., et al. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. In: EMBO J., 2009, vol. 28, p. 99-111.

27. Bouchard R.A., Characterization of expressed meiotic prophase repeat transcript clones of *Lilium*: meiosis-specific expression, relatedness, and affinities to small heat shock protein genes. In: *Genome*, 1990, vol. 33, p. 68-79.
28. 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.
29. Breitel D.A., Chappell-Maor L., Meir S. AUXIN RESPONSE FACTOR 2 Intersects Hormonal Signals in the Regulation of Tomato Fruit Ripening. In: *PLOS Genetics*, 2016, vol. 12, p. 5-10.
30. Brown G. Unique aspects of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in *Brassica napus*. In: *J. Hered.*, 1999, vol. 90, p. 351-356.
31. Buard J., Barthe`s P., Grey C. Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. In: *EMBO J.*, 2009, vol. 28, p. 2616-2624.
32. Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., et al., Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. In: *Plant J.*, 2005, vol. 42, p. 567-585.
33. Bugreev D.V., Pezza R.J., Mazina O.M., et al. The resistance of DMC1 D-loops to dissociation may account for the DMC1 requirement in meiosis. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, vol. 1, p. 56-60.
34. Cai X., Dong F., Edelman R.E., Makaroff, C.A. The *Arabidopsis* SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. In: *J. Cell Sci.*, 2003, vol.116, p. 2999-3007.
35. Canales C., Bhatt A.M., Scott R. EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. In: *Curr. Biol.*, 2002, vol. 12, p. 1718-1727.
36. Cao M., Cheng J., Wang J., et al. Relationship between phytohormones and genic male sterility induced by space flight in maize. In: *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, vol. 24, p. 447-452.
37. Caryl A.P., Jones G.H., Franklin F.C. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. In: *J. Exp. Bot.*, 2003, vol. 54, p. 25-38.
38. Çetinbaş A., Ünal M. Anther Ontogeny and Microsporogenesis in *Helianthus annuus* L. (*Compositae*). In: *Not. Sci. Biol.*, 2015, vol. 7(1), p. 52-56.
39. Chai C. *Ff1b* is required for the development of steroidogenic component of the zebrafish interrenal organ. In: *Developmental Biology*, 2003, vol. 260(1), p. 226-244.

40. Chang L., Ma H., Xue H.W. Functional conservation of the meiotic genes *SDS* and *RCK* in male meiosis in the monocot rice. In: *Cell Res.*, 2009, vol. 6, p. 768-782.
41. Charlesworth D. Origins of rice cytoplasmic male sterility genes. In: *Cell Res.*, 2017, vol. 27, nr. 1, p. 3-4.
42. Chase C. Expression of CMS unique and flanking mitochondrial DNA sequences in *Phaseolus vulgaris* L. In: *Genet.*, 1994, vol. 25, p. 245-251.
43. Chen C., Marcus A., Li W., et al. The *Arabidopsis* *ATK1* gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis. In: *Development*, 2002, vol. 129(10), p. 2401-2409.
44. Chen F., K.J. Bradford. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. In: *Plant Physiol. Biochem.*, 2000, vol. 124, p. 1265-1274.
45. Chen L., Liu Y.G. Male sterility and fertility restoration in crops. In: *Ann. Rev. Plant Biol.*, 2014, vol. 65, p. 579-606.
46. Cheng H., Qin L., Lee S., et al. Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. In: *Development*, 2004, vol. 131, p.1055-1064.
47. Chepurnaya A., Tikhomirov V., Sherstyuk S. Cms-Rf System for Sunflower Breeding. In: *Helia*, 2003, vol. 26, nr. 38, p. 59-66.
48. Cho H.T., Cosgrove D.J. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2002, vol.14, p. 3237-3253.
49. Cnudde F., Gerats T. Meiosis: inducing variation by reduction. In: *Plant Biol.*, 2005, vol. 7, p. 321-341.
50. Cocucci A. E. La embriologia e los sistemas reproductivos de Angiospermae. In: *Os Avanços da Botânica no início do século XXI.*, 2006, p. 97-102.
51. Consiglio F., Conicella C., Monti L. Highlights of meiotic genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *African Journal of Biotechnology*, 2003, vol. 2 (12), p. 516-520.
52. D'Agostino I.B., Deruere J., Kieber J.J. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. In: *Plant Physiol.*, 2000, vol. 124, p. 1706-1717.
53. Da Ines O., Degroote F., Goubely C. Meiotic recombination in *Arabidopsis* is catalysed by *DMC1*, with *RAD51* playing a supporting role. In: *PLOS Genetics*, 2013, vol. 9, p. 1-11.
54. Dabing Z., Xue L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. In: *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, vol. 38, p. 379-390.
55. Dafni A., Firmage D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. In: *Plant Systematics and Evolution*, 2000, vol. 222, p. 113-132.
56. 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.

57. Davière J.M., Achard P. Gibberellin signaling in plants. In: *Development*, 2013, vol. 140(6), p. 1147-1151.
58. de March M., Merino N., Barrera-Vilarmau S., et al. Structural basis of human *PCNA* sliding on DNA. In: *Nature Communications*, 2017, p. 1-7.
59. Destro D., Arias E.R.A., Miglioranza E. Development stages suitable for the application of male sterility inducing phytohormones in sunflower. In: *Pestquisa Agro. Brasileira*, 1993, vol. 28(5), p. 593-596.
60. Dewitte W., Riou-Khamlichi C., Scofield S. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin *Cycd3*. In: *Plant Cell*, 2003, vol. 15, p. 79-92.
61. Dezfulian M.H., Soulliere D.M., Dhaliwal R.K. The *SKP1*-like gene family of *Arabidopsis* exhibits a high degree of differential gene expression and gene product interaction during development. In: *PLoS One.*, 2012, vol. 7, p. 1-13.
62. Dionne I., Nookala R.K., Jackson S.P. A heterotrimeric *PCNA* in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. In: *Molecular Cell*, 2003, vol. 11, p. 275-282.
63. Drew M.C., He C.J., Morgan P.W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. In: *Trends Plant Sci.*, 2000, vol. 5, p. 123-127.
64. 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.
65. 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.
66. 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, Agricultura modernă - realizări și perspective. Lucrări științifice*, 2013, vol. 39, p. 59 - 63.
67. Eenick A. H., Vereijken A.L.J. Anatomical changes in flower of lettuce (*Latuca sativa* L.) treated with GA₃ [giberellic acid] solution for induction male sterility. In: *Acta Botanica Neerlandica*, 1987a, vol. 27, p. 199 - 204.
68. Eenick, A. H., Vereijken A.L.J. Induction of male sterility in lettuce (*Latuca sativa* L.) with GA₃: influence of temperature and GA₃ concentration. In: *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 1987b, vol. 26, p. 45 - 50.

69. Ekholm S.V., Reed S.I. Regulation of G (1) cyclin dependent kinases in the mammalian cell cycle. In: Curr. Opin. Cell Biol., 2000, vol. 12, p. 676-684.
70. Enns L.C., Kanaoka M.M., Torii K.U. Two callose synthases, *GSL1* and *GSL5*, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. In: Plant Mol. Biol., 2005, vol. 58, p. 333-349.
71. Erickson A.N., Markhart A.H. Flower developmental stage and organ sensitivity of bellpepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. In: Plant Cell Environ., 2002, vol. 25, p. 123-130.
72. Fairbanks M. M., Hardy G. E., McComb J. A. Mitosis and meiosis in plants are affected by the fungicide phosphate. In: Aust. Plant Pathol., 2002, vol. 31, p. 281-289.
73. Fan Y., Nikitina T., Morin-Kensicki E.M. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. In: Mol. Cell. Biol., 2003, vol. 23, p. 4559-4572.
74. Fan Y., Nikitina T., Zhao J., et al. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. In: Cell, 2005, vol. 123, p. 1199-212.
75. Fei H., R. Zhang, R.P. Pharis, V.K. Pleiotropic effects of the male sterile33 (*ms33*) mutation in *Arabidopsis* are associated with modifications in endogenous gibberellins, indole- 3-acetic acid and abscisic acid. In: Planta, 2004, vol. 219, p. 649-660.
76. Feldmann K.A., Coury D.A., Christianson M.L. Exceptional segregation of a selectable marker (KanR) in *Arabidopsis* identifies genes important for gametophytic growth and development. In: Genetics, 1997, vol. 147, p. 1411-1422.
77. Fernandez-Capetillo O., Allis C. D., Nussenzweig A. Phosphorylation of histone *H2B* at DNA double-strand breaks. In: J. Exp. Med., 2004, vol. 199, p.1671-1677.
78. Fitter J.T., Thomas M.R., Niu C. Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* hybrids with carpelloid stamens. In: Plant Physiol., 2005, vol. 162, p. 225-235.
79. Francis D. A commentary on the G2/M transition of the plant cell cycle. In: Annals of Botany, 2011, vol. 107, p. 1065– 1070.
80. Fuzinatto V.A., Pagliarini M.S. Valle C. B. Evaluation of microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria hybrid* (*Poaceae*) collected in distinct years. In: Genet. Mol. Res., 2008, vol. 7, p. 424-432.
81. Gaborieau L., Brown G.G. Comparative genomic analysis of the compound *Brassica napus* *Rf* locus. In: BMC Genomics, 2016, vol. 17, p. 1-15.
82. 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.

83. Garcia T.L., Dominguez J., Fernandez J. Male sterility and female steility induced in sunflower with GA₃. In: Anales del Institute Nacional de investigeones Agraries Prod. Vegel., 1979, vol. 9, p. 147-169.
84. Georgieva-Todorova Y. Meiosis in *Helianthus rigidus* Desf. C. R. In: Seances Acad. Agric. Bulgaria, 1971, vol. 4, p. 407-411.
85. Ghadirnezhad R., Fallah A. Temperature Effect on Yield and Yield Components of Different Rice Cultivars in Flowering Stage. In: International Journal of Agronomy, 2014, p.1-4.
86. Golubovskaya I., Grebennikova Z.K., Avalkina N.A. The role of the *ameiotic1* gene in the initiation of meiosis and in subsequent meiotic events in maize. In: Genetics, 1993, vol. 135, p. 1151-1166.
87. Gómez J.F, Talle B., Wilson Z.A. Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. In: J. Integr. Plant Biol., 2015, vol. 57, p. 876-891.
88. Gorelik M., Orlicky S., Sartori M.A., et al. Inhibition of *SCF* ubiquitin ligases by engineered ubiquitin variants that target the Cull1 binding site on the Skp1-F-box interface. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2016, vol. 113, p. 3527-3532.
89. Gray WM. Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. In: PLoS Biology, 2004, vol. 2(9), p. 311.
90. Griffiths S., Sharp R., Foote T.N, et al: Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. In: Nature, 2006, vol. 439, p. 749-752.
91. Grishaeva T.M., Dadashev S.Y., Bogdanov Y.F. Meiotic *Rec8* Cohesins and Their Mitotic *Rad21* Orthologs: Comparison in Silico. In: Molecular Biology, 2007, vol. 41, p. 674–676.
92. Gupta R., Chakrabarty S.K. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. In: Plant Signal Behav., 2013, vol. 8, p. 1-5.
93. Hamant O., Ma H., Cande W.Z. Genetics of meiotic prophase I in plants. In: Annual Review of Plant Biology, 2006, vol. 57, p. 267-302.
94. Hanson M.R., Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophite development. In: The Plant Cell, 2004, vol. 16, p. 154-169.
95. Harrison C., Alvey E., Henderson I. Meiosis in flowering plants and other green organisms. In: Journal of Experimental Botany, 2010, vol. 61(11), p. 2863-2875.
96. Hashimoto H., Vertino P.M., Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. In: Epigenomics, 2010, vol. 2(5), p. 657-69.
97. Hayakawa R., Hayakawa T., Takeda K. Therapeutic targets in the *ASK1*-dependent stress signaling pathways. In: Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences, vol. 88(8), 2012, p. 434-453.

98. He Y., Fukushige H., Hildebrand D.F. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. In: *Plant Physiol.*, 2002, vol. 128, p. 876-884.
99. 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.
100. Hedgcoth C. et al. A chimeric open reading frame associated with CMS in alopasmic wheat with *Triticum timopheevi* mitochondria is present in several *Triticum* and *Aegilops* species, barley, and rye. In: *Curr. Genet.*, 2002, vol. 41, p. 357-365.
101. Herna'ndez A., Ortiz R., Ubaldo E., et al. Synaptonemal complex stability depends on repressive histone marks of the lateral element associated repeat sequences. In: *Chromosoma* 2010, vol. 119, p. 41-58.
102. Hirose Y., Suzuki R., Ohba T. Chiasmata promote monopolar attachment of sister chromatids and their co-segregation toward the proper pole during meiosis I. In: *PLoS Genetics*, 2011, vol. 7, p. 8-13.
103. Holmes R.J., Cohen P.E. Small RNAs and RNAi pathways in meiotic prophase I. In: *Chrom. Res.*, vol.15, 2007, p. 653-665.
104. Hong Z., Delauney A.J., Verma D.P.S. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. In: *Plant Cell*, 2001, vol. 13, p. 755-768.
105. Horlow C., Defrance M.C., Pollien I.M. Transfer of cytoplasmic male sterility by spontaneous androgenesis in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). In: *Euphytica*, vol. 66, vol. 1(2), 1992, p. 45 - 53.
106. Horn R. Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasm in the genus *Helianthus*. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, vol. 104, p. 562-570.
107. 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.
108. Hu B., Xie J., Wan Y., et al. Mapping QTLs for fertility restoration of different cytoplasmic male sterility types in rice using two *Oryza sativa*×*Oryza rufipogon* backcross inbred line populations. In: *BioMed Research International*, 2016, p. 8.
109. Huang S., Cerny R.E., Bhat Y.Q. D., et al. Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. In: *Plant Physiol.*, 2003, vol. 131, p. 1270-1282.
110. Hwang, S., Oh B., Knowles B., et al. Expression of genes involved in mammalian meiosis during the transition from egg to embryo. In: *Mol. Reprod. Dev.*, 2001, vol. 59, p.144-158.
111. Hydbring P., Malumbres M., Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2016, vol. 17, p. 280-292.

112. Ibrahim A.M., Kayat F.B, et al. Determination of Suitable Microspore Stage and Callus Induction from Anthers of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). In: The Scientific World Journal. 2014, p. 1-5.
113. Imamura K., Fukunaga K., Kawarabayasi Y. Specific interactions of three proliferating cell nuclear antigens with replication-related proteins in *Aeropyrum pernix*. In: Molecular Microbiology, 2007, vol. 64, p. 308-318.
114. Ishiguro S., Kawai - Oda A., Ueda J., et al. The *DEFECTIVE IN ANTHER DHISCIENCE* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. In: Plant Cell, 2001, vol. 13, p. 2191-2209.
115. Ito T., Shinozaki K. The *MALE STERILITY1* gene of *Arabidopsis*, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation. In: Plant Cell Physiol, 2002, vol. 43, p. 1285-1292.
116. Ivers D. R., Palmer R. G., Fehr W. R. Anther culture in soybean. In: Crop. Sci., 1974, vol. 14, p. 891-893.
117. Jacobsen S.E., Olszewski N.E. Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellins deficiency of the *gib - 1* mutant of tomato. In: Plant Physiology, 1991, vol. 97, p. 409 - 414
118. Jeong H.J., Kang J.H., Zhao M. et al. Tomato Male sterile 1035 is essential for pollen development and meiosis in anthers. In: J. Exp. Bot., 2014, vol. 65, p. 6693-709.
119. Ji Y.F. Stelly D. M., de Donato M., et al. A candidate recombination modifier gene for *Zea mays* L. In: Genetics, 1999, vol. 151, p. 821-830.
120. Jiang J., Zhang Z. Cao J. Pollen wall development: the associated enzymes and metabolic pathways. In: Plant Biology, 2013, vol. 15, p. 249-263.
121. Jin Y., Yang H., Wei Z. Rice male development under drought stress: phenotypic changes and stage-dependent transcriptomic reprogramming. In: Mol. Plant., 2013, vol. 6, p. 1630-45.
122. Jorge E., Mariath A. Embryology of Flowering Plants Applied to Cytogenetic Studies on Meiosis. In: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity", 2012, p. 392-394.
123. Julião S. Carvalho C. R., Ribeiro T.C., et al. Multiploidy occurrence in tomato calli from anther culture. In: African Journal of Biotechnology, vol. 14(40), 2015, p. 2846-2855
124. Kaneko M., Inukai Y., Ueguchi-Tanaka M., et al. Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair alpha-amylase expression in aleurone and flower development. In: Plant Cell, 2004, vol. 16, p. 33-44.

125. Kantara M.B., Betts K., Michno J.M. Evaluating an interspecific *Helianthus annuus* × *Helianthus tuberosus* population for use in a perennial sunflower breeding program. In: Field Crops Research, 2014, vol. 155, p. 254-264.
126. Kasemle J.N.R. Phenotypic restoration of fertility in a male sterile mutant by treatment with gibberellic acid. In: Nature, vol. 215, p. 668.
127. Katalin J., Attila F., Beáta B. Effect of water deficit and elevated temperature on pollen development of drought sensitive and tolerant winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. In: Acta Biologica Szegediensis, 2008, vol. 52, p. 67-71.
128. Kaur J., Sebastian J., Siddiqi I. The *Arabidopsis-mei2*-like genes play a role in meiosis and vegetative growth in *Arabidopsis*. In: Plant Cell, 2006, vol. 18, p. 545-559.
129. Kawamura K., Murray J.A., Shinmyo A. Cell cycle regulated D3-type cyclins form active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase in vitro. In: Plant Mol. Biol., 2006, vol. 61(1-2), p. 311-327.
130. Keeney S. *Spo11* and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. In: Genome Dyn. Stab., 2008, vol. 2, p. 81-123.
131. Kelliher T., Egger R.L., Zhang H. Unresolved issues in pre-meiotic anther development. In: Front Plant Science, 2014, vol. 5, p. 1-6.
132. Kempken F. Engineered Male Sterility. In: Genetic Modification of Plants, 2010, p. 253-265.
133. Kerzendorfer C., Vignard J., Pedrosa-Harand A., et al. The *Arabidopsis thaliana MND1* homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination. In: J. Cell Sci., 119, 2006, p. 2486-2496.
134. Khulbe R.K., Roy N., Yadav V.K. Induction of male sterility in wild and related species of sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: Crop Sci., 2003, vol. 131, p. 29-32.
135. Kim S., Kim C.W., Park M. Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. In: Theor. Appl. Genet., 2015, vol 11, p. 2289-2299.
136. Kimura H. Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. In: DNA Repair, 2005, vol. 4, p. 939-950.
137. Kimura S., Suzuki T., Yanagawa Y., et al. Characterization of plant proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) and flap endonuclease-1 (*FEN-1*), and their distribution in mitotic and meiotic cell cycles. In: The Plant Journal, 2001, vol. 28, p. 643-653.
138. Kitazaki K., Arakawa T., Matsunaga M., et al. Post-translational mechanisms are associated with fertility restoration of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris*). In: Plant J., 2015, vol. 83, p. 290-299.

139. Koga D., Kusumi S., Shodo R., et al. High-resolution imaging by scanning electron microscopy of semithin sections in correlation with light microscopy. In: *Microscopy (Oxf)*, 2015, vol. 64, p. 387-94.
140. Kohler R.H. et al. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. In: *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 227(3), p. 369-376.
141. Kondhare K.R., Hedden P., Kettlewell P.S. Quantifying the impact of exogenous abscisic acid and gibberellins on pre-maturity α -amylase formation in developing wheat grains. In: *Sci Rep.*, 2014, vol. 4, p. 1-6.
142. Koornneef M., Meinke D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. In: *Plant J.*, 2010, vol. 61, p. 909-921.
143. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. In: *Cell*, 2007, vol. 128, p. 693-705.
144. Kravets E.A. Cytomixis and its role in the regulation of plant fertility. In: *Ontogenez.*, 2013, vol. 44(3), p. 147-165.
145. Křížová K., Depicker A., Kovařík A. Epigenetic switches of tobacco transgenes associate with transient redistribution of histone marks in callus culture. In: *Epigenetics*, 2013, vol. 8, p. 666-676.
146. Kumar G., Dwivedi K. Induced polyploidization in *Brassica campestris* L. (*Brassicaceae*). In: *Cytology and Genetics*, 2014, vol. 48, p. 103-110.
147. Kwon C.T., Paek N.C. Gibberellic Acid: A Key Phytohormone for Spikelet Fertility in Rice Grain Production. In: *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 23, p. 1-9.
148. 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.
149. Leclercq P. Une stérilité mâle chez le tournesol. *Ann. Amélior Plantes*, 1969, p. 99-106.
150. Li Y., Jones L., McQueen-Mason S.J. Expansins and cell growth. In: *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003, vol. 6, p. 603-610.
151. Liu J., Peng H., Cui J. Molecular Characterization of A Novel Effector Expansin-like Protein from *Heterodera avenae* that Induces Cell Death in *Nicotiana benthamiana*. In: *Scientific Reports*, 2016, p. 1-9.
152. Liu Y.C., Liu Y.W. Gene expression of proliferating cell nuclear antigen in rat brain. In: *Biochem. Int.*, vol. 28, 1992, p. 129-36.

153. Livak K.J., Schmittgen T.D. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. In: *Methods*, 2001, vol. 25, p. 402-408.
154. Ma H. Molecular Genetic Analyses of Microsporogenesis and Microgametogenesis in Flowering Plants. In: *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2005, vol. 56, p. 393-434.
155. Ma J., Li Z., Wang B., et al. Cloning of an Expansin Gene from *Chimonanthus praecox* Flowers and Its Expression in Flowers Treated with Ethephon or 1-Methylcyclopropene. In: *Hortscience*, 2012, vol. 47(10), p. 1472-1477.
156. Ma L.J. Yang Z.N., Zhang S. DEX1, a plasma membrane-localized protein, functions in microspore development by affecting *Cals5* expression in *Arabidopsis thaliana*. In: *Chinese Science Bulletin*, 2013, vol. 58, p. 2855-2861.
157. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. In: *Genome Biol.*, 2014, vol. 15(6), p. 122.
158. 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.
159. Marowa P., Ding A., Kong Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. In: *Plant Cell Rep.*, 2016, vol. 35, p. 949-965.
160. Mata J., Lyne R., Burns G., Bahler J. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. In: *Nat. Genet.*, 2002, vol. 32, p.143-147.
161. McCormick S. Control of male gametophyte development. In: *Plant Cell*, 2004, vol. 16 Suppl., p. 142-153.
162. Mendes-Bonato A.B., Pagliarini M.S., Forli F., et al. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (*Gramineae*). In: *Euphytica*, 2002, vol. 125, p. 419-425.
163. Mendes-Vieira D. Abnormal meiotic behavior in *Brachiaria brizantha* (*Poaceae*) leading to microspore degeneration. In: *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 2005, vol. 58(4), p. 396-402.
164. Menges M., Samland A.K., Planchais S. The D-type cyclin *CYCD3;1* is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell*, 2006, vol. 18(4), p. 893-906.
165. Mercier R., Armstrong S.J., Horlow C., The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. In: *Development*, 2003, vol. 130, p. 3309-3318.
166. 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.

167. Meric C., Dane F., Olgun G. Histological aspects of anther wall in male fertile and cytoplasmic male sterile sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: *Helia*, 2003, vol. 26, nr. 39, p. 7-18.
168. Mikami T., Yamamoto P., Matsuhira M., H., et al. Molecular basis of cytoplasmic male sterility in beets: An overview. In: *Plant Genetic Resources*, 2011, vol. 9(2), p. 284-287.
169. Millar A.A., Gubler F. The *Arabidopsis* *GAMYB*-like genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. In: *Plant Cell*, 2005, vol. 17, p. 705-721.
170. 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.
171. Moran J. L., Rooney W.L. Effect of Cytoplasm on the Agronomic Performance of Grain Sorghum Hybrids. In: *Crop Sci.*, 2003, vol. 43, p. 777-781.
172. Motamayor J.C., Vezon D., Bajon C., et al. *Switch (swi1)*, an *Arabidopsis thaliana* mutant affected in the female meiotic switch. *Sex*. In: *Plant Reprod.*, 2000, vol. 12, p. 209-218.
173. Murphy S.P., Bass H.W. The maize (*Zea mays*) desynaptic (*dy*) mutation defines a pathway for meiotic chromosome segregation, linking nuclear morphology, telomere distribution and synapsis. In: *Cell Science J.*, 2012, vol. 125, p. 3681-3690.
174. Nagaki K., Murata M. Characterization of *CENH3* and centromere—associated DNA sequences in sugarcane. In: *Chromosome Res.*, 2005, vol. 13, p. 195-203.
175. **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.
176. **Nechifor V.** Controlul genetic al meiozei la plante. In: *Studia Universitas, Seria Științe reale și ale naturii*, 2013, 6(66), p.72-79.
177. Nedukha O. M. Callose: Localization, functions, and synthesis in plant cells. In: *Cytology and Genetics*, 2015, vol. 49, p. 49–57.
178. Nonomura K.I., Morohoshi A., Nakano M., et al: A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. In: *Plant Cell*, 2007, vol. 19, p. 2583- 2594.
179. Notsu Y., Masood S., Nishikawa T., et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: Frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. In: *Mol. Genet. Genomics*, 2002, vol. 268, p. 434-445.
180. Oh S.A., Park S.K., Jang I., et al. An *Arabidopsis* male gametophytic mutant associated with a 150 kb chromosomal deletion adjacent to an introduced Ds transposable element. In: *Sex Plant Reproduction*, 2003, vol. 16, p. 99-102.

181. Oliver C., Pradillo M., Corredor E. The dynamics of histone H3 modifications is species-specific in plant meiosis. In: *Planta*, 2013, vol. 238, p. 23-33.
182. Omae H., Kumar A., Shono M. Adaptation to High Temperature and Water Deficit in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the Reproductive Period. In: *Journal of Botany*, 2012, p. 1-6.
183. Page S.L., Hawley R.S. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. In: *Annual Review Cell Dev. Biol.*, 2004, vol. 20, p. 525-558.
184. Pagliarini M.S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. In: *Genet. Mol. Biol.*, 2000, vol. 23, p. 997-1002.
185. Pannell J.R. Plant Sex Determination. In: *Curr. Biol.*, 2017, vol. 27, p. 191-197.
186. Panoli A.P., Ravi M., Sebastian J., et al. *AtMND1* is required for homologous pairing during meiosis in *Arabidopsis*. In: *BMC Mol. Biol.*, 2006, vol. 27, p. 7-24.
187. 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.
188. Paun, L. The cytologic mechanism of male sterility in sunflower. In: *Proc. of the 6th Inter. Sunfl. Conf.*, Bucharest, Romania, 1974, p. 249-257.
189. Pavlova O.A., Matveyeva T.V., Lutova L.A. *rol*-Genes of *Agrobacterium rhizogenes*. In: *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 2014, vol. 4, p. 137–145.
190. Pawlowski W.P., Cande W.Z. Coordinating the events of the meiotic prophase. In: *Trends Cell Biol.*, 2005, vol. 15, p. 674-681.
191. Pawlowski W.P., Golubovskaya I.N., Timofejeva L., et al. Coordination of meiotic recombination, pairing and synapsis by *PHS1*. In: *Science*, 2004, vol. 303, p. 89-92.
192. Pawlowski W.P., Wang C.J., Golubovskaya I.N., et al. Maize *AMEIOTIC1* is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2009, vol. 106, p. 3603-3608.
193. Perrella G., Consiglio M.F., Aiese-Cigliano R., et al. Histone hyperacetylation affects meiotic recombination and chromosome segregation in *Arabidopsis*. In: *Plant J.*, 2010, vol. 62, p. 796-806.
194. Petcu E. Efectul temperaturilor scăzute asupra plantelor de grâu de toamnă aflate în stadiul de meioză. In: *AN. I.N.C.D.A. Fundulea*, 2009, vol. LXXVII, p. 245 - 250.
195. Qiao H. Meiotic recombination and synapsis in wild-type and asynaptic mutants of tomato (*Solanum Lycopersicum*): Dissertation. In: *Colorado State University Department of Biology Fort Collins, Colorado*, 2010, p. 50 - 55.

196. Quinet M., Bataille G., Dobrev P., et al. Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by *STAMENLESS*, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) orthologue to the B-class APETALA3 gene. In: J. Exp. Bot., 2014, vol, 65, p. 2243-2256.
197. Reddy V.S., Ramesh S. Genetic and Cytoplasmic-Nuclear Male Sterility in Sorghum. In: Plant Breeding Reviews, 2010, vol. 25, p.10-15.
198. 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.
199. Rhee Y., Ran K. Wang H., et al. Expression analysis of D-type cyclin in potato (*Solanum tuberosum* L.) under different culture conditions. In: Acta Physiol. Plant, 2016, p. 38-36.
200. Rubinstein B. Regulation of cell death in flower petals. In: Plant Mol. Biol., 2000, vol. 44, p. 303-318.
201. Šamanić I., Cvitanić R., Simunić J. *Arabidopsis thaliana* *MRE11* is essential for activation of cell cycle arrest, transcriptional regulation and DNA repair upon the induction of double-stranded DNA breaks. In: Plant Biol., 2016, vol. 18, p. 681-94.
202. Sanchez-Moran E., Santos J. *ASY1* mediates *AtDMC1*-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. In: Genes Dev. vol. 21(17), 2007, p. 2220–2233.
203. Sanchez-Moran E., Santos J.L., Jones G.H. *ASY1* mediates *AtDMC1*-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. In: Genes & Development, 2007, vol. 21(17), p. 2220-2233.
204. Sanders P.M., Lee P.Y., Biesgen C., et al. The *Arabidopsis* *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. In: Plant Cell, vol. 12, 2000, p. 1041-1061.
205. 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.
206. Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses. In: Annu. Rev. Plant Biol., vol. 61, 2010, p. 263-289
207. Schneiter A.A., J.F. Miller. Description of Sunflower Growth Stages. In: Crop Sci., vol. 21, 1981, p. 901-903.
208. Schommer C., Beven, A., Lawrenson, et al. *AHP2* is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. In: Plant Journal, 2003, vol. 36, p.1-11.

209. Schultz N., Hamra F.K., Garbers D.L. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, vol. 100, p.12201-12206.
210. Schwarz-Sommer Z., Gübitz T., Weiss J., et al. A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*. In: BMC Plant Biol., 2010, vol. 10, p. 2-9.
211. Shimizu S., Mori H. Analysis of cycles of dormancy and growth in pea axillary buds based on mRNA accumulation patterns of cell cycle-related genes. In: Plant and Cell Physiology, 1998, vol. 39, p. 255-262.
212. Shivanna K.R. Pollen biology and biotechnology. In: Science Publishers Inc., Enfield, 2003, p. 300-305.
213. Simon A.C., et al. Structure of human *Cdc45* and implications for CMG helicase function. In: Nat. Comms., Published online, 2016, p. 1-15.
214. Singh P., Singh D., Kumar D. Impact of Naphthalene Acetic Acid and Gibberellic Acid on Growth and Yield of *Capsicum*, *Capsicum annum* (L.) cv. Indra under Shade Net Conditions. In: International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, vol. 6, 2017, p. 2457-2462
215. Singhal V.K., Kumar P. Impact of cytomixis on the meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of *Himalayan poppy* (*Meconopsis aculeata* Royle). In: J. Biosci., 2008a, vol. 33, p. 371-380.
216. 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.
217. Spirova M. New data on male sterility in sunflower induced by gibberellic acid. In: Resteniev dni Nanki, 1975, vol. 12(1), p.10-17.
218. Stephen K. Historical development and cytological investigations of *Gentiana* L. and *Impatiens glandulifera*. In: Planta, 1958, vol. 50, p. 423-60.
219. Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications. In: Nature, 2000, vol. 403, p. 41-45.
220. Stronghill P., Pathan N., Ha H. *Ahp2* (*Hop2*) function in *Arabidopsis thaliana* (Ler) is required for stabilization of close alignment and synaptonemal complex formation except for the two short arms that contain nucleolus organizer regions. In: Chromosoma, 2010, vol. 119(4), p. 443-458.
221. Strzalka W., Kaczmarek A., Naganowska B. Identification and functional analysis of *PCNA1* and *PCNA-like1* genes of *Phaseolus coccineus*. In: Journal of Experimental Botany, 2010, vol. 61, p. 873-888.

222. Sunderland N., Collins G. B., Dunwell J. M. Nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. In: *Planta*, 1974, vol. 117, p. 227-241.
223. 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.
224. Szała L., Sosnowska K., Popławska W. Development of new restorer lines for CMS ogura system with the use of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.). In: *Breed Sci.*, 2016, vol. 66, p. 516-521.
225. Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J. The double-strand-break repair model for recombination. In: *Cell*, 1983, vol. 33, p.25-35.
226. 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.
227. Tanaka H., Ishikawa M., Kitamura S., et al. The *AtNACK1/HINKEL* and *STUD/TETRASPORE/AtNACK2* genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. In: *Genes Cells*, 2004, vol. 9, p. 1199-1211.
228. Tang J.H., He Z.Y., Tan S.Y. Relationship between fertility conversion and endogenous hormones in a maize thermo-sensitive genic male-sterile line. In: *Acta Agron. Sinica*, 2003, vol. 29, p. 336-338.
229. Tchorzewska D. Chondriokinesis during microsporogenesis in plants. In: *Planta*, 2017, vol. 246(1), p. 1-18.
230. 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.
231. Timme R., Simpson B., Linder R. High-resolution phylogeny for *Helianthus* (*Asteraceae*) using the 18s-26s ribosomal DNA external transcribed spacer. In: *American Journal of Botany* 2007, vol. 94, nr. 11, p. 1837-1852.
232. Tiwari D.K., Pandey P., Giri S.P. Effect of GA₃ and Other Plant Growth Regulators on Hybrid Rice Seed Production. In: *Asian Journal of Plant Sciences*, 2011, vol. 10, p. 133-139.
233. Toderaş L. Influenţa factorilor ecologici asupra sistemului reproductiv la plante. In: *Autoreferat*, 2002, p. 18-20.
234. Tsubouchi A., Sakakura J., Yagi R., et al. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. In: *The Journal of Cell Biology*, 2002, vol. 159(4), p.673-683.
235. Tucker E.J., Baumann U., Kouidri A. Molecular identification of the wheat male fertility gene *Ms1* and its prospects for hybrid breeding. In: *Nat. Commun*, 2017, vol. 8, p. 869.

236. 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.
237. Turner B. M. Cellular memory and the histone code. In: *Cell*, 2002, vol. 111, p. 285-291.
238. Twell D. The diversity and regulation of gene expression in the pathway of male gametophyte development. In: R. Scott & A. Stead (Eds.), *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction (Society for Experimental Biology Seminar Series)*, 1994, p. 83-136.
239. van den Heuvel K.J., van Lipzig R.H., Barendse G.W. Regulation of expression of two novel flower-specific genes from tomato (*Solanum lycopersicum*) by gibberellin. In: *Journal of Experimental Botany*, 2002, vol. 53(366), p. 51-59.
240. van der Graaff E., Schwacke R., Schneider M. et al. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. In: *Plant Physiol.*, 2006, vol. 141, p. 776-792.
241. Vasil I.K. Cultivation of excised anthers in vitro-effect of nucleic acids. In: *J. exp. Bot.* 1959, vol. 10, p. 86-88.
242. Vasil I.K. Effect of kinetin and gibberellic acid on excised anthers of *Allium cepa*. In: *Phytomorphology*, 1957, vol. 7, p.138-49.
243. Vasil I.K. Physiology and cytology of anther development. In: *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 1967, vol. 42, nr. 3, p. 327-373.
244. Viccini L. F., Carvalho C.R. Meiotic chromosomal variation resulting from irradiation of pollen in maize. In: *J. Appl. Genet.*, 2002, vol. 47, p. 463-469.
245. Vignard J., Siwiec T., Chelysheva L., et al. The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in *Arabidopsis thaliana*. In: *PLoS Genet.*, 2007, vol. 3 p. 1894-1906.
246. Vittalaya K.A. Histological and histochemical studies in cytoplasmic gibberellic acid induced male sterile genes of sunflower. In: *M.Sc.(Agri.) Thesis, Univ. Agri. Sci., Bangalore.* 1981, p. 41-55.
247. Vonarx E.J., Howlett N.G., Schiestl R.H. Detection of *Arabidopsis thaliana* *AtRAD1* cDNA variants and assessment of function by expression in a yeast *rad1* mutant. In: *Gene*, 2002, vol. 296, p. 1-9.
248. Vrânceanu A.V., Aspecte noi privind cultura florii-soarelui. In: *Edit. Agro-Silvică*, 1967a, p. 30-45.

249. Wally O.S.D., Critchley A.T., Hiltz D. et al. Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in *Arabidopsis* Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*. In: J. Plant Growth Regul., 2013, p. 320-324.
250. Wang J, Niu B, Huang J, et al. The PHD Finger Protein MMD1/DUET Ensures the Progression of Male Meiotic Chromosome Condensation and Directly Regulates the Expression of the Condensin Gene *CAP-D3*. In: The Plant Cell, 2016, vol. 28(8), p.1894-1909.
251. Wang M., Hoekstra S., van Bergen S., et al. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. In: Plant Mol. Biol., 1999, p. 489-501.
252. Wang S., Durrant W.E., Song J. *Arabidopsis* BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2010, vol. 52, p. 22716-22721.
253. 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.
254. Wang Y., Yang M. Loss-of-function mutants and overexpression lines of the *Arabidopsis* cyclin *CYCA1;2/Tardy Asynchronous Meiosis* exhibit different defects in prophase-I meiocytes but produce the same meiotic products. In: PLoS One, 2014, vol. 9, p. 2-7.
255. Watts A., Kumar V., Bhat S. Centromeric histone H3 protein: from basic study to plant breeding applications. In: Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2016, vol. 25(4), p. 339-348.
256. Wei F., Zhang X. Male sterility induced by chemical SQ-1, as an effective male specific gametocide in maize (*Zea mays*). In: Maydica, 2012, vol. 57, p. 244-248.
257. Weiss J, Alcantud-Rodriguez R., Toksöz T. Meristem maintenance, auxin, jasmonic and abscisic acid pathways as a mechanism for phenotypic plasticity in *Antirrhinum majus*. In: Scientific Reports, 2016, vol. 6, p. 1-10.
258. Whelan E.D.P. Discontinuities in the callose wall, intermeiocyte connections and cytomixis in angiosperm meiocytes. In: Con. J., 1974, vol. 80, p. 1219- 1224.
259. Wierzbicki A. T., Jerzmanowski A. Suppression of *histone H1* genes in *Arabidopsis* results in heritable developmental defects and stochastic changes in DNA methylation. In: Genetics, 2005, vol. 169, p. 997-1008.
260. Wijnker E., Jong H. Managing meiotic recombination in plant breeding. In: Trends Plant Sci., 2008, vol. 13, p. 640-646.

261. Wijnker, E., van Dun, K., de Snoo, C. B., et al. Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. In: Nat. Genet., 2012, vol. 44, p. 467-470.
262. Wilson Z.A., Morroll S.M., Dawson J., et al. The *Arabidopsis* *MALE STERILITY1* (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. In: Plant J., 2001, vol. 28, p. 27-39.
263. Wilson ZA, Yang C. Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development. In: Reproduction, 2004, vol. 128, p. 483-492
264. Windauer L.B., Slafer G.A., Ravetta D.A. Environmental control of phenological development in two *Lesquerella* species. In: Field Crops Research, 2006, vol. 96, p. 320-327.
265. Witzel I., Koh L.F., Perkins N.D. Regulation of *cyclin D1* gene expression. In: Biochem. Soc. Trans., 2010, vol. 38, nr.1, p. 217-222.
266. Wu Y., Fox T.W., Trimnell M.R., et al. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. In: Plant Biotechnol., 2016, vol. 3, p. 1046-1054.
267. Wu Y., Meeley R.B., Cosgrove D.J. Analysis and expression of the alpha-expansin and beta-expansin gene families in maize. In: Plant Physiol., 2001, vol. 126, p. 222-232.
268. 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.
269. Xiao B., Freedman B.S., Miller K.E. Histone H1 compacts DNA under force and during chromatin assembly. In: Mol. Biol. Cell., 2012, vol. 23, p. 4864-4871.
270. Xie C.T., Wei D.M., Tian H.Q. Advances in cell biological researches on male sterility of higher plants. In: Journal of plant physiology and molecular biology, 2006, vol. 32, p. 17-23.
271. Yamagishi H., Bhat S.R. Cytoplasmic male sterility in *Brassicaceae* crops. In: Breed. Science, 2014, vol. 64, p. 38-47.
272. Yamagishi H., Terachi T. Cytoplasmic Male Sterility and Mitochondrial Genome Variations in Radish. In: The Radish Genome, 2017, p. 93-108.
273. Yamamoto Y., Nishimura M., Hara-Nishimura I. Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. In: Plant Cell Physiol., 2003, vol. 44, p. 1192-1201.
274. Yang C., Vizcay-Barrena G., Conner K., Wilson Z.A. *MALE STERILITY1* is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. In: Plant Cell, 2007, vol. 19, p. 3530-3548.

275. Yang M., Hu Y., Lodhi M., et al. The *Arabidopsis SKP1-LIKE1* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, vol. 96, p. 11416-11421.
276. Yang X., Makaroff C. A., Ma H. The *Arabidopsis MALE MEIOCYTE DEATH1* gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis. In: The Plant Cell, 2003, vol. 15, p. 1281-1295.
277. Yang X., Timofejeva L., Ma H., Makaroff C.A. The *Arabidopsis SKP1* homolog *ASK1* controls meiotic chromosome remodeling and release of chromatin from the nuclear membrane and nucleolus. In: J. Cell Sci., 2006, vol. 119, p. 3754-3763.
278. Yano K., Aya K., Hirano K. Comprehensive gene expression analysis of rice aleurone cells: probing the existence of an alternative gibberellin receptor. In: Plant Physiol., 2015, vol. 167, p. 531-544.
279. Yu S.X, Feng Q.N, Xie H.T. Reactive oxygen species mediate tapetal programmed cell death in tobacco and tomato. In: BMC Plant Biology, 2017, vol. 76, p. 1-12.
280. Zavadskaya I.G., Skazkin F.D. On microsporogenesis in barley as affected by soil moisture deficiency and by application of nitrogen at various stages of development. In: Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1960, vol. 131, p. 692-694.
281. Zemach A., Kim M.Y., Hsieh P.H., et al. The *Arabidopsis* nucleosome remodeler *DDMI* allows DNA methyl-transferases to access H1-containing heterochromatin. In: Cell, 2013, vol. 153, p. 193-205.
282. 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.
283. 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.
284. Zhang J., Xue-Feng Z., et al. Relationship between phytohormones and male sterility in thermo-photo-sensitive genic male sterile (TGMS) wheat. In: Euphytica, 2006, vol. 150, p. 241-248.
285. Zhao D., Yang X., Quan L., et al. *ASK1*, a *SKP1* homolog, is required for nuclear reorganization, presynaptic homolog juxtaposition and the proper distribution of cohesin during meiosis in *Arabidopsis*. In: Plant Molecular Biology, 2006, vol. 62, p. 99-110.

286. Zhao D.Z., Wang G.F., Speal B. The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. In: *Genes Dev.*, 2002, vol. 16, p. 2021-2031.
287. Анащенко А.В. Особенности выращивания подсолнечника при химической кастрации. В: *Селекция и семеноводство*, 1971, № 2, с. 36-38.
288. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. В: *Колос*, 1979, с. 414.
289. 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 Пуцинская школа конференция молодых ученых (Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года)*. Сборник тезисов. с. 476.
290. Зубко М.К., Зубко Е.И., Глеба Ю.Ю. Возникновение новых гомеотических форм ЦМС у гибридов *Nicotiana (Hyoscyamus)* и *Nicotiana (Scopolia)* сконструированных посредством слияния протопластов. В: *Генетика*, 1995, том. 31, N10, с.1404-1412.
291. Михайлова Е. Молекулярно-цитогенетический анализ ключевых событий мейоза у ржи *Secale cereale* L. В: Автореферат дис. на соис. уч. ст. докт. биол. наук Санкт Петербург, 1995.
292. Попов В. Н., Кириченко В. В. Мужская стерильность подсолнечника. Теоретические и прикладные аспекты. В: *Вісник Харківського Національного Аграрного Університету Серія Біологія*, вип. 2 (11), 2007, с. 18-33.
293. <http://www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (10.01.2013)
294. http://compgenomics.ucdavis.edu/compositae_resources.php/ (20.03.2013).
295. <http://www.eu.idtdna.com/analyzer/> (12.01.2013).
296. <http://www.heliagene.org> (08. 02. 2013).
297. <http://www.meteo.md/newsait/vara2011.htm> (vizitat 09.12.2013).
298. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/> (11.01.2013).
299. <https://urgi.versailles.inra.fr/Projects/Achieved-projects/Genoplante> (09.02.2013).

ACT DE IMPLEMENTARE

a rezultatelor tezei de doctor

„Acțiunea giberelinei asupra microsporogenezei la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”

Prin prezenta se confirmă că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul tezei de doctor în biologie cu tema „**Acțiunea giberelinei asupra microsporogenezei la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)**” realizată de dna Nechifor Victoria sunt implementate în curriculumul universitar pentru studii superioare de licență (ciclul I) la disciplina *Biologie moleculară* și *Biologie celulară* la Departamentul Științe Biologice și Geonomice al Facultății Științe ale Naturii, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”.

**Decan Facultatea Științe ale Naturii
dr. în biol.**

Elenciuc Daniela

**Rector USDC
acad., dr. hab. în biol., prof. univ.**

Maria DUCA

nr. _____ din ” _____ ” _____ 2018

ACT DE IMPLEMENTARE

a rezultatelor tezei de doctor

„Acțiunea giberelinei asupra microsporogenezei la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”

Prin prezenta se confirmă că primerii specifici elaborați de Dna Nechifor Victoria în cadrul tezei de doctor, pentru studiul expresiei genelor *CycD3*, *HIS1-3*, *H3.1*, *PCNA*, *MND1*, *AHP2*, *ASK1*, *DYAD*, *GSL12*, *EXPA1* implicate în microsporogeneză la plante sunt utilizați în cadrul Laboratorului Genomică, Centrul de Genetică Funcțională, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir” și sunt recomandați pentru cercetări genetico-moleculare ulterioare.

**Prorector cercetare și managementul calității
dr., conf. univ.**

Tatiana POTÎNG

nr. _____ din ” _____ ” _____ 2018

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Nechifor Victoria

Semnătura

Data 28.06.2018

CURRICULUM VITAE

NECHIFOR Victoria

Date de contact:

str. Sf. Nicolai 82,
Chișinău, Republica Moldova
+373 69049133
nechifor.victoria@gmail.com

Data și locul nașterii: 10.09.1987, Chișinău, Republica Moldova.

Cetățenia: MD.



Studii superioare.

2006-2009 – studii de licență, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea Biologie și Pedologie, specialitatea Biologie. Diploma seria ALII nr.

2009-2011 – studii de masterat, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, specialitatea Biologie, Diploma seria AMC nr.

2011-2014 – studii de doctorat, IGFPP, specialitatea 162.01 – Genetică vegetală.

Stagii:

09.2009 – 05. 2011 – Stagiul de practică în Laboratorul Genetică Medicală, Centrul Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală.

07. 2011 – 01.2012 – Stagiu în Laboratorul Biotehnologiei Vegetale, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

15.07.2013-22.07.2013 – Școala de vară în Genetică Moleculară. Certificat de excelență 5 ECTS în Inginerie genetică/Genetic engineering.

Domeniile de interes științific:

Biologie și genetică moleculară, biologie celulară, bioinformatică etc.

Activitatea profesională:

01.08.2009 – 01.01.2010 – Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Laboratorul Bioinformatică, laborant superior.

01.01.2010 – 01.01.2011- Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Laboratorul Proteomică, laborant superior.

01.01.2011 – 01. 06. 2011 Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Catedra Biologie, Facultatea Științe ale Naturii, inginer de categoria a II-a.

01. 06. 2011 – 31. 10. 2011 Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Laboratorul Genomică, cercetător științific stagiar.

02.09.2013 – 30.06.2014 Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Catedra Biologie, Facultatea Științe ale Naturii, asistent universitar.

01.01.2012 – prezent Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Laboratorul Genomică, cercetător științific.

Participări în proiecte științifice naționale și internaționale.

Proiecte instituționale:

11.817.04.19F Aspecte funcționale și genetico-moleculare ale genomului la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)

15.817.05.03F Rezistența florii-soarelui (*Helianthus annuus* L) la lupoaie (*Orobanche cumana* Wallr.): mecanisme genetico-moleculare și fiziologice.

Proiecte pentru tineri cercetători:

13.819.14.12A „Expresia genelor implicate în răspunsul defensiv al florii-soarelui la mana (*Plasmopara halstedii* F. Berl et de Toni)”

Proiecte internaționale:

Evaluarea unor hibrizi de floarea-soarelui, privind rezistența la stresul hidric și termic, în România și Republica Moldova

Participări la foruri științifice (naționale și internaționale):

2012

16-21 aprilie, 16-ая Международная Пуцинская Школы-Конференция Молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, Россия.

30 iulie - 3 august, Всероссийская молодежная конференция «Актуальные проблемы химии и биологии». Пушино, Россия.

2013

21-26 апреля, 17-ая Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, Россия.

16 - 18 May, "EUROPEAN BIOTECHNOLOGY CONGRESS". Bratislava, Slovakia.

24-25 octombrie, al III-lea Simpozion Național "Biotehnologii avansate – realizări și perspective". Chișinău, Republica Moldova.

10-14 november, International Plant Breeding Congress. Antalya, Turkey.

11 octombrie, Simpozionul Științific Internațional „Agricultura modern – realizări și perspective”, dedicată aniversării a 80 de ani de la fondarea UASM, prezentare orală.

2017

15 – 19 october, International Plant Breeding III Congress, Kyrenia, Cyprus.

Lucrări științifice și științifico-metodice publicate:

11 lucrări științifice (inclusiv 4 publicații de monoautor): 4 articole, 7 comunicări la foruri naționale și internaționale.

Premii, distincții, titluri onorifice etc.

2014 – Bursa de excelență a Guvernului pentru doctoranzi

Cunoașterea limbilor: limba română – limba maternă, limba rusă – foarte bine, limba engleză – bine, limba franceză – mediu.

Cunoașterea calculatorului: Microsoft Office, Adobe Photoshop, Internet browsers, e-mail, etc.