

# ANALIZA FENOTIPULUI CITOHISTOLOGIC AL ANTERELOR LA FLOAREA-SOARELUI CU ASI-AG<sub>3</sub> ÎN CONTEXTUL MITOTIPULUI PET<sub>1</sub> ȘI GENOTIPULUI ALELIC PENTRU GENA *Rf1*

CZU: 633.854.78:575.113

DOI: <https://doi.org/10.52673/18570461.24.1-72.03>Doctor în științe biologice **Angela PORT**E-mail: [portang@yahoo.com](mailto:portang@yahoo.com)ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3994-8918>

Universitatea de Stat din Moldova

## ANALYSIS OF THE CYTOHISTOLOGICAL PHENOTYPE OF ANTHERS IN SUNFLOWER WITH ASI-AG<sub>3</sub> IN THE CONTEXT OF THE PET<sub>1</sub> MYTOTYPE AND THE ALLELIC GENOTYPE FOR THE *Rf1* GENE

**Summary.** Microsporogenesis and male gametogenesis are processes that, although under tight morphogenetic control, can often be affected by deviations of internal or external stimuli causing androsterility. The article examines the cytohistological phenotypes of sunflower anthers with gibberellin induced androsterility in plants with different mitotype and allelic genotype for the *Rf1* gene, in comparison with the cytohistological phenotypes of fertile and sterile anthers (ASC-PET<sub>1</sub>). The treatment with gibberellic acid (AG<sub>3</sub>, 0.01%) was carried out by spraying the inflorescence at the budding stage. Cytological samples and those with semi-thin anther sections were analysed by light microscopy. It was determined that the gametocidal effects induced by AG<sub>3</sub> associated with degenerative and early apoptotic events in tapetum cells were more severe in plants with sterile cytoplasm and nuclear *Rf1* genes compared to those with fertile cytoplasm and no fertility-restoring genes. In plants with ASC, the exogenous gibberellin stimulus does not cause any visible compensatory events of the sterile phenotype, on the contrary, the effects of microsporogenesis inhibition are more temporally advanced, with sporogenous and sporophytic tissue cells showing various lesions in the premeiosis. The general common and differentiation characteristics found at the androsteril phenotypes suggest interactions between *orfH522* and *Rf1* gene expression products of negative feedback type in untreated plants and positive feedback type in AG<sub>3</sub>-treated ones. The research is relevant in the context of elucidating the physiological regulatory processes of the sensitivity of male gametophyte development to various stress conditions, which prospectively makes possible regulatory intervention in plants with different androsterility/androfertility control systems.

**Keywords:** androsterility, sunflower, cytohistological phenotype, fertility, gibberellins.

**Rezumat.** Microsporogeneza și gametogeneza masculină sunt procese care, deși se află sub un control morfogenetic riguros, deseori pot fi afectate de deviații ale stimulilor interni sau externi cauzând androsterilitate. În lucrare sunt analizate fenotipurile citohistologice ale anterelor de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă de giberelină la plante cu diferit mitotip și genotip alelic pentru gena *Rf1*, în aspect comparativ cu fenotipurile citohistologice ale anterelor fertile și sterile (ASC-PET<sub>1</sub>). Tratatamentul cu acid giberelic (AG<sub>3</sub>, 0,01%) a fost realizat prin pulverizarea inflorescenței în faza de butonizare. Preparatele citologice și cele cu secțiuni semifine din antere au fost analizate prin microscopie optică. S-a stabilit că efectele gametocide induse de AG<sub>3</sub>, asociate cu evenimente degenerative și de apoptoză timpurie în celulele tapetumului, sunt mai grave la plantele cu citoplasma sterilă și genele nucleare *Rf1* comparativ cu plantele care au citoplasma fertilă și fără gene restauratoare de fertilitate. În cazul plantelor cu ASC, stimulul giberelinic exogen nu determină apariția unor evenimente vizibile de compensare a fenotipului steril, dimpotrivă, efectele de inhibiție a microsporogenezei sunt mai avansate temporal, celulele țesutului sporogen și sporofit prezentând în premeioză diverse leziuni. Caracteristicile generale comune și de diferențiere a fenotipurilor androsterile constatate sugerează interacțiuni dintre produsele de expresie a genelor *orfH522* și *Rf1* de tip *feedback* negativ la plantele netratate și de *feedback* pozitiv la cele tratate cu AG<sub>3</sub>. Cercetările sunt relevante în contextul elucidării proceselor de reglare fiziologică a sensibilității dezvoltării gametofitului masculin la varii condiții de stres, ceea ce în perspectivă face posibilă intervenția reglatoare la plante cu diferite sisteme de realizare și control a androsterilității/androfertilității.

**Cuvinte-cheie:** androsterilitate, floarea-soarelui, fenotip citohistologic, fertilitate, gibereline.

## INTRODUCERE

Reglarea biochimică și fiziologică la plante implică interrelații complexe de natură hormonală. Expunerea organismelor la varii condiții de mediu și, în special, la stările de stres (a)biotic determină reorganizări în căile de semnalizare celulară [1; 2; 3], rezultând profile modificate de expresie genică și metaboliți prin care se asigură răspunsuri adaptive. În prezent sunt obținute tot mai multe date privind interferența dintre auxine, gibereline, acidul jasmonic, citochinine, brasinosteroizi și alți factori de reglare în promovarea dezvoltării organelor generative, de formare a gametilor și fertilizare [4; 5; 6; 7]. Însă datorită naturii polifactoriale și, în același timp, compensatorie a evenimentelor de recepție și transducție a semnalelor, aceste probleme de cercetare rămân cu întrebări neelucidate.

În numeroase lucrări, giberelinele (AG) sunt prezentate ca principalul grup de fitohormoni (formele active AG<sub>1</sub>, AG<sub>3</sub>, AG<sub>4</sub> etc.) implicat în transformarea meristemului vegetativ în cel floral [6; 8; 9]. În perioada ce precedă tranziția florală, acești compuși cu structură sterolică străbat ușor membranele fosfolipidice, fiind transportați activ de la situsurile de sinteză în cele de acțiune [8; 10]. În antere, concentrații sporite de gibereline fiziologic active au fost identificate atât în celulele sporogene, începând cu primele faze ale meiozei până la formarea grăuncioarelor de polen, cât și în tapetum, în fazele meiozei și până la degenerare [11]. De asemenea, a fost stabilit că sincronizarea metabolică în dezvoltarea țesuturilor anterei are loc prin transducerea semnalelor mediate de acești fitohormoni [12].

Giberelinele, în calitate de semnale biochimice, sunt percepute de către receptori specifici din citoplasmă sau din nucleu, de exemplu GID<sub>1</sub> (GA INSENSITIVE DWARF<sub>1</sub>) [13]. Ulterior, se formează complexul dintre GID<sub>1</sub> și proteinele represori cu motivul DELLA (GAI, GA INSENSITIVE; RGA, REPRESSOR OF GA<sub>1</sub>-3; RGA LIKE 1/2/3 etc.), sporindu-le afinitatea pentru ubiquitin-ligaze (SCF<sup>SLY1E3</sup>) și degradarea în proteazomii 26S [14]. Aceste reacții biochimice sunt primele evenimente în declanșarea transducției semnalelor și activarea factorilor de transcripție specifici promotorilor genelor AG-sensibile pentru răspunsuri fiziologice, care în condiții de stres se pot manifesta prin inhibarea diviziunilor meiotice/mitotice, intensificarea sistemelor enzimatice de reparare a ADN-ului și menținere a integrității genomului, apoptoză etc. [1; 2; 6].

Efecte similare în comportamentul celular au fost puse în evidență la majoritatea plantelor androsterile indiferent de factorii cauzali – interni, genetici [15] sau externi, precum stresul chimic indus prin tratamente gametocide [16; 17], condiții nefavorabile ale mediu-

lui de creștere etc. [18; 19]. Numeroase lucrări prezintă cercetări mai mult sau mai puțin exhaustive cu referire la procesele molecular-fiziologice asociate sterilității polenului la o anumită specie. Totodată, relativ puțin se cunoaște, la plante cu diferit tip de androsterilitate, care sunt cauzele/factorii comuni ce predispun la apariția combinațiilor de semnale interne specifice declanșării stării de apoptoză (MPC, moartea programată a celulelor) și inhibiție parțială sau totală a diviziunilor celulare în țesuturile anterei. Neelucidate sunt și stările fiziologice ce condiționează diferențele temporale în degenerarea heterotipică a tapetumului la diferite genotipuri. În același timp, pentru majoritatea cazurilor de androsterilitate citoplasmatică (ASC) a fost pus în evidență rolul primordial al mitocondriilor în acumularea moleculelor pro-apoptotice sincronizate cu evenimentele MPC din aceste celule ale anterelor [20; 21; 22].

În lucrare sunt prezentate rezultatele analizei fenotipice a dezvoltării anterelor de floarea-soarelui cu androsterilitatea indusă de giberelină (ASI-AG<sub>3</sub>) la plantele cu diferit mitotip (fertil/steril) și genotip alelic pentru gena *Rf1* în aspect comparativ cu cele fertile și sterile (ASC-PET1).

## MATERIAL ȘI METODE

Materialul de studiu a inclus cinci genotipuri de floarea-soarelui care diferă, inclusiv, prin gena nucleară restauratoare de fertilitate masculină *Rf1* [23] și gena mitocondrială asociată cu androsterilitatea de tip PET1 *orfH522* [23]:

- linia SW501 (linie B, menținătoare de sterilitate, citoplasma *Helianthus annuus* L. nu conține alele dominante de restaurare a fertilității (cit<sup>N</sup>rfrf));
- linia SW501ASC (linie A, citoplasma PET1 (cit<sup>S</sup>rfrf)), considerată izonucleară cu analogul fertil;
- linia Drofa Rf, care conține gena restauratoare de fertilitate (cit<sup>S</sup>RfRf) în stare homozigotă dominantă;
- linia Drofa ASC (citotip PET1 (cit<sup>S</sup>rfrf));
- hibridul Drofa F<sub>1</sub> cu fertilitatea restaurată, care conține gena de restaurare a fertilității în stare heterozigotă (cit<sup>S</sup>Rfrf).

*Obținerea materialului experimental.* Tratamentul cu acid giberelic (AG<sub>3</sub>, 0,01%) a fost realizat prin pulverizarea inflorescenței în faza de butonizare. Fenotipul plantelor tratate a fost analizat în raport cu cel al plantelor netratate chimic (control) [24]. Creșterea și dezvoltarea plantelor în câmp a fost monitorizată în funcție de etapele fenologice principale VE, V, R1-5 [25] pentru a controla și evita dezvoltarea bolilor. Condițiile de cultivare, principiul de stabilire a fazelor microsporogenezei, precum și modul de prelevare a probelor pentru analiza macro- și microscopică a anterelor au fost descrise în lucrările publicate anterior [26; 27].

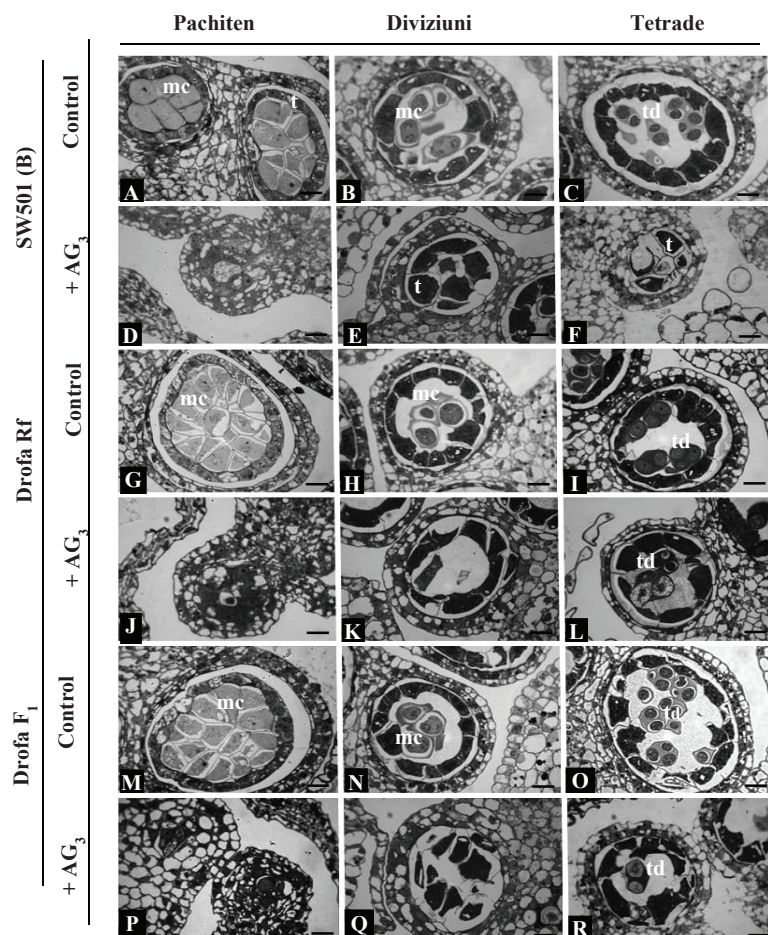
*Analiza macro- și microscopică a anterelor.* Analiza morfometrică a butonilor florali și anterelor s-a realizat cu șublerul digital la microscop (x64) prin intermediul unui soft specializat (Future Optics Sci. & Tech.). Preparatele pentru analiza citologică prin microscopie fonică au fost obținute prin metode standard [28] ce au inclus: fixarea anterelor în amestec de etanol:acid acetic (3:1) timp de 24 de ore la temperatura camerei, imersii repetate în alcool etilic de 70%, colorare cu carmină acetică de 1%. Obținerea preparatelor pentru analiza secțiunilor transversale semifine din antere s-a realizat conform protocoalelor recunoscute [29]. Materialul biologic a fost supus unor etape de fixare în aldehide glutarice de 3% și OsO<sub>4</sub> de 2%, deshidratare în etanol și incluzionare în rășini epoxidice. Secțiunile au fost obținute prin intermediul unui cuțit de sticlă la ultramicrotomul Ultracut-R (UMTP4) și ulterior colorate cu soluția de albastru de toluidină. Examinarea prepara-

lor și fotodocumentarea au fost realizate la microscopul fonic (XSZ-206T, Ningbo Wason Optical Instrument Co., Ltd) dotat cu cameră CCD (MEM1300, Future Optics Sci. & Tech.), fiind utilizate obiectivele cu factorul de mărire 10X, 40X, 100X la ocularul de 16X.

Estimarea semnificației diferențelor s-a realizat prin testul-t ( $p \leq 0,05$ ) și formulele de calcul statistic ale aplicației Microsoft Excel. Datele din figuri reprezintă valorile medii și abaterea standard.

## REZULTATE

**Fenotipul citohistologic al anterelor la plantele fertile în aspect comparativ cu cele ale plantelor tratate cu AG<sub>3</sub>.** Anterele fertile ale plantelor de floarea-soarelui cu genotip heterozigot (Dofa F<sub>1</sub>) și homozigot (liniile SW501 și Drofa Rf) prezintă în secțiune transversală o structură bine diferențiată: epidermă, endoteciu, stratul median și tapetum (figura 1 A-C, G-I, M-O).



**Figura 1.** Aspect comparativ al fenotipului fertil și cu ASI-AG<sub>3</sub> al anterelor de floarea-soarelui în diferite faze ale microsporogenezei la liniile SW501, Drofa Rf și hibridul Drofa F<sub>1</sub>.

*Notă:* Antere (secțiuni transversale) fertile (A-C, G-I, M-O) și cu sterilitate indusă prin tratare cu AG<sub>3</sub> (D-F, J-L, P-R) în diferite faze ale microsporogenezei corelate cu dimensiunile florilor tubulare: 1,5 mm, pachiten (A, D, G, J, M, P); 2,5 mm, diviziuni (B, E, H, K, N, Q) și 3,0 mm, tetrade (C, F, I, L, O, R).

*Abrevieri:* td – tetrade; t – tapetum; mc – microsporocite.

Scara barei 50 μm.

Din țesutul sporogen se individualizează microsporocitele (figura 1 A, B, G, H, M, N O; figura 2 L, P, D), care, treptat, în perioada incipientă a meiozei I, se separă atât între ele, cât și de la tapetum. La sfârșitul meiozei II, din patru nuclee haploizi rezultați din diviziunile hetero- și homotipice se formează tetradele cu microspori (figura 1 C, I, O; figura 2 T).

Celulele tapetumului uninucleate în faza leptoten devin binucleate în pachiten și mai rar cu trei sau patru nuclee de dimensiune și formă diferită (sferică, ovală sau alungită). Sincronizat cu dezvoltarea microsporocitelor, plasmalema acestor celule somatice se extinde în interiorul lojei anterii. Spre sfârșitul fazei de formare a tetradelor în microsporangiu se evidențiază tapetumul cu aspect de plasmodiu și nuclee intens poliploidizate, celulele fiind separate una de alta, în timp ce stratul median este subțire și cu semne de degenerare.

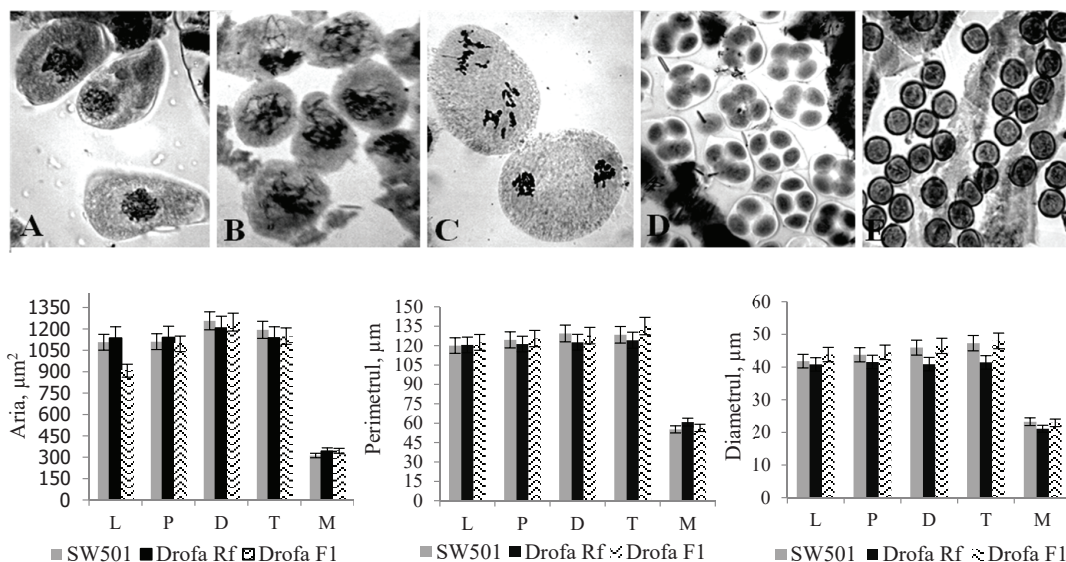
Microspori bine conturați și colorați intens au fost observați după digestia peretelui calozic în microsporangii anterelor din florile fertile mai mari de 3,5 mm la toate cele trei genotipuri analizate homo- și heterozigote (figura 2 M). Dezvoltarea postmeiotică a microsporilor până la grăunciorii de polen, depunerea exinei primare, formarea echinulațiilor etc. evoluează corespunzător speciei.

Lipsa devierilor de la normă în dezvoltarea gametofitului mascul este confirmată și de valoarea medie a unor indici morfometrici (figura 2). De exemplu, aria microsporocitelor în leptoten și pachiten se include în intervalul de valori 900-1140 de  $\mu\text{m}^2$ , iar pentru cele din diviziuni acest indice este 1200-1257  $\mu\text{m}^2$ . Aria micros-

porilor eliberați din tetrade este de  $345,16 \pm 3,21 \mu\text{m}^2$  la Drofa F<sub>1</sub>, de  $311,84 \pm 2,36 \mu\text{m}^2$  și  $341,29 \pm 3,12 \mu\text{m}^2$  la liniile SW501 și respectiv la Drofa R<sub>f</sub>. Cealalți doi indici studiați au prezentat de asemenea variații minore în diferite etape ale microsporogenezei, perimetrul celulelor generative fiind de 120-135  $\mu\text{m}$ , iar diametrul de 41-48  $\mu\text{m}$  (leptoten-tetrade). În cazul microsporilor, perimetrul și diametrul celulelor au fost:  $56,41 \pm 0,33 \mu\text{m}$  și  $22,93 \pm 0,38 \mu\text{m}$  pentru Drofa F<sub>1</sub>,  $60,89 \pm 0,46 \mu\text{m}$  și  $21,11 \pm 0,27 \mu\text{m}$  pentru Drofa R<sub>f</sub>, de  $55,20 \pm 0,40 \mu\text{m}$  și respectiv  $23,26 \pm 0,21 \mu\text{m}$  pentru linia SW501. Întrucât microsporogeneza la plantele liniei SW501 (B) a restauratorului de fertilitate și hibridului F<sub>1</sub> a decurs fără devieri de la normă, gradul de fertilitate a fost de 99-100%.

În concluzie, dezvoltarea microsporangioanelor la genotipurile homo- și heterozigote studiate a decurs în corespundere cu particularitățile descrise pentru plantele de floarea-soarelui [30; 31].

Acidul giberelic aplicat pe inflorescența de floarea-soarelui cu celule sporogene în premeioză a cauzat transformări semnificative în dezvoltarea gametofitului mascul, modificând fenotipul anterelor din fertil în steril la plantele liniei menținătoare de sterilitate SW501, restauratoare de fertilitate Drofa R<sub>f</sub> și a hibridului Drofa F<sub>1</sub>. Particularități structurale tipice sterilității masculine au fost evidențiate în toate etapele microsporogenezei (figura 1 D, E, F, J, K, L, P, Q, R), stabilite prin asociere cu dimensiunea florilor tubulare similar plantelor netratate. Astfel, anterele din butonii floralii mai mici de 1,5 mm (corespunzător fazei leptoten la plantele fertile netratate) conțin



**Figura 2.** Fenotipul citologic și unii indici morfometrici ai microsporocitelor și microsporilor la liniile SW501, Drofa R<sub>f</sub> și hibridul Drofa F<sub>1</sub>.

Notă: Fazele studiate ale microsporogenezei: L – leptoten; P – pachiten; D – diviziuni; T – tetrade; M – microspor. Factorul de mărire în microfotografii: x1600 (diviziuni), x640 (leptoten, pachiten, tetrade, microspor).

microsporocite în premeioză și un număr foarte mic (1-2 celule în câmpul de vedere) în faza leptoten asociate cu conglomerate de membrane și celule aglutinate (figura 3 L).

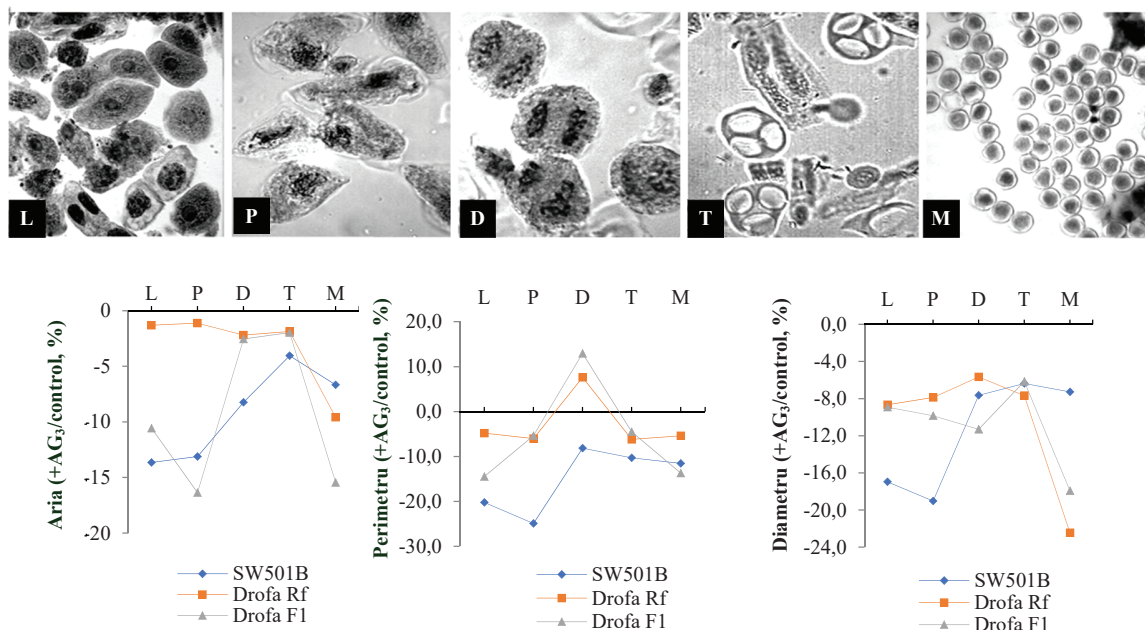
În variantele tratate tapetumul, epiderma și endoteciul din anterele florilor de 1,5 mm (pachiten) sunt mai puțin distincte, cu multiple anomalii de formă și vacuole de diferită dimensiune (figura 1 D, J, P). În spațiul locular a pătruns citoplasma celulelor tapetumului. Majoritatea microsporocitelor au dezvoltarea stopată în premeioză și doar în unele cazuri ajung în leptoten și pachiten având dimensiuni variate și formă neregulată (figura 3 L, P). Precizăm că anomaliile morfologice ale anterelor în preparatele variantelor tratate cu giberelină par a fi mai pronunțate la plantele hibride (figura 1 P, Q, R).

În anterele florilor tubulare cu dimensiuni de 2,3-2,7 mm (corespunzător fazei de diviziuni în varianta netratată) celulele din straturile parietale sunt mai alungite și, de asemenea, hipervacuolate, îndeosebi la plantele hibride (figura 1 E, K, Q). Tapetumul este neuniform colorat și hipertrofiat, ocupând aproape în totalitate cavitatea lojei. Similar anterelor din plantele netratate, cele mai multe dintre celulele tapetumului

au două nuclee, dar acestea sunt mai variate ca formă și în unele cazuri cromatina prezintă semne de picnoză. Procesele de diviziune meiotică nu evoluează, astfel încât se observă populații mici eterogene din meiocite în premeioză, leptoten, zigoten și pachiten. Unele dintre aceste celule reproductive au forma clar conturată și cu citoplasma intens colorată, altele prezintă vacuolizare exagerată, anomalii ale nucleelor, plasmoliză și lipsa unui perete celular rigid.

La plantele tratate, inclusiv anterele cu dimensiuni mai mari conțin microsporocite în premeioză sau faze mai târzii ale meiozei, acestea fiind afectate sever și în conglomerat cu fragmente de material calozic. Tetrade, de asemenea, au fost identificate în variantele tratate ale plantelor hibride, ale liniei restauratoare de fertilitate și ale liniei SW501, însă microsporiile au formă și dimensiune diferită cu pereți subțiri. Mai mult ca atât, unii microspori sunt fragmentați și cu reziduuri de material dens colorat în centrul microsporului (figura 1 F, L, R; figura 3 T).

Straturile parietale ale anterei prezintă deformări semnificative, în special în partea anterioară, iar celulele de diferite dimensiuni ale tapetumului hipertrofiat sunt asociate cu nuclee și celule aglutinate fără cito-



Variabile, coeficient de corelate Pearson, r (X,Y)	Linia SW501 (B)	Linia Drofa Rf	Hibridul Drofa F <sub>1</sub>
Aria, perimetrul	0,85	0,14	0,64
Aria, diametrul	0,94	0,96	0,54
Perimetrul, diametrul	0,97	0,37	0,19

**Figura 3.** Fenotipul citologic și modificările în dinamică ale indicilor morfometrici ai microsporocitelor și microsporilor la plantele cu ASI-AG<sub>3</sub> în raport cu cele fertile (control).

Notă: Fazele studiate ale microsporogenezei: L – leptoten; P – pachiten; D – diviziuni; T – tetrade; M – microspor. Factorul de mărire în microfotografii: x1600 (diviziuni), x640 (leptoten, pachiten, tetrade, microspor).

plasmă și membrane. Aceste anomalii contrastează puternic cu fenotipul citohistologic al anterelor din variantele netratate, la care microsporangii sunt plini de tetrade cu microspori haploizi, iar tapetumul plasmomial intens colorat.

În etapele post-meiotice de dezvoltare a anterelor se observă aceleași efecte degenerative, precum microspori plasmolizați, conglomerate de membrană calozică și nuclee aglutinate, incapacitatea de a menține citoplasma intens colorată, tapetum persistent sau deteriorat selectiv. În unele antere din butonii florali mai mari de 3,5 mm se constată loculi cu populații omogene de microspori sterili, adiacent cu unii lipsiți total de microspori.

Un șir de particularități de diferențiere a răspunsului genotipurilor la tratamentul cu  $AG_3$  sunt mai evidente din analiza morfometrică, fiind constatate devieri de concordanță a modificărilor în dinamica valorilor ariei, perimetrului și diametrului microsporocitelor, în special, la genotipurile Drofa Rf și Drofa  $F_1$  (figura 3).

Astfel, la varianta SW501- $AG_3$  valorile pentru aria, perimetrul și diametrul acestor celule sunt mai mici față de control (plante netratate), îndeosebi, în fazele leptoten (cu 13,64%, 20,19% și respectiv 16,96%) și pachiten (13,11%, 24,87% și respectiv 19,02%). Totodată, este important de menționat că modificările sunt proporționale între indici, fapt relevat de coeficientul de corelație *Pearson*  $r(X, Y) = 0,85-0,97$  dintre valorile medii ale diferențelor (%) față de martor (figura 3).

Dimpotrivă, în cazul fenotipurilor Drofa Rf- $AG_3$  și Drofa  $F_1$ - $AG_3$  nu se observă aceeași tendință de modificare relaționată dintre indicii studiați. De exemplu, meiocitele în faza de diviziuni au perimetrul cu 7,64% (Drofa Rf) și 12,97% (Drofa  $F_1$ ) mai mare față de control. În același timp, aria și diametrul celulelor sunt mai mici față de control cu 2,19% și 5,65% la restauratorul de fertilitate, și cu 2,54%, respectiv 11,30% la forma hibridă, ceea ce a rezultat în corelații pozitive de intensitate slabă și medie dintre valorile pentru perimetru și diametru, cu excepția  $r(X, Y)$  dintre arie și diametru în cazul variantei Drofa Rf- $AG_3$  ( $r=0,96$ ).

Astfel, atât analiza preparatelor cu microsporangii în secțiune, cât și cercetarea modificărilor indicilor morfometrici ai celulelor reproductive denotă că răspunsul la tratamentul cu  $AG_3$  al liniei homozigote Drofa Rf prezintă mai multe similarități cu cel al hibridului Drofa  $F_1$  decât cu cel al liniei homozigote SW501B.

Anomaliile de formă și volum a microsporocitelor demonstrează deficiențe în menținerea integrității membranelor, a proprietăților fizice ale protoplas-

mei și respectiv a funcționalității acestor structuri. În preparatele citologice au fost identificate numeroase anomalii cromozomiale precum: cromozomi retardatari, expulzați din celulă, picnotici, aglutinări ale cromozomilor, corpuri și fragmente cromatidice, punți, micronuclei și microcite.

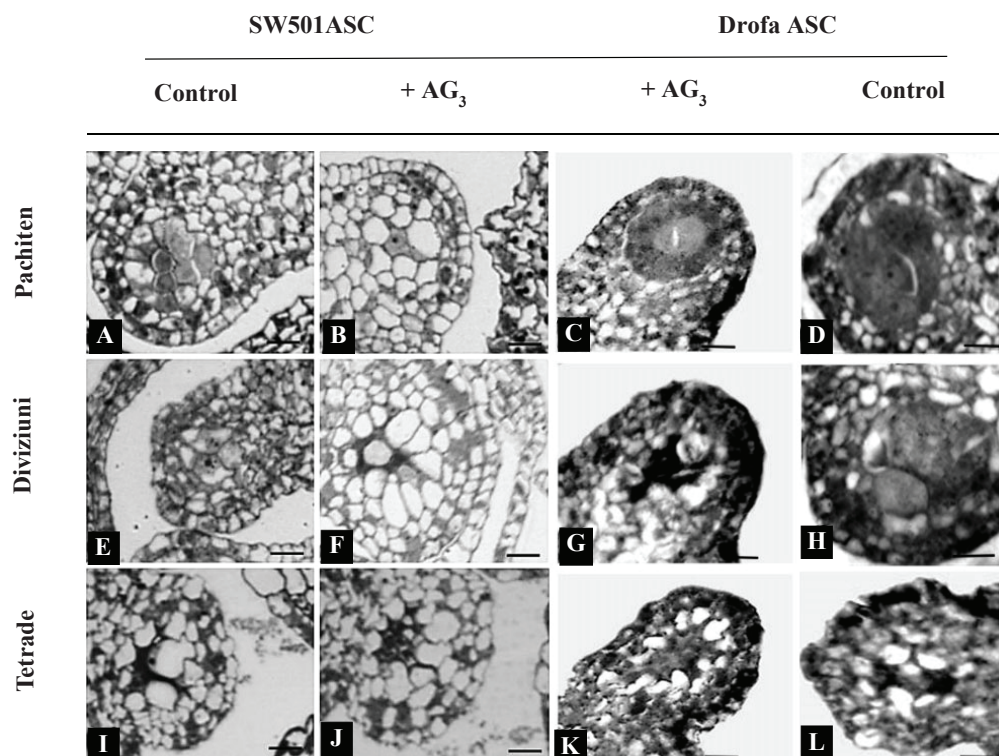
Numărul de microsporocite cu aberații este diferit de la o fază la alta, mai frecvent fiind observate în anafaza și metafaza meiozei I, anafaza, metafaza și telofaza diviziunii meiotice II. Astfel, s-a constatat că 64,0% din numărul total de microsporocite analizate la linia SW501- $AG_3$  prezentau anomalii cromozomiale. Un procent comparativ mai mare de celule cu anomalii ale cromozomilor a fost identificat la variantele tratate ale liniei Drofa Rf și Drofa  $F_1$  (75-78%). Cel mai frecvent întâlnite au fost microsporocitele cu cromozomi retardatari, neorientați și micronuclei, în special în metafaza I, anafaza I, profaza II.

La plantele fertile (variantele netratate), de asemenea, au fost constatate unele anomalii meiotice (migrații precoce, cromozomi neorientați și retardatari), însă frecvența acestora la genotipurile studiate a fost mai mică de 2,5%. Apariția unor anomalii cu o frecvență mică (până la 5%) la formele fertile de floarea-soarelui au fost raportate și de alți cercetători [32].

La plantele tratate, spre deosebire de cele fertile, a fost observat un număr mai mare de produse post-meiotice atipice precum monade, diade, triade și poliade, inclusiv microspori cu conturul celulelor distorsionat, plasmolizate intens (buton floral 3,5-4 cm). Astfel, în cazul plantelor cu ASI- $AG_3$  s-a constatat un procent mic de polen aparent fertil ( $12,31 \pm 1,05\%$  la linia SW501,  $31,3 \pm 1,24\%$  la Drofa Rf și  $25,6 \pm 2,53\%$  la Drofa  $F_1$ ).

**Fenotipul citohistologic al anterelor la plantele sterile (ASC-PET1) în aspect comparativ cu cele ale plantelor tratate cu  $AG_3$ .** La plantele liniilor cu androsterilitate citoplasmatică SW501 ASC (figura 4 A, E, I) și Drofa ASC (figura 4 D, H, L), fenotipic, microsporogeneza s-a desfășurat într-un mod similar, primele disfuncționalități vizibile fiind observate în profaza I.

Meioza inițiată în majoritatea celulelor sporogene decurge, aparent, normal până în faza leptoten, întrucât foarte puține dintre ele ajung în faza pachiten (figura 4 A, D). Respectiv, caracteristicile morfologice ale microsporocitelor în faza leptoten nu diferă esențial de cele ale genotipurilor fertile. Valorile medii pentru aria celulelor (leptoten) este de  $1100,20 \pm 2,19 \mu m^2$  la SW501ASC și  $1103,20 \pm 1,15 \mu m^2$  la Drofa ASC. Perimetrul microsporocitelor este  $119,28 \pm 0,98 \mu m$  la SW501ASC și  $120,28 \pm 0,86 \mu m$  la Drofa ASC, iar în diametru pentru aceste celule au fost constatate valori de  $41,10 \pm 0,24 \mu m$  la SW501ASC și de  $40,80 \pm 0,31 \mu m$  la Drofa ASC.



**Figura 4.** Fenotipul ASC și ASC-AG<sub>3</sub> al anterelor de floarea-soarelui în diferite faze ale microsporogenezei la liniile SW501ASC și Drofa ASC.

*Notă:* Antere (secțiuni transversale) sterile netratate (A, E, I, D, H, L) și tratate cu AG<sub>3</sub> (B, E, J, C, G, K) în diferite faze ale microsporogenezei, corelate cu dimensiunile florilor tubulare: 1,5 mm, pachiten (A, B, C, D); 2,5 mm, diviziuni (E, F, G, H) și 3,0 mm, tetrade (I, J, K, L).

Scara barei 50 μm.

În antere (secțiune transversală), 80-90% dintre meiocite erau deja degenerate în pachiten/pachitendiploten. Totuși, în unii butoni floralii mai mari de 2,5 mm au fost identificate puține microsporocite în diachineză, metafaza, anafaza, telofaza din ambele diviziuni meiotice, toate prezentând anomalii ale formei și dimensiunii. Tetrade nu au fost depistate. La nivelul țesuturilor anterelor, îndeosebi al tapetumului, au fost evidente procese intense de hipertrofie și vacuolizare, polarizarea conținutului citoplasmatic, pereți celulari slab distincți între celulele adiacente (figura 4 E, I, H, L).

La plantele cu ASC, în anterele în faza de formare a tetradelor, tapetumul are caracteristici de apoptoză accentuate, spre deosebire de cele ale plantelor fertile, la care acest țesut, fiind un substrat nutritiv pentru microspori, prezintă semne certe de consumare.

Efectul tratării cu AG<sub>3</sub> a plantelor cu ASC – analogul steril SW501 (linia A) și linia maternă a hibridului Drofa –, se manifestă prin inhibarea proceselor de inițiere a diviziunilor meiotice, precum și a dezvoltării tapetumului, care deja în faza pachiten este exagerat de hipertrofiat cu semne evidente de aglutinare (figura 4 B, C, F, G, J, K). De asemenea, celule cu unul și mai mulți nuclei au fost observate în conglomerat cu celule degradate și nuclei separați. În anterele cu dimensiuni

corespunzătoare fazelor mai avansate ale microsporogenezei au fost identificate aceleași anomalii: meiocite inhibitate în premeioză cu dimensiuni exagerat de reduse sau foarte mari, celule cu nucleu periferic, citoplasmă transparentă, fragmente de membrane, nuclei degradați. Deși la liniile ASC tratate cu AG<sub>3</sub> celulele sporogene degenerază în stadiul premeiotic, celelalte țesuturi ale anterei, în special endotecium și epiderma, continue să persiste, astfel încât antera la maturitate își menține conturul.

## DISCUȚII

Diferențierea primordiilor generative din meristemul vegetativ succedată de microsporogeneză, gametogeneza și de alte procese ale dezvoltării reproductive se află sub un control morfogenetic riguros prin interacțiuni de semnalizare hormonală care, fiind desincronizate, declanșează răspunsuri celulare cu diferită expresie fenotipică. Un astfel de exemplu este fenotipul citohistologic al androsterilității induse de gibberelină la genotipuri diferite de floarea-soarelui (liniile SW501 (B), Drofa Rf și hibridul Drofa F<sub>1</sub>). Analizat în comparație cu cel al androsterilității citoplasmatică (SW501 ASC, Drofa ASC), acesta a pus în evidență ca-

racteristici generale comune și de diferențiere în funcție de factorii genetici ASC și/sau Rf și dezechilibre în semnalizarea giberelinică.

Aplicarea AG<sub>3</sub> pe inflorescențele fertile cu celule sporogene în premeioză a cauzat formarea conglomeratelor heterogene de microsporocite/microspori cu diverse anomalii, relevând evenimente de inhibiție și asincronie în semnalizarea intra- și intercelulară a microsporocitelor cu celelalte țesuturi ale anterei. Trebuie menționat că, deși la aceste genotipuri, în normă, fenotipul citologic și histologic al microsporangiilor este în mare parte similar, în răspunsul post-tratament au fost remarcate unele diferențe, atât între plantele liniilor consangvinizate SW501 și Drofa Rf, cât și între genitorul patern și hibridul Drofa F<sub>1</sub>. Astfel, efectele gametocide induse de AG<sub>3</sub>, în special, în primele faze ale meiozei, asociate cu evenimente degenerative și de apoptoză timpurie în celulele tapetumului, sunt mai grave la plantele cu citoplasma sterilă și genele nucleare Rf1 comparativ cu cele care au citoplasma fertilă și fără gene Rf1. Mai mult ca atât, modificările structurale (de formă și volum) și de diviziuni meiotice ale celulelor generative sugerează un nivel mai mare de sensibilitate la tratamentul cu AG<sub>3</sub> la plantele hibride comparativ cu cele ale liniei paterne, fapt ce ar putea fi explicat prin diferențele în genomul nuclear (50 % fiind moștenit de la linia Drofa ASC), inclusiv genotipul alelic al genelor restauratoare de fertilitate.

Tratarea cu acid giberelic a plantelor SW501 ASC și Drofa ASC nu determină apariția unor evenimente vizibile de compensare/anulare a fenotipului steril. Dimpotrivă, efectele de inhibiție a microsporogenezei sunt mult mai avansate temporal față de cele constatate la variantele netratate, celulele țesutului sporogen și sporofit prezentând deja diverse leziuni în stadiul de interfază premeiotică. Este relevant că profilul citologic și histologic al anterelor, atât în variantele control, cât și în cele tratate, prezintă similaritate înaltă la ambele linii cu citotip ASC-PET1, fapt ce le deosebește de genotipurile plantelor fertile care au răspuns diferențiat la acțiunea stimulului AG<sub>3</sub> exogen, într-o măsură mai mare/mica în funcție de faza microsporogenezei.

În prezent este descrisă organizarea moleculară a ADNmt PET1 la floarea-soarelui [33; 34], sunt propuse unele modele potențiale de acțiune a factorilor genetici responsabili de sterilitate (*orfH522*) [22; 31; 35] și restaurare a fertilității la hibridi (genele nucleare Rf) [31; 36]. Fenotipul ASC-PET1 este asociat cu deficiențe de energie metabolică, fiind identificate nivele reduse de activitate a F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPazei corelate cu acumularea cotranscriptului *atpA-orfH522* în antere [22; 37]. De asemenea, în cazul anterelor sterile, acumularea *citocromului c* în citosolul celulelor tapetumului con-

mitent cu intensificarea unor procese pro-apoptotice (condensarea și fragmentarea ADN-ului) are loc mai devreme, în pachiten, spre deosebire de cele fertile la care astfel de evenimente sunt observate în faza de tetrade. A fost sugerat că *citocromul c* este eliberat din mitocondrii în urma formării unor pori tranzitorii în membrana externă, proces asociat cu pierderea potențialului membranar, respectiv și al bilanțului energetic, rezultând prematur moartea programată a celulelor tapetumului și meiocitelor în anterele ASC-PET1 [37].

Rolul proteinei *orfH522* în inducerea sterilității este confirmat și de datele expresiei heterologe în celulele tapet ale anterelor de tutun, fiind puse în evidență efecte similare de inducere a sterilității [38; 39].

Trebuie menționat că mitogenomul PET1-ASC este descris în detalii la nivel de secvență genică [33; 34], se cunoaște modul de inserare a proteinei *orfH522* în membrana mitocondrială [35] și sunt constatate unele efecte biochimice asociate [31; 35], iar în ceea ce privește contextul molecular-fiziologic ce predisune la apariția/manifestarea fenotipului steril al anterelor sunt mai multe probleme discutabile. Un astfel de subiect cu numeroase întrebări de cercetare se referă la mecanismele prin care se asigură specificitatea tisulară în expresia fenotipică a acumulării transcriptului/proteinei *orfH522*, precum și la rolul energetic al mitocondriilor ca factor causal exclusiv în dezvoltarea anormală a gametofitului mascul.

Expresia *orfH522* este constitutivă. Cu toate acestea, disfuncția mitocondrială asociată produsului de expresie declanșează prematur moartea celulară doar la nivelul țesuturilor anterei [31]. Această particularitate este explicată de unii cercetători prin acumularea sporită a transcripturilor cu funcții în metabolismul respirator în antere și biogeneza mitocondriilor ca răspuns la cerințele energetice înalte specifice fazei ontogenetice reproductive [22]. Totodată, procese intense de biogeneza a mitocondriilor la floarea-soarelui au fost constatate și în țesuturile radiculare, concluzionându-se că deficiențele în asigurarea cu energie metabolică cauzate de disfuncția mitocondriilor din citoplasma PET1-ASC ar putea să nu fie singura cauză în manifestarea fenotipului androsteril [37]. În susținerea acestei concluzii sunt rezultatele obținute de P. Touzet și E. Meyer [40] la forme mutante de plante, care având gene codificatoare de proteine ale sistemului de fosforilare oxidativă silențiate au produs polen fertil.

O altă ipoteză privind caracteristica de specificitate tisulară în manifestarea fenotipului ASC a fost lansată de C. Smart și colab. [31], potrivit cărora nivelul ridicat al expresiei genelor mitocondriale și al biogenezei mitocondriilor în meiocite este condiționat de

necesitatea formării unui număr suficient de organite pentru a asigura dezvoltarea celor patru celule haploide din care se vor dezvolta grăuncioarele de polen. Astfel, autorii [31] sugerează că pentru dezvoltarea gameților masculi este necesar un număr mai mare de mitocondrii comparativ cu cel pentru formarea gameților femeli sau celulele cu diviziuni mitotice (de exemplu, în meristeme), întrucât microsporocitul se divide în mod egal și simultan în patru celule, fiecare microspor devenind un gametofit mascul ce trebuie să existe independent de țesutul parental al anterei. Prin urmare, expresia *orfH522* în liniile ASC poate inhiba/afecta biogeneza mitocondriilor în microsporocite, rezultând colapsul celulelor generative.

Restaurarea fertilității polenului are loc în urma degradării *orfH522*, care se cotranscrie cu *atpA*, printr-un mecanism de poliadenilare diferențiată de către ARN-aza2, codificată de gena nucleară *Rfl* în stare dominantă homozigotă sau heterozigotă (la descendenții  $F_1$ ) [41; 42]. Reducerea tisular-specifică a conținutului *atpA-orfH522* a fost constatată în toate etapele dezvoltării anterelor, însă mult mai pronunțată are loc în fazele timpurii ale meiozei (leptoten) și în cele de formare a tetradelor și microsporilor [31]. Este important de menționat că informația cunoscută cu referire la posibilul mecanism de acțiune a genelor restauratoare de fertilitate [43] nu prezintă modul de reglare cito-nucleară a activității ARN-aza2 în corespundere cu conținutul variabil al transcripturilor *orfH522* în microsporogeneză. De asemenea, o întrebare deschisă este și acel nivel prag al conținutului transcripturilor sau proteinei *orfH522*, suficient pentru manifestarea fenotipului steril la floarea-soarelui.

Astfel, lipsa unor particularități discriminative vizibile în fenotipul citohistologic al anterelor fertile, în funcție de conținutul proteinelor produse de genele *Rfl* în stare homozigotă dominantă (linii Rf) sau heterozigotă ( $F_1$ ) și al transcripturilor *orfH522* cu care interacționează, poate fi explicată prin faptul că pentru restaurarea fertilității este suficientă prezența în genom a unei singure alele dominante (*Rf1rf1*). Dimpotrivă, diferențele în fenotipul anterelor asociate genotipului alelic al genelor restauratoare de fertilitate se evidențiază în răspunsul la acțiunea gibberelinei externe, indicând un grad relativ mai mare de sensibilitate la hibridul  $F_1$  în comparație cu linia paternă. Aceste rezultate sugerează atât un efect de doză în potențialul de acțiune a genei *Rfl* în restaurarea fertilității prin modificarea concentrației factorului de sterilitate, cât și consecințe cumulate ale prezenței *orfH522* în mitogenom cu cele induse de semnalizarea gibberelinică exagerată. Expresia fenotipică elocventă a unor procese de *feedback* pozitiv, ce implică perturbații fiziologi-

ce asociate disfuncției mitocondriale convergente cu cele induse de transducția semnalelor gibberelinice externe, este constatată la liniile ASC tratate cu  $AG_3$ , care prezintă în diferite faze ale microsporogenezei unul și același profil – microsporangi cu dezvoltarea inhibată și celule sporogene degenerate în premeioză.

Inflorescențele cu antere în premeioză la plantele SW501ASC se deosebesc de cele ale analogilor fertili prin cantități ale gibberelinelor și auxinelor mai reduse, care se modifică după tratamentul cu  $AG_3$  [44]. Interacțiunea semnalului biochimic cu receptorii specifici a majorat la ambele linii consangvinizate concentrația gibberelinelor în sinergie cu cea a auxinelor endogene cu 28-50% peste 24 de ore după tratament. Deși efectul de sporire în cantitate scade treptat în intensitate atât în anterele cu ASC, cât și în cele cu ASI, raportul dintre acești doi hormoni (*gibberelina/auxina*) se menține anormal de ridicat timp de 96 de ore post tratament (durata de timp analizată), ceea ce a fost suficient pentru declanșarea unei noi stări de semnalizare cu răspunsuri celulare ce a compromis dezvoltarea polenului fertil la linia SW501 și a accelerat colapsul celulelor mamă polenice la linia ASC-PET1.

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cercetările efectuate pe forme mutante ale receptorului gibberelinic *GID1* (*gid1 triplu*) la orez [45] și arabidopsis [46], care au demonstrat că proteinele de semnalizare sintetizate în celulele sporogene premeiotice persistă postmeiotic, menținând starea de semnalizare gibberelinică în microsporii haploizi în pofida absenței unui sistem funcțional de semnalizare gibberelinică.

De asemenea, precizăm că la plantele liniei fertile SW501 tratarea cu  $AG_3$  a determinat acumularea unui transcript cu secvență nucleotidică similară celui codificat de *orfH522* (GenBank: X55963) la linia cu citotipul ASC-PET1 [47]. Prin electroforeza în condiții denaturante a extractului proteic din frunze și inflorescența plantelor cu ASI- $AG_3$  a fost identificată și prezența unui polipeptid de 16 kD care lipsește în profilul SDS-PAGE la varianta netratată, sugerând că acesta poate fi produsul de translație al *orfH522* [44; 48].

Apariția în anterele liniei SW501 tratate cu  $AG_3$  a transcriptului cu secvență similară ARNm-*orfH522* (specific pentru ASC-PET1), în concentrație decelabilă ce crește în dinamică [47; 48], precum și diversele anomalii de diviziune și de structură a microsporocitelor presupun afectarea expresiei genelor nucleare specifice și asociate microsporogenezei, inclusiv a celor mitocondriale care se află sub control de semnalizare anterogradă. Cauzele variațiilor de expresie (cantitative și calitative) a genelor mitocondriale pot fi diferite, inclusiv modificarea numărului de organite/celulă, a replicării diferențiate a mitogenomurilor,

a selecției intracelulare și altor procese care intensifică heteroplasmia, precum amplificarea unor molecule subgenomice preexistente substoichiometric, ducând la un nou răspuns fenotipic [49; 50; 51].

Astfel, conchidem că semnalizarea exagerată indusă de stimulul giberelinic exogen în anterele în premeioză a determinat activarea/supresia genelor susceptibile, creând condiții pentru un șir de evenimente ce au dus la perturbarea microsporogenezei (anomalii în diviziunile meiotice, hipertofie celulară, leziuni ale materialului genetic etc.). Acest context fiziologic prezintă procese celulare comune cu cele asociate citotipului PET1-ASC, interferența acestora amplifică efectele degenerative, depășind acțiunea stabilizatoare a factorilor genetici Rf prin degradarea transcripților mitocondriali *orfH522*.

Cercetările prezintă importanță în contextul elucidării proceselor specifice și comune la plante cu diferite sisteme de realizare și control ale androsterilității/fertilității, ceea ce, în perspectivă, face posibil intervenția reglatoare sau obținerea de noi genotipuri cu sterilitate citoplasmatică.

## CONCLUZII

Fenotipul citohistologic al anterelor la diferite genotipuri de floarea-soarelui: cu același genom nuclear și mitogenom diferit (fertil/steril), sau același mitogenom (PET1-ASC) și cu genotipul alelic diferit al genei restauratoare de fertilitate (RfRf, Rfrf) sugerează interacțiuni dintre produsele de expresie a genelor *orfH522* și *Rf1* de tip *feedback* negativ la plantele netratate și de *feedback* pozitiv indus de AG<sub>3</sub>, rezultând modificarea ireversibilă a fenotipului din fertil în steril la cele tratate.

## BIBLIOGRAFIE

- Hakeem, K.R., Rehman, R.U., Tahir, I. Plant signaling. Understanding the molecular crosstalk. New Delhi: Springer, 2014. 355 p.
- Ku, Y.S., Sintaha, M., Cheung, M.Y., Lam, H.M. Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. In: Int. J. Mol. Sci., 2018, vol. 19(10), 1-35.
- Tal, L., Anleu, Gil, M.X., Guercio, A.M., Shabek, N. Structural aspects of plant hormone signal perception and regulation by ubiquitin ligases. In: Plant Physiology, 2020, vol. 182(4), 1537-1544.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Xie, D. Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in *Arabidopsis*. In: Molecular Plant, 2013, vol. 6, 1065-1073.
- Gómez, J.F., Talle, B., Wilson, Z.A. Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. In: Journal of Integrative Plant Biology, 2015, vol. 57, 876-891.
- Bao, S., Hua, C., Shen, L., Yu, H. New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. In: Journal of Integrative Plant Biology, 2020, vol. 62, 118-131.
- Bao, S., Hua, C., Huang, G. et al. Molecular basis of natural variation in photoperiodic flowering responses. In: Developmental Cell, 2019, vol. 50, 90-101.
- Wang, H., Pan, J., Li, Y. et al. The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering. In: Plant Physiology, 2016, vol. 172, 479-488.
- Lee, J.E., Goretti, D., Neumann, M., et al. A gibberellin methyltransferase modulates the timing of floral transition at the *Arabidopsis* shoot meristem. In: Physiol Plantarum, 2020, vol. 170, 474-487.
- Wang, Y.H., Irving, H.R. Developing a model of plant hormone interactions. In: Plant Signal Behav, 2011, vol. 6(4), 494-500.
- Hirano, K., Aya, K., Hobo, T., et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. In: Plant Cell Physiol, 2008, vol. 49, 1429-1450.
- Andrew, R.G., Plackett, A.R.G., Wilson, Z.A. Gibberellins and Plant Reproduction. Annual Plant Reviews book series online, vol 49, 2017.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., et al. Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. In: The Plant Cell, 2006, vol. 18, 3399-3414.
- Davière, J.M., Achard, P. Gibberellin signaling in plants. Development, 2013, vol. 140, 1147-1151.
- Chen, L., Liu, Y.G. Male sterility and fertility restoration in crops. In: Annual review of Plant Biology, 2014, nr. 65, 579-606.
- Baghali, Z., Majd, A., Chehregani, A., Pourpak, Z. Cytotoxic effect of benzo(a)pyrene on development and protein pattern of sunflower pollen grains. In: Toxicological & Environmental Chemistry, 2011, vol. 93(4), 665-677.
- Tripathi, S.M., Mani, S. Ethrel Induced Male Sterility in *Helianthus Annuus* L. In: Int. J. Mendel, 2010, vol. 24(3-4), 131-132.
- Sharma, K.D., Nayyar, H. Regulatory Networks in Pollen Development under Cold Stress. In: Front. Plant Sci., 2016, vol. 7:402, 1-13.
- De Storme, N., Geelen, D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. In: Plant Cell Environ, 2014, vol. 37(1), 1-18.
- Balk, J., Leaver, C. J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. In: The Plant Cell, 2001, vol. 13, 1803-1818.
- Vianello, A., Zancani, M., Peresson, C. et al. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. In: Physiologia Plantarum, 2007, vol. 129, 242-252.
- Sabar, M., Gagliardi, D., Balk, J., Leaver, C., J. ORFB is a subunit of F1FO-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower. In: EMBO reports, 2003, vol. 4, 381-386.

23. Duca, M., Port, A., Midoni, A. ș.a. Moștenirea genelor Rf la diverse genotipuri de floarea-soarelui. În: Studia Universitatis. Științe ale Naturii, 2010, nr. 1, 5-9.
24. Port, A., Duca, M. Aspecte de semnalizare și expresie genică la plante. Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, Centrul Genetică Funcțională. Chișinău: S. n., Tipografia Foxtrot, 2020. 194 p.
25. Schneiter, A., Miller, J.F. Description of Sunflower Growth Stages. In: Crop Science, 1981, vol. 21, 901-903.
26. Duca, M., Port, A., Nechifor, V. Corelarea dimensiunii florilor tubulare și anterelor cu fazele microsporogenei și microgametogenezei la *Helianthus annuus* L. În: „Agricultura modernă – realizări și perspective” Materialele Simpozionului științific internațional. Lucrări științifice UASM. Chișinău, 2013, vol. 39, 59-63.
27. Duca, M., Nechifor, V., Port, A. Profilul citologic al diviziunilor meiotice la plantele de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă de gibereline. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2017, nr. 3(333), 106-114.
28. Arisha, S.H. Biotechnology procedures and experiments handbook. Infinity science press llc hingham. Massachusetts. New Delhi, India, 2007. 710 p.
29. Weakley, B. A beginner's handbook in biological transmission electron microscopy. Churchill Livingstone, 1981, second ed. 252 p.
30. 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(6), 745-759.
31. Smart, C., Moneger F., Leaver C.J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during another development in sunflower. In: The Plant Cell, 1994, vol. 6, 811-825.
32. Vrâncianu, A.V. Aspecte noi privind cultura floării-soarelui. Editura Agro-Silvică: București 1967a, 30-45.
33. Zetsche, K., Horn, R. Molecular analysis of cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Mitochondria. 1993, vol. 42, 411-422.
34. Makarenko, M., Kornienko, I., Azarin K., et al. Mitochondrial genomes organization in alloplasmic lines of sunflower (*Helianthus annuus*) with various types of cytoplasmic male sterility. In: PeerJ., 2018, nr. 6(e5266).
35. Horn, R., Hustedt, J.E., Horstmeyer, A., et al. The CMS-associated 16 kDa protein encoded by orfH522 in the PET<sub>1</sub> cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasms of sunflower. In: Plant Molecular Biology, 1996, nr. 30(3), 523-538.
36. 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)137-148.
37. Balk, J., Leaver, C.J. The PET<sub>1</sub> - CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. In: The Plant Cell, 2001, vol. 13, 1803-1818.
38. Nizampatnam, N.R., Doodhi, H., Narasimhan, Y.K. et al. Expression of sunflower cytoplasmic male sterility-associated open reading frame, *orfH522* induces male sterility in transgenic tobacco plants. In: Planta, 2009, nr. 229, 987-1001.
39. Nizampatnam, N.R., Kumar, V.D. Intron hairpin and transitive RNAi mediated silencing of *orfH522* transcripts restores male fertility in transgenic male sterile tobacco plants expressing *orfH522*. In: Plant Molecular Biology, 2011, nr. 76, 557-573.
40. Touzet, P., Meyer, E. Cytoplasmic male sterility and mitochondrial metabolism in plants. In: Mitochondrion, 2014, nr. 19, 166-171.
41. Goryunov, D.V., Anisimova, I.N. Gavrilova V.A., et al. Association mapping of fertility restorer gene for CMS PET<sub>1</sub> in sunflower. In: Agronomy, 2019, vol. 9(49), 1-11.
42. Polivanova, O.B., Sivolapova, A.B., Goryunov, D.V. et al. Structural diversity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) candidate Rf<sub>1</sub> loci based on gene-specific PCR. In: Research on Crops, 2021, vol. 22(1), 40-46.
43. Moneger, F., Smart, C., Leaver, C. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. In: The EMBO Journal, 1994, nr. 13(1), 8-17.
44. Duca, M., Port, A., Orozco-Cardenas, M., Lovat, C. Gibberellin-induced gene expression associated with cytoplasmic male sterility in Sunflower. In: Biotechnology & biotechnological equipment, 2008, nr. 22(2), 691-698.
45. Chhun T., Aya K., Asano K. et al. Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. In: The Plant Cell, 2007, vol. 19, 3876-3888.
46. Griffiths J., Murase K., Rieu I. et al. Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. In: The Plant Cell, 2006, 18, 3399-3414.
47. Duca, M., Port, A., Orozco-Cardenas, M. L., Lovatt, C. Mecanisme moleculare ale androsterilității ereditare și induse la floarea-soarelui. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2006, nr. 1, 86-93.
48. Duca, M., Port, A., Orozco-Cardenas, M., Lovatt, C. Transcript analyses for mitochondrial sterile type rearrangement in sunflower. In: Romanian Biotechnological Letters, 2008, vol. 13(3), 3701-3706.
49. Arrieta-Montiel, M.P., Shedge, V., Davila, J. et al. Diversity of the *Arabidopsis* mitochondrial genome occurs via nuclear controlled recombination activity. In: Genetics, 2009, vol. 183(4), 1261-1268.
50. Gagliardi, D., Binder, S. Expression of the plant mitochondrial genome. In: Plant mitochondria (editor Logan D.C.): Blackwell Publishing, 2007, 50-96.
51. Kmiec, B., Woloszyńska, M., Janska, H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. In: Current Genetics, 2006, vol. 50, 149-159.

**NOTĂ.** Cercetările au fost realizate în cadrul Subprogramului 011101 *Abordări genetice și biotehnologice de management al agroecosistemelor în condițiile schimbărilor climatice*, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării.