

MECANISME SPOROFITICE ȘI GAMETOFITICE DE RESTAURARE A FERTILITĂȚII

Andrei MIDONI

Catedra Biologie Vegetală

In this study we analyzed two mechanisms of restoring of fertility in sunflower *CMS-Rf* system. Pollen staining with 1% I-KI allows identifying the segregation of viable pollen, which help us to observe what kind of fertility system is (sporophytic or gametophytic).

Sistemul *ASC-Rf* este larg răspândit în natură și frecvent utilizat în crearea hibrizilor comerciali la diferite culturi agricole. Primul component al sistemului – androsterilitatea citoplasmatică (ASC) – înlătură posibilitatea autopolenizării, favorizând polenizarea încrucișată și obținerea unui grad înalt de heterozigoție, iar al doilea – genele Rf – contribuie la restabilirea fertilității și la obținerea unei producții înalte de semințe.

ASC este determinată de gene himere mitocondriale și se moștenește pe cale maternă [1], iar genele Rf sunt localizate în nucleu și se moștesc mendelian [2-5]. Modul de acțiune a alelelor în cadrul diverselor specii este diferit, ele pot prelua funcția anumitor gene mitocondriale ale căror mutații au dus la (ASC) sau în cazuri când produșii de expresie a noilor cadre de lectură mitocondriale sunt toxine, genele (*Rf*) sintetizează proteine antidot; uneori, genele restauratoare pot duce la expresia preferențială a plasmogenelor (prin mecanisme inhibitorii asupra genelor himerice mitocondriale sau plastidiale).

În 1972, L.I. Oriol [6] identifică la secară două categorii de hibrizi (*Rf/rf*): la prima se referă cei al căror polen era viabil 100%, iar în a doua categorie intrau indivizi cu doar 50% polen funcțional. Mai târziu, în 1984, E.I. Vahrușeva [7] relatează despre două posibilități de restaurare a fertilității la genotipurile de porumb: cele cu *ASC-S* conțineau polen viabil 100%, la care restaurarea se efectua în stadiul sporofitic, iar cele cu *ASC-M* prezentau doar 50% polen viabil, restaurarea acestora efectuându-se la stadiul de gametofit.

Generalizând cele expuse putem concluda că sistemele de restaurare a fertilității sunt de două tipuri: *sporofitice*, care restaurează fertilitatea în țesuturile sporofitice sau în alte țesuturi, înainte de meioză, și *gametofitice*, care restaurează fertilitatea după meioză, la nivelul microsporilor sau la nivelul grăuncioarelor de polen [8].

Material și metode

În studiu a fost luat polen (colectat dimineața în perioada de 8.07.2007-1.08.2007), la etapa când inflorescența în mare parte era matură (adică, prezenta 3 cercuri concentrice distincte după Smart C.J. [9] de la 11 genotipuri de floarea-soarelui ce includ 4 hibrizi de prima generație: Xenia F₁, Drofa F₁, Valentino F₁, S 254 F₁ și 7 linii fertile care pot fi considerate restauratoare de fertilitate: Xenia ♂, Drofa ♂, LC 4 ♂, LC Cium ♂, LC Raus ♂, LC 636 ♂, LC 7 ♂. Polenul a fost păstrat în frigiderul (SANYO MDF-192) la -80°C timp de 6 luni.

Modul de acțiune a genelor restauratoare a fost identificat în baza determinării viabilității polenului prin colorarea cu soluție de 1% I₂ în KI [10,11].

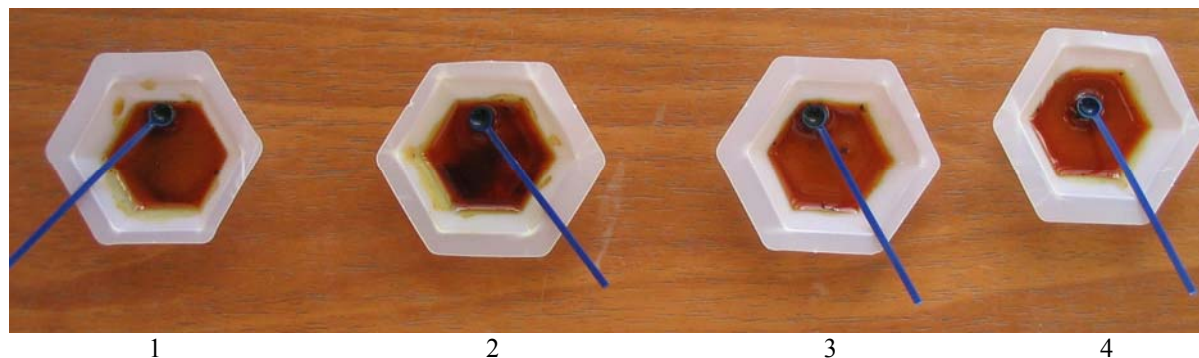


Fig.1. Colorarea polenului cu soluție de 1% I₂ în KI:
1 – Xenia F₁, 2 – Drofa F₁, 3 – LC 7 ♂, 4 – S 254.

În cadrul fiecărui genotip au fost analizate la microscopul fonic (BIOLAM LOMO) 15 probe cu un număr total de 500-1000 grăuncioare de polen pentru fiecare individ după jumătate de oră și după o oră de tratament și făcute fotografiile cu aparatul digital (CANON POWER SHOT A70). Astfel, granulele viabile ar trebui să fie colorate, deoarece iodul are tendința de a colora amidonul, pe când cele decedate nu vor prezenta colorație, fiindcă polenul avortat nu conține deloc sau conține foarte puțin amidon [6].

Rezultate și discuții

Ca scop, în lucrarea de față ne-am propus identificarea mecanismului de restaurare a fertilității (sporofitic sau gametofitic) la genotipurile studiate.

Ipoteza de lucru era determinată de faptul că dacă o plantă hibridă cu genele restauratoare în stare heterozigotă (*Rf/rf*) va produce 100% polen funcțional (adică produsul genei (*Rf*) își manifestă acțiunea asupra mitocondriilor din țesutul sporogen înainte de meioză și are loc repartizarea mitocondriilor din $2n$ în n , n , n și n (grăuncioare de polen) cu simptomul androsterilității deja supresat), mecanismul restaurării va fi sporofitic. Iar dacă planta hibridă (*Rf/rf*) va produce doar 50% polen funcțional (când sinteza produsului genei (*Rf*) are loc după meioză și el este capabil să neutralizeze simptomul androsterilității doar la nivelul sporului în care gena restauratoare se află în stare dominantă), sistemul de restaurare va fi cel gametofitic, cum este cazul porumbului cu citoplasmă de tip S restaurat cu ajutorul genelor (*Rf₃*) în stare heterozigotă ce produceau doar 50% polen viabil [12].

Analiza microscopică a polenului a permis să constatăm o identitate morfologică și structurală a sporilor de la toate genotipurile hibride și liniile fertile. Grăuncioarele de polen ale tuturor genotipurilor aveau formă sferoidală cu exina spiniferă puternic accentuată. După jumătate de oră toți sporii analizați, între 500 și 1000, de la toate genotipurile incluse în cercetare aveau o colorație brun-deschisă, cu excepția exinei. Și numai după o oră atât corpul sporifer, cât și exina spiniferă prezentau o colorație brun-închisă, ceea ce demonstrează faptul că polenul cercetat era în stare viabilă 100%.

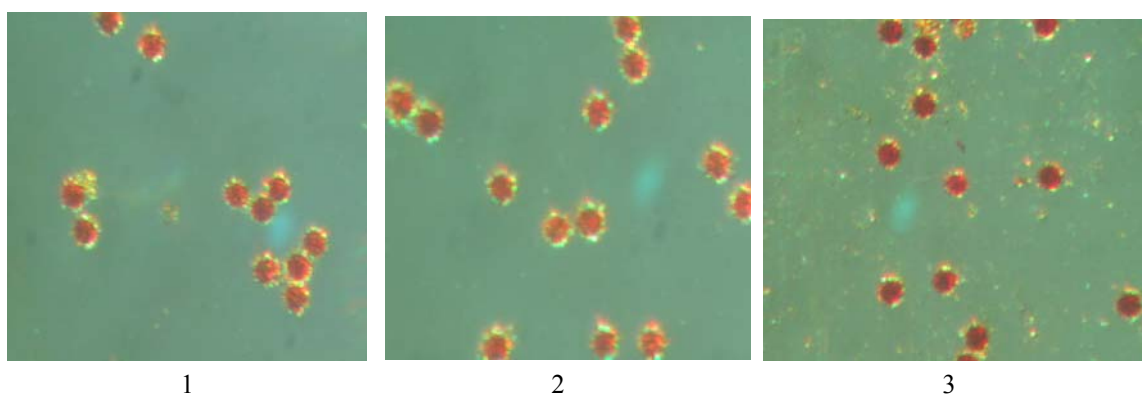


Fig.2. Microspori colorați după 0,5 ore cu sol. de 1% I₂ în KI (x120):
1 – Xenia F₁, 2 – Drofa F₁, 3 – Valentino F₁.

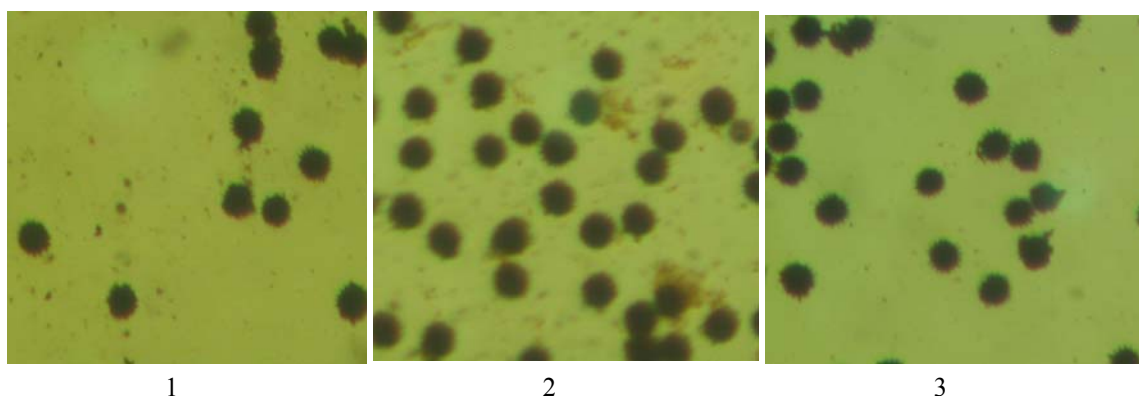


Fig.3. Microspori colorați după 1 oră cu sol. de 1% I₂ în KI (x120):
1 – Valentino F₁, 2 – LC 4*Rf*, 3 – S 254 F₁.

Tabel

Numărul de microspori analizați

Indexul genotipului	Microspori					
	analizați după 0,5 ore	colorați din numărul total după 0,5 ore	colorați din numărul total în % după 0,5 ore	analizați după 1 oră	colorați din numărul total după 1 oră	colorați din numărul total în % după 1 oră
Xenia F ₁	798	796	99,74	857	857	100
Drofa F ₁	973	970	99,69	636	636	100
Valentino F ₁	783	782	99,87	734	734	100
S 254 F ₁	904	903	99,88	683	683	100
Xenia ♂	479	479	100	753	753	100
Drofa ♂	874	874	100	843	843	100
LC 4 ♂	1056	1055	99,9	825	825	100
LC Cium ♂	746	746	100	646	646	100
LC Raus ♂	693	692	99,85	589	589	100
LC 637 ♂	938	938	100	953	953	100
LC 7 ♂	739	739	100	865	865	100

Concluzii

Întrucât tot polenul s-a dovedit viabil 100%, rezultă că modul de acțiune a genelor restauratoare este cel sporofitic (deci, ele supresează sindromul androsterilității înainte de meioză). Fiindcă la toți hibridii s-a observat același lucru și este cunoscut faptul că gena (*Rf*₂) este prezentă la majoritatea indivizilor, inclusiv la cei menținători ai androsterilității, și deoarece actualmente în literatură nu avem cazuri de cartare a genei (*Rf*₃), se poate de presupus că în acest caz avem de-a face cu o singură genă restauratoare la toate genotipurile analizate, adică (*Rf*₁).

Referințe:

- Duca M. Aspecte genetice și fiziologice ale sistemului ASC-Rf la (*Helianthus annuus* L.): Teză de doctor habilitat. - Chișinău, 1998, p.58-175.
- Kinman M.L. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. Proc.Fourth Int. Sunflower Conference. Memphis Tennessee, U.S.A. 1970, p.181-183.
- Dominquez E.N., Fick E.N. Fertility restoration of male sterile cytoplasmic in wild sunflower // Crop. Sci. - 1975. - Vol.15. - No5. - P.724-726.
- Reddy P.S., Raju B.T. Inheritance of fertility restoration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Euphytica. - 1977. - Vol.26. - P.409-412.
- Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-*Rf* у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Генетика. Сообщение III. Восстановление мужской фертильности у гибридов на основе ЦМС₁ - 1985. - №12. - С.1999-2004.
- Орёл Л.И. Пыльца ржи с цитоплазматической мужской стерильностью // Доклады ВАСХНИЛ. - 1972. - №24. - С.18-26.
- Вахрушева Э.И., Франковская М.Т. Наследование стерильности и фертильности в С-типе ЦМС у кукурузы // Доклады ВАСХНИЛ. - 1984. - №4. - С.5-7.
- Ispas I. Aspecte moleculare privind citoplasma androsterilă PET1 de la floarea-soareui. - Institutul de Genetică București, 2002, p.21.
- Smart C.J., Monager F., Leaver C.J. Cell-Specific Regulation of Gene Expression in Mitochondria during Anther Development in Sunflower // The Plant Cell. - 1994. - Vol.6. - P.811-825.
- Shinjyo C. Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) // Genetics. - 1969. - Vol.44. - No.3. - P.149-156.
- Jing R., Li X., Yi P., Zhu Z. Mapping fertility-restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers // Bot. Bull. Acad. Sin. - 2001. - Vol.42. - P.167-171.
- Kamps T.L., Chase C.D. RFLP mapping of the maize gametophytic restorer-of-fertility locus (*rf3*) and aberrant pollen transmission of the nonrestoring *rf3* allele // Theor. Appl. Genet. - 1997. - Vol.95. - P.525-531.

Prezentat la 08.02.2008