

# Master GAB an I

## Probleme avansate de genetica și biotehnologia plantelor

### CURS 6

Acest curs prezintă aspecte referitoare la:

1. Sterilitatea masculină la plante
2. Genetica formării seminței

#### Sterilitatea masculină la plante

Situația în care planta nu poate să producă polen viabil = sterilitate masculină.

Sterilitatea masculină (MS=Male Sterility) este un fenomen întâlnit la numeroase specii de plante cu flori hermafrodite, care poate fi utilizat de agricultori pentru a crea soiuri noi, hibride. Inițial, mutantele plantelor hermafrodite, cu sterilitate masculină erau recunoscute prin lipsa fructificării, dar actual, studiul genomului de la *A. thaliana* a permis identificarea unora dintre genele implicate în determinarea acestui fenomen. Cu toate că din totalul de 3.500 de gene care se exprimă în antere nu se cunoaște cu exactitate câte sunt implicate în determinarea sterilității, se știe că genotipurile sterile sunt homozigote recesive pentru genele MS = male sterility. Astfel, indivizii *ms/ms* sunt complet sterili, în timp ce *Ms/ms* și *Ms/Ms* produc 100% polen viabil.

Sterilitatea masculină poate avea mai multe tipuri de manifestări, în funcție de specie:

- absența staminelor sau apariția unor stamine cu malformații;
- incapacitatea plantei de a forma flori masculine (la plantele dioice) sau de a forma țesut microsporogen normal în antere;
- incapacitatea de a forma polen viabil, datorită unor anomalii ale diviziunii meiotice;
- tapetumul alcătuit din celule anormale, ceea ce sugerează că sterilitatea masculină este cauzată de mutații în gene importante pentru metabolismul tapetumului;

- anterele anormale, în sensul că eliberează prea devreme/prea târziu polenul.

Un tip particular de sterilitate se întâlnește la orz, la care dezvoltarea polenului și structura anterei sunt normale, dar grăunciorului îi lipsește apertura și nu poate forma tubul polinic.

Până în prezent au fost identificate două tipuri de sterilitate masculină: nucleară și citoplasmatică.

**Sterilitatea nucleară** – La *A. thaliana* s-a dovedit că genele implicate în sterilitatea masculină sunt MS1, Ms2 și MS5. Dintre acestea, MS1 codifică pentru un factor de transcriere, deci nu are un efect fenotipic, dar este o genă critică, care este implicată în formarea de polen viabil. Recent și la sorg au fost descoperite gene MS implicate în sterilitatea masculină nucleară (MS9). Mutantele *ms9/ms9* nu produc polen matur datorită unei dezvoltări anormale a microsporului.

**Sterilitatea masculină citoplasmatică (SMC)** este un tip particular de sterilitate masculină transmisă pe linie maternă, de acest tip de sterilitate fiind responsabile gene mitocondriale (în special) și/sau gene cloroplastidiene (la un număr restrâns de specii).

- acest tip de sterilitate a fost observat la peste 150 de specii diferite (ex. porumb, floarea soarelui, orez, petunii, fasole) și este cel mai folosit mecanism pentru obținerea artificială de plante hibride.

- în toate cazurile studiate s-au identificat proteine anormale în mitocondriile anterelor și s-a constatat că:

1. diferite tipuri de SMC sunt corelate cu diferite tipuri de proteine mitocondriale anormale. În general SMC afectează lanțul transferului de electroni, iar căile de determinare a sterilității sunt împărțite în mai multe categorii, în funcție de componenta care este afectată: 1) cea a NADH dehidrogenazi, 2) cea a citocrom oxidazei, 3) cea a ATP sintetazelor 4) alte tipuri de proteine.

**ex. 1.** SMC "texas type" de la porumb este determinată de gena T-urf13 care este o secvență himerică compusă dintr-o parte a genei *atp6*, regiunea 3'-flancatoare și regiunea codificatoare a genei *rrn26* (o genă ribozomală). Proteina rezultată, URF13 este localizată în membrana internă a mitocondriei;

**ex. 2.** SMC "polina" de la *Brassica napus* – este implicată gena *orf224* asociată cu gena *atp6*;

**ex. 3.** SMC la *Petunia hybrida* este determinată de locusul S-*pcf*, compus din capătul 5' al genei pentru subunitatea 9 a ATP-ului și 2 exoni ai genei *coxII*. Această genă (S-*pcf*) este co-transcrisă cu genele *nad3* și *rps12*.

2. deși mutațiile care determină apariția proteinelor mitocondriale anormale sunt prezente în toate mitocondriile, din toate țesuturile plantei respective, totuși doar la nivelul anterelor se observă un fenotip anormal. Nu se cunoaște cum proteina anormală afectează mitocondria din antere, dar dovedește că în timpul dezvoltării polenului este importantă funcționarea corectă a mitocondriilor.

S-a constatat că, dacă expresia proteinelor mitocondriale anormale e redusă, fertilitatea este restaurată. Acest lucru înseamnă că toate sistemele de sterilitate citoplasmatică masculină depind de gene "restauratoare" nucleare care supresează, prin mecanisme necunoscute, expresia proteinelor mitocondriale anormale.

De ex., la porumb, SCM de tip texas este determinată de gena URF13 (unrestor fertility 13) din mitocondrie. La indivizii *urf13urf13* se produce o aldehydă toxică pentru mitocondriile din celulele tapetumului. În același timp, în genomul nuclear există două gene restauratoare, RF1 și Rf2 (restore fertility). Gena Rf2 codifică pentru o aldehyd dehidrogenază care determină detoxifierea sau previne acumularea toxinei în mitocondrii. **Genele Rf nu au o expresie proprie decât în prezența citoplasmei sterile.** Restaurarea fertilității, în cazul unui genom mitocondrial care determină SCM, depinde deci de genomul nuclear (Tabel 1).

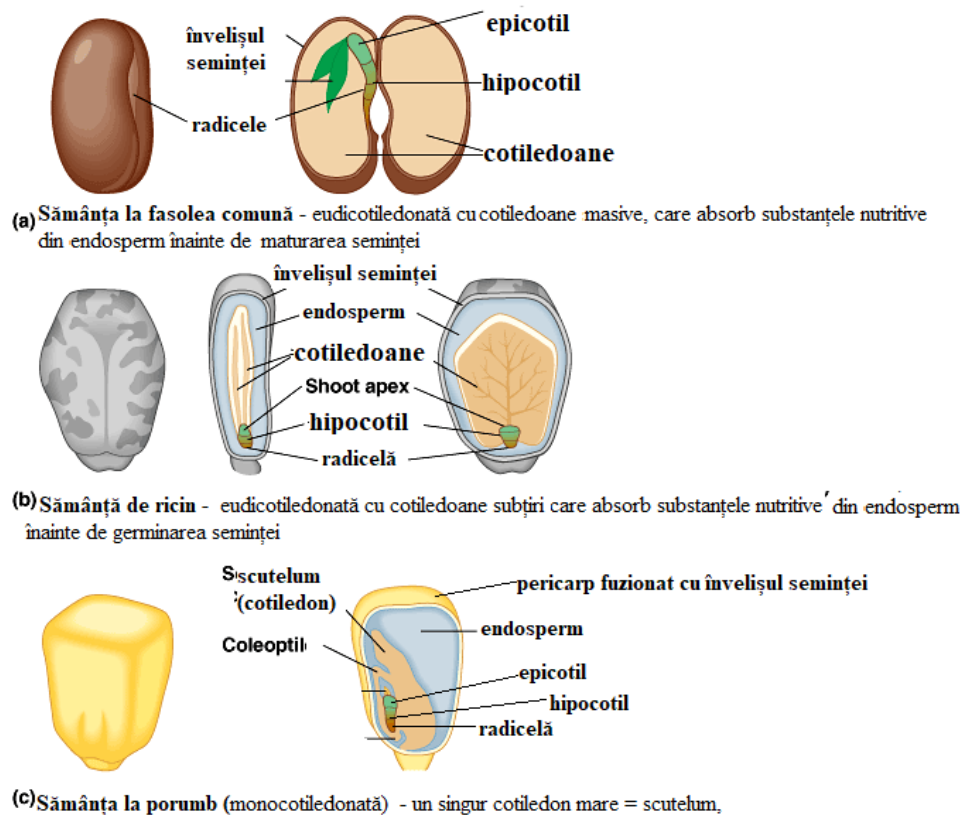
**Tabel 1. Relația dintre genotipul nuclear, genotipul mitocondrial și starea de citoplasmă sterilă/fertilă**

genotip nuclear	citoplasmă sterilă (datorită genotipului mitocondrial <i>urf13urf13</i> )
Rf1Rf1/Rf2Rf2	restaurare fertilitate
Rf1rf1/Rf2rf2	restaurare fertilitate
rf1rf1/Rf2	restaurare fertilitate
rf1rf1/rf2rf2	citoplasma rămâne sterilă

## Genetica formării seminței

Semințele la angiosperme se dezvoltă dintr-un ovul, de obicei după fecundare, care este precedată de polenizare. Fecundarea este dublă: una dintre cele două celule spermatice fecundează celula ou și se formează zigotul, iar cealaltă celulă spermatică fecundează celula centrală, rezultând o celulă triploidă, care va da naștere endospermului. După fecundarea dublă, fiecare ovul fecundat va forma o sămânță și fiecare ovar se va transforma într-un fruct.

La angiosperme sămânța este formată din trei tipuri de țesuturi: 1) embrionul, care cuprinde meristemele radiculare și ale tulpinii (acestea vor da naștere organelor vegetative ale plantei) și cotiledoanele, care sunt structuri ce acumulează substanțe de rezervă folosite în timpul germinării; 2) endospermul, țesut de depozitare care se poate resorbi în timpul dezvoltării seminței sau poate persista și la sămânța matură (de. ex. la cereale endospermul ocupă cea mai mare parte seminței) și 3) testa, adică învelișul seminței. (Figura 1).



**Figura 1. Structura seminței la mono și dicotiledonate**

Studiile genetice pentru identificarea genelor implicate în formarea seminței au fost efectuate pe specii diferite de plante: *A. thaliana* – pentru identificarea genelor implicate în dezvoltarea embrionului și cereale – pentru dezvoltarea endospermului.

Astfel, s-a arătat că pentru formarea completă a unei semințe este nevoie de aproximativ 19.000 de molecule diferite de ARNm, mare parte dintre acestea fiind prezente în plantă înainte de fertilizare. Acestea molecule se observă pe tot parcursul dezvoltării (de la zigot la sămânța matură) și pot fi identificate și în timpul germinării, precum și la plantele adulte.

La *A. thaliana* au fost identificate aproximativ 300 gene specifice pentru sămânță, dintre care 48 codifică pentru factori de transcriere. Aceste gene sunt activate după un model spațial și temporal precis.

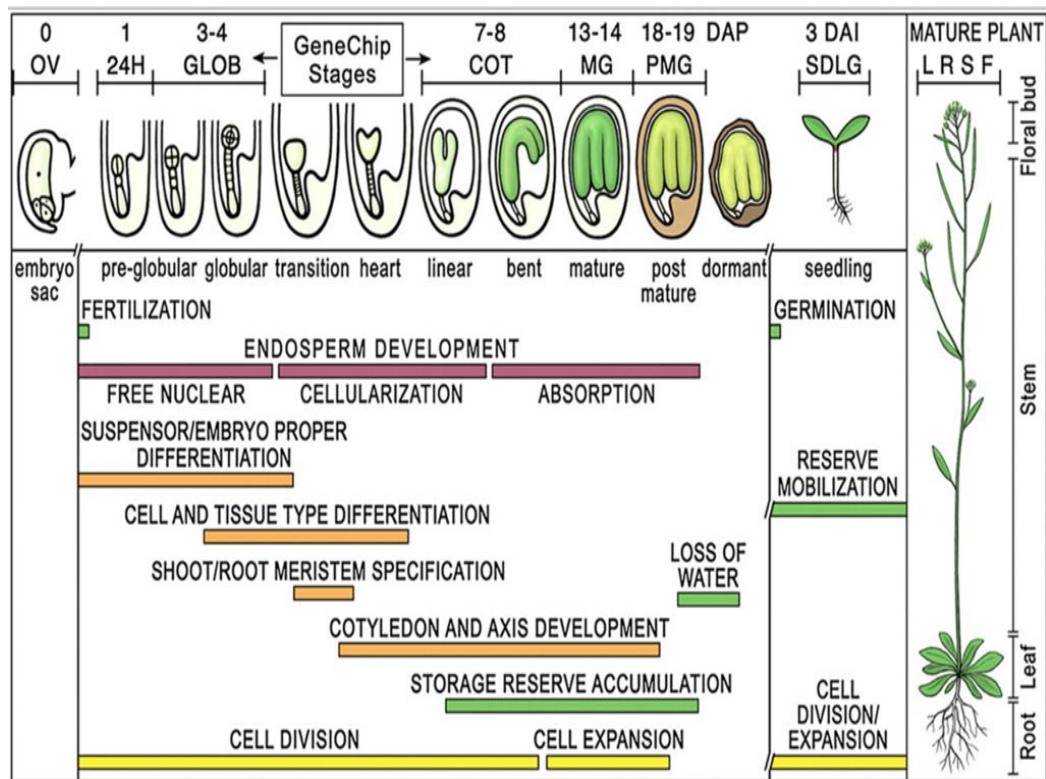
În procesul de dezvoltare a embrionului, cel mai mare număr de molecule ARNm diferite au fost identificate în faza GLOB (faza globulară, faza 3-4 de dezvoltare) și COT (fazele 7-8 de dezvoltare), când au loc cele mai importante evenimente de diferențiere și morfogeneză: în faza GLOB au fost identificate peste 100 specii de ARNm, iar în COT – 50; dintre acestea, 17, respectiv 9 sunt factori de transcriere (Figura 2).

Cei mai importanți factori de transcriere din faza GLOB sunt AUXIN RESPONS FACTOR (ARF 21), LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LBD 35), MINISEED 3 (MINI 3), LEAFY COTYLEDON (LEC), FUSCA (FUS), PICKLE (PKL).

ex. 1. gena LEAFY COTYLEDON (LEC) – codifică pentru un factor de transcriere care se leagă la caseta CCAAT din promotorul genelor esențiale pentru: specificarea identității cotiledoanelor, inițierea fazei de maturare a embrionului, supresarea germinării (= menținerea fazei de dormanță)

ex. 2 gena FUSCA (FUS) controlează embriogeneza târzie. Mutantele pentru LEC și FUS prezintă germinarea

ex. 3. gena PICKLE (PKL) codifică pentru un factor de remodelare a cromatinei, care reprezintă diferențierile caracteristice embriogenezei în fazele post-embrionare de dezvoltare ale plantei. precoce, incapacitatea de a sintetiza proteine și lipide de rezervă, cotiledoane sub formă de frunze.



**Figura 2. Etapele formării seminței și principalele tipuri de gene implicate**

Alt grup de gene foarte importante în dezvoltarea embrionului și endospermului sunt gene denumite generic FERTILIZATION INDEPENDENT GENES (FIS), ale căror mutante permit celulei centrale să se dividă și să formeze structuri embrionar-like, DAR ÎN LIPSA FERTILIZĂRII.

Una dintre cele mai interesante gene FIS este gena MEDEA (Maternal effect dominant embryonic arrest) care suferă imprinting genomic, mutațiile în această genă determinând moartea seminței, DAR doar dacă sunt moștenite pe linie maternă.

MEDEA este o genă selfish, adică codifică pentru o toxină și un antidot: o mamă cu o anumită alelă MEDEA va secreta o toxină care va face ca toate progeniturile ei să moară. DAR, dacă unele dintre aceste progenituri moștenesc alela MEDEA de la mamă, aceștia vor putea să secrete antidotul și vor supraviețui. Toxina este de fapt un microARN care blochează expresia unei gene esențiale pentru dezvoltarea embrionară.

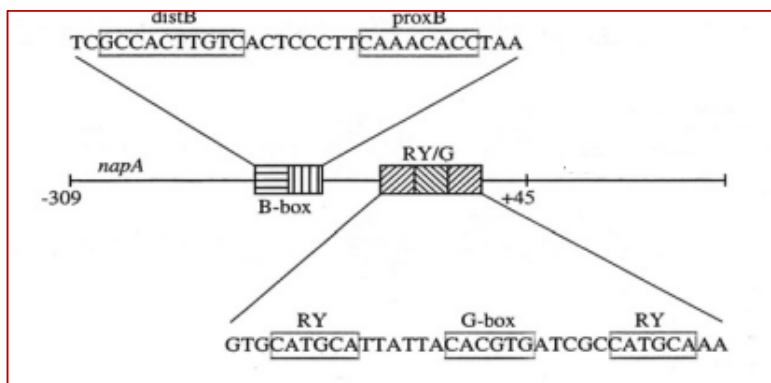
Endospermul reprezintă țesutul de depozit care, la unele specii este un țesut efemer, la altele persistă la sămânța matură, dar fie joacă un rol minor ca depozit de substanțe (ex. salată, tomate), fie este țesutul cel mai important din sămânță (cereale).

Un rol esențial în sinteza substanțelor de rezervă (carbohidrați, lipide, proteine) îl au genele care codifică pentru enzime implicate în biosinteză. Acestea sunt gene tisular specifice: pe măsură ce are loc maturarea seminței sunt activate anumite căi de biosinteză (astfel că substanțele de rezervă se produc în cantități și raporturi precise). Reglarea căilor de biosinteză este realizată de gene ce codifică pentru factori de transcriere specifici, astfel încât în fiecare stadiu de dezvoltare enzimele necesare sunt prezente în compartimentele celulare adecvate.

**ex.** gena WRINKLED 1 – de la *A. thaliana* – codifică pentru un factor de transcriere care reglează calea metabolică a lipidelor și carbohidraților

Sinteza proteinelor de rezervă este și ea un proces înalt reglat, transcrierea acestor gene fiind reglată temporal și spațial.

**ex.** genele SEED STORAGE PROTEINS (SSP) = denumirea generică a genelor care codifică pentru proteinele de rezervă din semințe. Reglarea acestor gene este înalt conservată, astfel încât aproape toate sunt reglate de promotori asemănători, foarte complecși. Astfel, la cotiledonate aceste gene sunt reglate de promotorul denumit *napA* (pt. că a fost identificat la *Brassica napus*) care prezintă o ”cutie” B, un element 2RY/G și o ”cutie” sau casetă GC. Mutații în oricare dintre aceste elemente determină reducerea substanțială a activității promotorului în semințe. La *A. thaliana* au fost identificate 4 gene omoloage cu genele pentru napină (genele controlate de promotorul *napA*), toate fiind controlate de promotori asemănători cu *napA*. (Figura 3).



**Figura 3. Structura promotorului *napA* care controlează genele SSP**