भारतीय वैज्ञानिक एवं औद्योगिक अनुसंधान पत्रिका
वर्ष 34 अंक (1) जून 2026 पृ. 7-21
DOI: 10.56042/bvaap.v34i1.32205

अंगूर (*Vitis vinifera L.*) के बीजरहित उत्परिवर्ती में पराग-बांझपन से संबंधित गैमेटोजेनेसिस तथा जीनोमिक संकेतों का तुलनात्मक अध्ययन

सिद्धि चव्हाण, सतीश फालके, सुजाता तेताली, विट्ठल टी बारवकर, रविन्द्र पाटिल एवं कुमार भारत भूषण

आघारकर अनुसंधान संस्थान, जी. जी. आगरकर रोड, पुणे- 411004 महाराष्ट्र (भारत)
[ई-मेलः rmpatil@aripune.org एवं bharatbhushan@aripune.org]

सारांशः ताजे तथा सूखे फल के रूप में उपभोग के लिए बीजरहित अंगूरों की मांग बहुत अधिक है। अंगूर (*Vitis vinifera L.*) में बीजरहितता दो विभिन्न तंत्रों द्वारा उत्पन्न होती है- स्टेनोस्पर्मोकार्पी तथा पार्थेनोकार्पी। हालांकि, अंगूर में बीज विकास के प्रमुख नियामकों तथा उनके लक्ष्य जीनों का अभी तक पर्याप्त रूप से वर्णन नहीं किया गया है। इस अध्ययन में बीज वाले अंगूर संकर ARI-516 तथा उसके बीजरहित उत्परिवर्ती का उपयोग करके अंगूर में बीजरहित लक्षण को नियंत्रित करने वाले आणविक तंत्रों को समझने का प्रयास किया गया। गैमेटोजेनेसिस के अध्ययन से यह पाया गया कि बीजरहित उत्परिवर्ती में परागकणों की संरचना असामान्य थी, उनकी जीवनक्षम्यता अत्यंत कम थी तथा उनमें अंकुरण की क्षमता पूर्णतः अनुपस्थित थी। इसके अतिरिक्त बीजरहित उत्परिवर्ती में मैक्रोगैमेटोफाइट का आकार ARI-516 की तुलना में उल्लेखनीय रूप से छोटा पाया गया। विकास की तीन अवस्थाओं-प्री-फ्लावरिंग अवस्था (E-L 15), एन्थेसिस अवस्था (E-L 23) तथा बेरी निर्माण अवस्था (E-L 31) पर ट्रांसक्रिप्टोमिक तुलना की गई, जिससे बीजरहित उत्परिवर्ती तथा ARI-516 में परिवर्तित विकासात्मक प्रक्रियाओं का अध्ययन किया जा सके। बीजरहित उत्परिवर्ती में कम अभिव्यक्त (downregulated) जीन मुख्यतः पुरुष गैमेटोफाइट विकास से संबंधित जैविक मार्गों में समृद्ध पाए गए, जो पराग-बांझपन का कारण हो सकते हैं। RNA-seq के परिणामों की पुष्टि qRT-PCR द्वारा की गई। इसके अतिरिक्त जीनोम अनुक्रमण डेटा का उपयोग करके बीजरहित उत्परिवर्ती में प्रेरित उत्परिवर्तनों की पहचान की गई, जिसमें पुरुष गैमेटोफाइट विकास से संबंधित जीनों में तीन होमोजाइगस तथा 25 हेटेरोजाइगस InDel पाए गए। RNA-seq तथा जीनोम अनुक्रमण के संयुक्त परिणाम यह संकेत देते हैं कि ARI-516 के बीजरहित उत्परिवर्ती में पराग निर्माण, परिपक्वता तथा अंकुरण से संबंधित विकासात्मक एवं शारीरिक प्रक्रियाओं में असामान्यता के कारण पार्थेनोकार्पिक बीजरहितता उत्पन्न होती है। इस अध्ययन में कोशिका विभाजन, गिबरेलिन जैवसंश्लेषण एवं सिग्नलिंग, कोशिका भित्ति विकास तथा पराग अंकुरण से संबंधित ट्रांसक्रिप्शन फैक्टरों और उनके लक्ष्य जीनों के दमन को दर्शाया गया है। यह अध्ययन जीनोमिक दृष्टिकोण का उपयोग करते हुए अंगूर में पार्थेनोकार्पिक पराग-बांझपन से संबंधित संभावित जीनों की पहचान की दिशा में एक महत्वपूर्ण प्रयास प्रस्तुत करता है।

मुख्य शब्दः अंगूर, पार्थेनोकार्पी, पराग विकास, बीजरहितता

Comparative study of gametogenesis and genomic signatures associated with pollen sterility in a seedless mutant of Grapevine (*Vitis vinifera L.*)

Siddhi Chavan, Satish Phalke, Sujata Tetali, Vitthal T Barvkar, Ravindra Patil & Kumar Bharat Bhushan

Agharkar Research Institute, G G Agarakr Road, Pune - 411004 Maharashtra (India)
[Email: rmpatil@aripune.org & bharatbhushan@aripune.org]

ABSTRACT

The demand for seedless grapes for consumption as fresh and dried fruits is very high. In grapevine (*Vitis vinifera L.*), seedlessness arises through two different mechanisms: stenospermocarpy and parthenocarpy. However, the major regulators of seed development and their target genes in grapes have not yet been fully characterized. In the present study, the seeded grape hybrid ARI-516 and its seedless mutant were used to investigate the molecular mechanisms controlling the seedless trait in grapes. The study of gametogenesis revealed that pollen grains in the seedless mutant

exhibited abnormal morphology, extremely low viability, and complete inability to germinate. In addition, the size of the macrogametophyte in the seedless mutant was significantly smaller than that observed in ARI-516. A transcriptomic comparison was performed at three developmental stages: pre-flowering (E-L 15), anthesis (E-L 23), and berry set (E-L 31), to examine altered developmental processes in the seedless mutant and ARI-516. The downregulated genes in the seedless mutant were mainly enriched in biological pathways related to male gametophyte development, which may lead to pollen sterility. The RNA-seq results were further validated by qRT-PCR. Additionally, genome sequencing data were used to identify induced mutations in the seedless mutant, revealing three homozygous and 25 heterozygous InDels in genes associated with male gametophyte development. The combined results of RNA-seq and genome sequencing suggest that parthenocarpic seedlessness in the ARI-516 seedless mutant arises from abnormalities in developmental and physiological processes involved in pollen formation, maturation, and germination. The study also demonstrated the downregulation of transcription factors and their target genes associated with cell division, gibberellin biosynthesis and signalling, cell wall development, and pollen germination. Overall, this research represents an important effort to identify candidate genes associated with parthenocarpic pollen sterility in grapes using a genomic approach.

Keywords: Vitis vinifera, Parthenocarpy, Pollen Development, Seedlessness

प्रस्तावना

अंगूर विश्व की प्रमुख बागवानी फसलों में से एक है। वर्ष 2021 में विश्व भर में लगभग 7.3 मिलियन हेक्टेयर क्षेत्र से लगभग 84.8 मिलियन टन अंगूर का उत्पादन हुआ। उत्पादित अंगूर का लगभग 55% भाग विभिन्न औद्योगिक उत्पादों-जैसे वाइन और जूस-के निर्माण में उपयोग किया जाता है, जबकि लगभग 44% भाग ताजे या सूखे अंगूर के रूप में उपभोग किया जाता है। उपभोक्ता आमतौर पर ऐसे अंगूरों को पसंद करते हैं जिनमें बीज न हों, जिनकी त्वचा पतली हो तथा जिनका गूदा कुरकुरा और स्वाद मीठा हो[1,2]। पिछले दशक में टेबल अंगूर के वैश्विक उत्पादन में निरंतर वृद्धि देखी गई है, जो वर्तमान में लगभग 27 मिलियन टन तक पहुँच चुका है। यह वृद्धि मुख्यतः ताजे और सूखे दोनों रूपों में बीजरहित अंगूरों की बढ़ती मांग के कारण हुई है। इसलिए उच्च उत्पादकता तथा बेहतर गुणवत्ता वाले बीजरहित अंगूरों का विकास अंगूर सुधार कार्यक्रमों का प्रमुख उद्देश्य बन गया है[3]। अंगूर में बीजरहितता मुख्यतः दो तंत्रों के माध्यम से उत्पन्न होती हैः

(1) **स्टेनोस्पर्मोकार्पी (Stenospermocarpy)**: इस प्रक्रिया में परागण और निषेचन सामान्य रूप से होते हैं, किंतु निषेचन के कुछ सप्ताह बाद बीज का विकास रुक जाता है और केवल बीज के अवशेष रह जाते हैं। इस स्थिति में बेरी का आकार भी अपेक्षाकृत छोटा हो जाता है[4]। स्टेनोस्पर्मोकार्पिक बीजरहित फल अंगूर की प्रसिद्ध किस्म सुल्तानिना (थॉम्पसन सीडलेस) में पाए जाते हैं[4,5]।

(2) **पार्थेनोकार्पी (Parthenocarpy)**: इस प्रक्रिया में फल का विकास निषेचन के बिना ही अंडाशय से हो जाता है। यह सामान्यतः नर अथवा मादा गैमेट की बांझता के कारण होता है और इसके परिणामस्वरूप छोटे आकार के बीजरहित फल उत्पन्न होते हैं।

बीजरहित अंगूरों के आनुवंशिक आधार पर कई अध्ययन किए गए हैं। उदाहरण के लिए हाल के एक अध्ययन में अंगूर की Rizamat किस्म में नए संभावित जीन Vitvi01g00455, Vitvi08g01528 और Vitvi18g01237 की पहचान की गई, जो बीजरहितता से जुड़े रिसेसिव लोकी से संबंधित पाए गए[7]। तुलनात्मक जीनोमिक्स तथा जीनोम-वाइड एसोसिएशन अध्ययन (GWAS) के माध्यम से VvSUS2 तथा VvTT16 जैसे जीनों की भी पहचान की गई है, जो बीजरहित अंगूर किस्मों से जुड़े पाए गए हैं[8]। इसके विपरीत पार्थेनोकार्पिक बीजरहितता के आनुवंशिक आधार पर अपेक्षाकृत कम अध्ययन उपलब्ध हैं। अंगूर के Corinto bianco नामक सोमैटिक वैरिएंट पर किए गए अध्ययन में यह सुझाव दिया गया कि पार्थेनोकार्पी संभवतः परिपक्व मैक्रोगैमेटोफाइट की अनुपस्थिति के कारण उत्पन्न होती है, जो मीओसिस के अवरोध तथा निषेचन-स्वतंत्र फल विकास से संबंधित है[6]। इसी प्रकार कुछ अन्य फसलों जैसे साइट्रस तथा टमाटर के उत्परिवर्तियों में भी यह पाया गया कि पराग-बांझपन पार्थेनोकार्पिक बीजरहितता का प्रमुख कारण हो सकता है[9,10]। इसके अतिरिक्त सेब, शिमला मिर्च, चेरी, खीरा तथा टमाटर जैसी फसलों में पार्थेनोकार्पी से संबंधित आनुवंशिक कारकों की पहचान की जा चुकी है[9,11-15]। इन अध्ययनों से यह स्पष्ट होता है कि बीजरहित उत्परिवर्तियों का आणविक स्तर पर अध्ययन बीजरहितता के लिए उत्तरदायी तंत्र को समझने में अत्यंत महत्वपूर्ण है।

इसी संदर्भ में वर्तमान अध्ययन का उद्देश्य अंगूर में बीजरहित लक्षण के अंतर्निहित तंत्र की जांच करना था। इस अध्ययन में आघारकर अनुसंधान संस्थान, पुणे में विकसित बीज वाले अंगूर संकर ARI-516 से प्राप्त एक प्रेरित बीजरहित उत्परिवर्ती का उपयोग किया गया। इस उत्परिवर्ती की आकृति ARI-516 के समान है, किंतु इसमें बीज अनुपस्थित होते हैं तथा गुच्छों और बेरियों का आकार अपेक्षाकृत छोटा होता है।

2. सामग्री एवं विधियाँ (Materials and Methods)

2.1 पौध सामग्री

अध्ययन के लिए ARI 516 किस्म की आठ वर्ष आयु की अंगूर की बेलों का चयन किया गया। ये बेलें अघारकर अनुसंधान संस्थान (ARI), पुणे के प्रायोगिक खेत में 18°31' अक्षांश तथा 73°55' पू. देशांतर पर स्थापित हैं। बेलों को पंक्तियों के बीच 2.4 मीटर तथा पौधों के बीच 1.5 मीटर की दूरी पर लगाया गया था। ARI 516

एक उच्च उत्पादकता वाली, रोग-प्रतिरोधी तथा बहुउद्देशीय अंगूर की किस्म है, जिसके फलों का रंग गहरा बैंगनी-काला होता है तथा इनमें विशिष्ट मस्की (सुगंधित) स्वाद पाया जाता है। इस किस्म का विकास Beauty Seedless (*Vitis vinifera*) × Catawba (*Vitis vinifera × Vitis labrusca*) के संकरण से अघारकर अनुसंधान संस्थान में किया गया है। ARI 516 का एक बीजरहित उत्परिवर्ती (seedless mutant) वर्ष 2012-2013 में किए गए गामा विकिरण-आधारित उत्परिवर्तन (gamma irradiation mutagenesis) प्रयोगों के दौरान पृथक किया गया था[33]। बीजरहित उत्परिवर्ती तथा इसके मूल अभिभावक ARI 516 की आनुवंशिक समानता को उपलब्ध डेटाबेस में वर्णित 25 SSR मार्करों (VVMD, SCU, VMC, VVS, UCH) के माध्यम से एलीलिक विविधता की जाँच करके पुष्टि की गई। नमूनों के संग्रह से पूर्व बीजरहित लक्षण (seedless phenotype) की पुष्टि लगातार दो वर्षों तक की गई। युग्मकजनन (gametogenesis) के अध्ययन तथा अंगूर के गुच्छों के नमूने तीन लगातार ऋतुओं-2020-2021, 2021-2022 और 2022-2023 के दौरान एकत्रित किए गए।

2.1 रूपात्मक एवं विश्लेषण

रूपात्मक एवं जैवरासायनिक विश्लेषण के लिए पूर्णतः पके अंगूर के गुच्छों से ARI 516 और उसके बीजरहित उत्परिवर्ती में 100 बेरी का भार, बेरी की लंबाई और चौड़ाई मापी गई। कुल घुलनशील ठोस (TSS) का निर्धारण रिफ्रैक्टोमीटर द्वारा तथा टाइट्रेटेबल अम्लता का निर्धारण 0.1 N NaOH के साथ टाइट्रेशन द्वारा किया गया। सूक्ष्म-युग्मकजनन विश्लेषण के लिए परागकणों को E-L 23 (पुष्पन अवस्था) पर एकत्रित किया गया। पराग जीवितता का परीक्षण संशोधित Alexander's staining विधि से तथा पराग अंकुरण का परीक्षण मानक अंकुरण माध्यम में किया गया। पराग संरचना का अध्ययन SEM द्वारा किया गया। परागकोष संरचना के अध्ययन हेतु E-L 15 अवस्था के नमूनों को FAA में स्थिर कर माइक्रोटोम खंडों का सूक्ष्मदर्शीय अवलोकन किया गया। महा-युग्मकजनन विश्लेषण के लिए पुष्प कलियों को E-L 15 और E-L 23 अवस्थाओं पर एकत्रित कर FAA में स्थिर किया गया तथा ऊतक खंडों को सैफ्रेनिन और फास्ट ग्रीन से धब्बाकृत कर सूक्ष्मदर्शी से अध्ययन किया गया। फेनोटाइपिक आँकड़ों का विश्लेषण one-way ANOVA और t-test द्वारा GraphPad Prism सॉफ्टवेयर से किया गया। RNA निष्कर्षण एवं RNA-seq के लिए पुष्प कलियाँ (E-L 15, E-L 23) तथा विकसित बेरी (E-L 31) से RNA निकाला गया। RNA-seq लाइब्रेरी तैयार कर Illumina HiSeq प्लेटफॉर्म पर अनुक्रमण किया गया। भिन्न जीन अभिव्यक्ति विश्लेषण DESeq2 द्वारा किया गया। चयनित जीनों की अभिव्यक्ति की पुष्टि qRT-PCR द्वारा की गई तथा Actin को संदर्भ जीन के रूप में उपयोग किया गया। संपूर्ण जीनोम अनुक्रमण हेतु ARI 516 और उसके बीजरहित उत्परिवर्ती का जीनोमिक DNA पृथक कर Illumina प्लेटफॉर्म पर अनुक्रमित किया गया। वेरिएंट विश्लेषण BCFtools और snpEff द्वारा किया गया तथा संभावित ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर बाइंडिंग साइट्स की पहचान PlantPAN डेटाबेस से की गई।

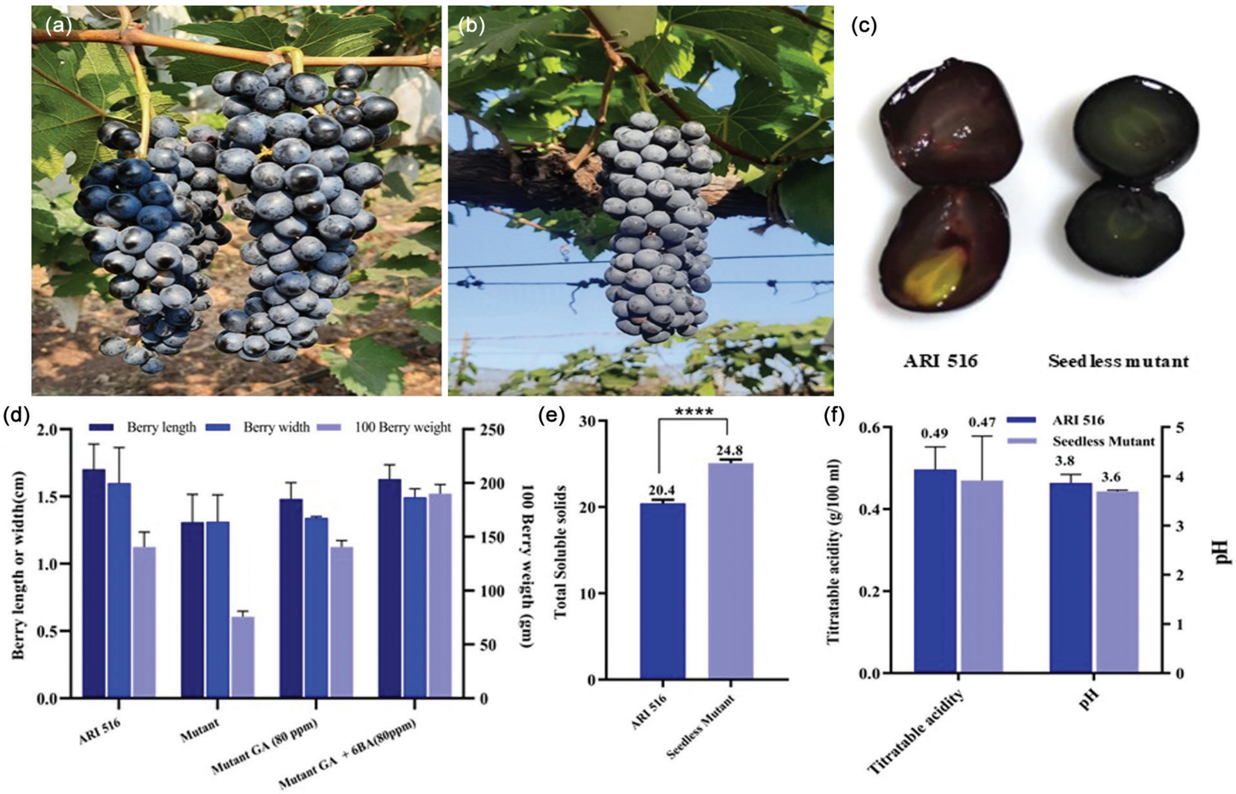
परिणाम

रूपात्मक एवं जैवरासायनिक विशेषताओं का तुलनात्मक विश्लेषण

अध्ययन में अंगूर की किस्म ARI 516 तथा इसके बीजरहित उत्परिवर्ती के बीच रूपात्मक और जैवरासायनिक विशेषताओं की तुलना की गई। अवलोकनों से स्पष्ट हुआ कि ARI 516 के सभी फलों में सामान्य रूप से विकसित बीज उपस्थित थे, जबकि इसके उत्परिवर्ती में पूर्णतः बीजरहित फल विकसित हुए। दोनों जीनोटाइपों के गुच्छों और फलों की संरचना में स्पष्ट अंतर दिखाई दिया (चित्र 1)। फल के आकार और भार से संबंधित विशेषताओं के विश्लेषण से यह ज्ञात हुआ कि बीजरहित उत्परिवर्ती में बेरी का आकार ARI 516 की तुलना में छोटा था। ARI 516 में 100 बेरी का औसत भार लगभग 147 ग्राम पाया गया, जबकि बीजरहित उत्परिवर्ती में यह लगभग 78 ग्राम था। इसी प्रकार बेरी की लंबाई और चौड़ाई भी बीजरहित उत्परिवर्ती में उल्लेखनीय रूप से कम पाई गई। इन सभी रूपात्मक मापदंडों में अंतर सांख्यिकीय रूप से महत्वपूर्ण पाया गया (चित्र 1D)। पौध वृद्धि नियामकों के उपयोग से बीजरहित उत्परिवर्ती में फल आकार में सुधार देखा गया। जब गुच्छों पर गिबरेलिक अम्ल (GA_3) तथा GA_3 के साथ 6-बेंजाइलएडेनिन (6BA) का उपचार किया गया, तब बेरी की चौड़ाई और 100-बेरी भार में उल्लेखनीय वृद्धि दर्ज की गई। यह परिणाम संकेत करता है कि उपयुक्त हार्मोन उपचार द्वारा बीजरहित अंगूर की व्यावसायिक गुणवत्ता को बेहतर बनाया जा सकता है (चित्र 1D)। जैवरासायनिक विश्लेषण से यह भी ज्ञात हुआ कि बीजरहित उत्परिवर्ती के फलों में कुल घुलनशील ठोस (TSS) की मात्रा अपेक्षाकृत अधिक थी। बीजरहित उत्परिवर्ती में TSS लगभग 24.8° ब्रिक्स दर्ज किया गया, जबकि ARI 516 में यह लगभग 20.4° ब्रिक्स था (चित्र 1E)। दूसरी ओर टाइट्रेटेबल अम्लता तथा pH में दोनों जीनोटाइपों के बीच कोई महत्वपूर्ण अंतर नहीं पाया गया (चित्र 1F)।

सूक्ष्म-युग्मकजनन और पराग विकास का विश्लेषण

पराग विकास के अध्ययन से बीजरहितता से संबंधित महत्वपूर्ण अंतर सामने आए। Alexander staining विधि द्वारा पराग जीवितता के परीक्षण से यह पाया गया कि ARI 516 में लगभग 69.93% परागकण जीवित और कार्यात्मक थे, जबकि बीजरहित उत्परिवर्ती में यह केवल लगभग 13.07% था। इस प्रकार बीजरहित उत्परिवर्ती में स्पष्ट रूप से पराग बाँझपन पाया गया (चित्र 2A-C)। परागकणों की संरचना का सूक्ष्मदर्शीय विश्लेषण करने पर यह पाया गया कि ARI 516 के परागकण सामान्य त्रिकोल्पेट संरचना वाले थे, जिनमें स्पष्ट



चित्र 1 — ARI 516 और बीजरहित उत्परिवर्ती के गुच्छों और बेरी का रूपात्मक अंतर

छिद्र और सममित आकृति दिखाई देती थी। इसके विपरीत बीजरहित उत्परिवर्ती में परागकणों का आकार और संरचना अत्यधिक विकृत पाई गई। कई परागकणों में द्विकोल्पोरित संरचना, सिकुड़न और अनियमित आकृति देखी गई। इन संरचनात्मक असामान्यताओं की पुष्टि स्कैनिंग इलेक्ट्रॉन माइक्रोस्कोपी (SEM) विश्लेषण द्वारा भी हुई (चित्र 2D-F)। पराग अंकुरण परीक्षणों से यह स्पष्ट हुआ कि ARI 516 में लगभग 49.85% परागकण अंकुरित हुए और उनमें स्पष्ट परागनलिका का विकास हुआ। इसके विपरीत बीजरहित उत्परिवर्ती में केवल लगभग 3.48% परागकण ही अंकुरित हो सके। अधिकांश परागकण अंकुरण में असफल रहे, जिससे यह स्पष्ट होता है कि बीजरहित उत्परिवर्ती में परागकण न केवल संरचनात्मक रूप से असामान्य हैं बल्कि कार्यात्मक रूप से भी निष्क्रिय हैं (चित्र 2G-I)।

महा-युग्मकजनन (Megagametogenesis) का विश्लेषण

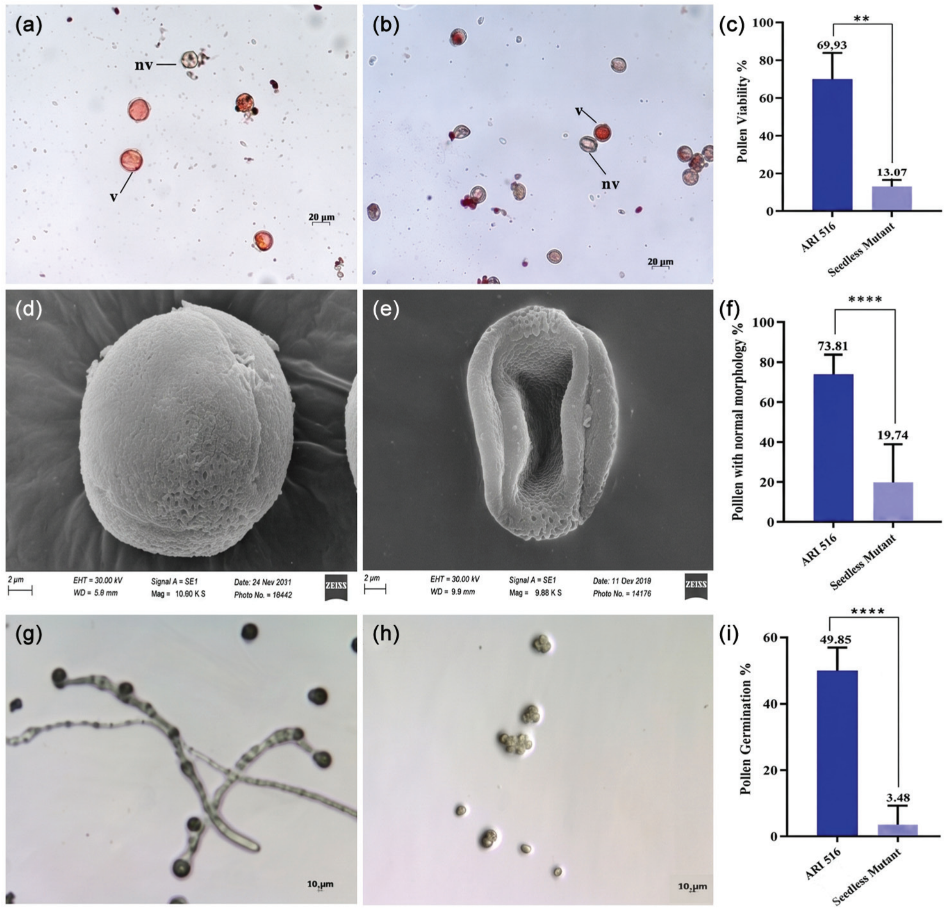
मादा प्रजनन संरचनाओं के अध्ययन से भी महत्वपूर्ण अंतर सामने आए। अंडाशय और बीजांड की संरचना का सूक्ष्मदर्शीय विश्लेषण करने पर यह पाया गया कि बीजरहित उत्परिवर्ती में बीजांड का आकार ARI 516 की तुलना में काफी छोटा था। बीजांड की लंबाई और चौड़ाई दोनों में उल्लेखनीय कमी देखी गई, जो सांख्यिकीय रूप से अत्यधिक महत्वपूर्ण पाई गई। अंडाशय के अनुदैर्ध्य खंडों के सूक्ष्मदर्शीय चित्रों में भी यह अंतर स्पष्ट दिखाई देता है (चित्र 3)। इन परिणामों से संकेत मिलता है कि बीजरहित उत्परिवर्ती में केवल नर युग्मक विकास ही नहीं, बल्कि मादा प्रजनन संरचनाओं का विकास भी प्रभावित हुआ है।

ट्रांसक्रिप्टोमिक विश्लेषण और जीन अभिव्यक्ति

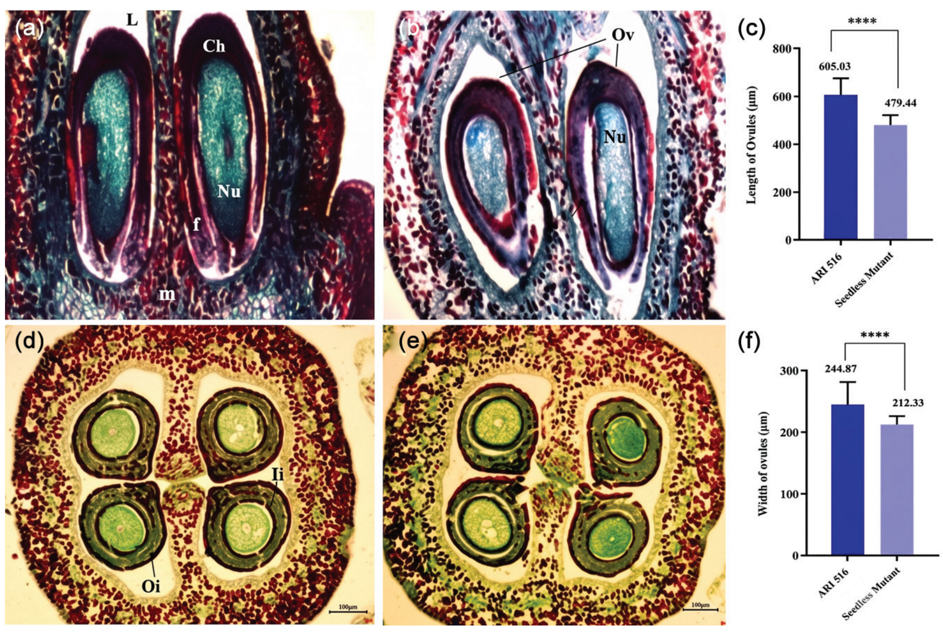
बीजरहितता के आणविक आधार को समझने के लिए RNA-seq आधारित ट्रांसक्रिप्टोमिक विश्लेषण किया गया। इस अध्ययन में दो जीनोटाइपों तथा तीन विकास अवस्थाओं से कुल 18 RNA-seq लाइब्रेरी तैयार की गईं। प्रत्येक लाइब्रेरी से उच्च गुणवत्ता वाले अनुक्रम प्राप्त हुए। Principal Component Analysis (PCA) ने विभिन्न नमूनों के बीच स्पष्ट विभेदन प्रदर्शित किया और जैविक प्रतिकृतियों के बीच उच्च संगति को दर्शाया (चित्र 4A)। जीन अभिव्यक्ति विश्लेषण से कुल 4354 भिन्न अभिव्यक्त जीनों (DEGs) की पहचान की गई। इनमें 1495 जीनों की अभिव्यक्ति बढ़ी हुई (upregulated) तथा 2859 जीनों की अभिव्यक्ति कम (downregulated) पाई गई। विभिन्न विकास अवस्थाओं के बीच क्म्ळे का वितरण भी भिन्न पाया गया (चित्र 4B-D)।

जीन कार्यात्मक विश्लेषण और जैविक मार्ग

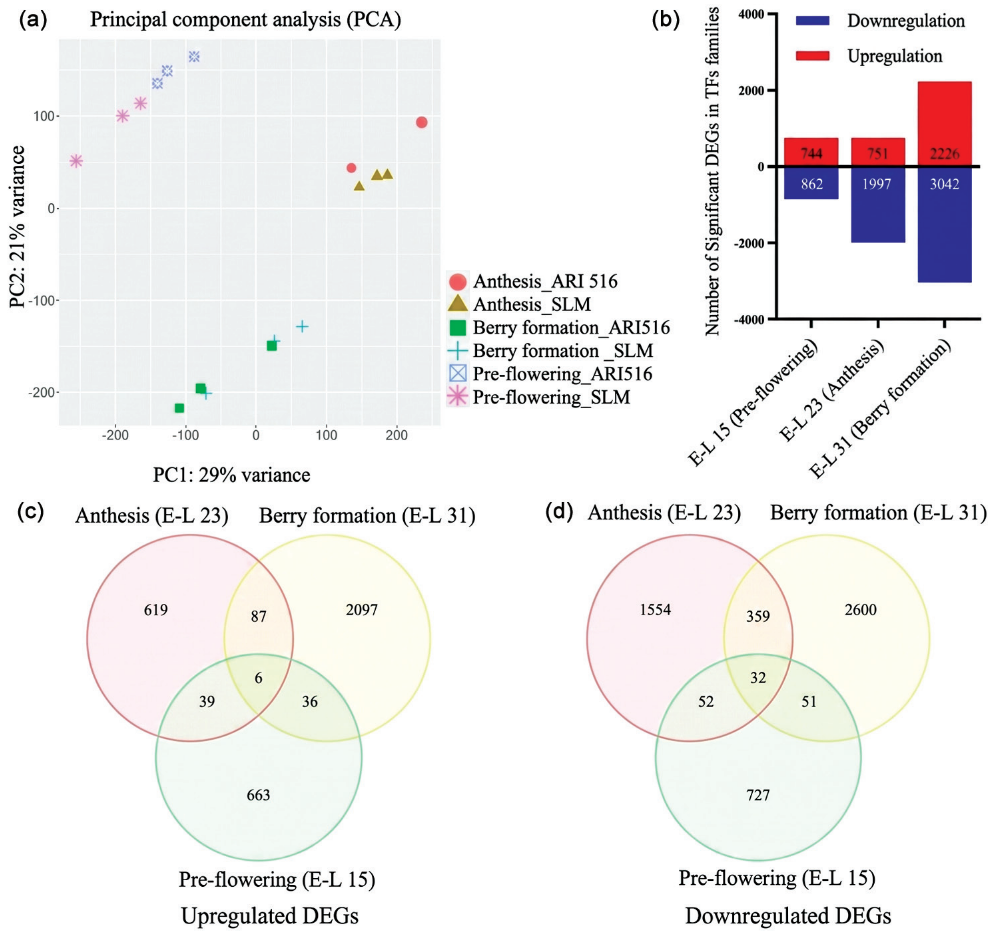
Gene Ontology (GO) विश्लेषण से यह स्पष्ट हुआ कि पह. चाने गए कई DEGs जैविक प्रक्रियाओं जैसे पराग विकास, कोशिका



चित्र 2 — A-C: Alexander staining द्वारा पराग जीवितता विश्लेषण, D-F: SEM द्वारा परागकण संरचना, G-I: पराग अंकुरण परीक्षण



चित्र 3 — अंडाशय और बीजांड का हिस्टोलॉजिकल अध्ययन



चित्र 4 — RNA-seq डेटा का PCA विश्लेषण, B-D: Differentially Expressed Genes (DEGs) का वितरण

भित्ति निर्माण, कोशिका विभाजन और हार्मोन संकेत संचरण से संबंधित हैं। GO वर्गीकरण में इन जीनों को विभिन्न जैविक प्रक्रियाओं, आणविक कार्यों तथा कोशिकीय घटकों के अंतर्गत वर्गीकृत किया गया (चित्र 5)। Heatmap विश्लेषण ने यह दर्शाया कि कई जीनों की अभिव्यक्ति बीजरहित उत्परिवर्ती में उल्लेखनीय रूप से कम थी, विशेष रूप से वे जीन जो प्रजनन विकास और पराग निर्माण से संबंधित हैं। Pathway विश्लेषण से यह भी संकेत मिला कि गिबरेलिन जैवसंश्लेषण तथा अन्य हार्मोन-संबंधित मार्गों में भी परिवर्तन हुआ है, जो प्रजनन विकास को प्रभावित कर सकते हैं (चित्र 6)।

RNA-seq परिणामों का qRT-PCR प्रमाणीकरण

RNA-seq विश्लेषण की पुष्टि के लिए चयनित जीनों का qRT-PCR द्वारा विश्लेषण किया गया। कुल 25 जीनों की अभिव्यक्ति का परीक्षण किया गया और प्राप्त परिणाम RNA-seq डेटा के अनुरूप पाए गए। यह परिणाम जीन अभिव्यक्ति विश्लेषण की विश्वसनीयता को दर्शाते हैं (चित्र 7)।

जीनोम अनुक्रमण और InDel उत्परिवर्तन

संपूर्ण जीनोम अनुक्रमण से बीजरहित उत्परिवर्ती में कई InDel उत्परिवर्तनों की पहचान हुई। विश्लेषण में तीन समजात तथा पच्चीस विषमजात InDel पाए गए, जिनका संबंध प्रजनन विकास से संबंधित जीनों से था। इन उत्परिवर्तनों का संभावित प्रभाव ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर बाइंडिंग साइट्स पर भी देखा गया (सारणी 1)। इन परिणामों से संकेत मिलता है कि जीनोमिक स्तर पर हुए ये परिवर्तन जीन अभिव्यक्ति को प्रभावित कर सकते हैं और अंततः पराग विकास तथा बीज निर्माण की प्रक्रियाओं में बाधा उत्पन्न कर सकते हैं।

चर्चा

अंगूर में बीजरहित फलों की मांग वैश्विक स्तर पर निरंतर बढ़ रही है, विशेष रूप से टेबल ग्रेप्स के रूप में उपभोग के लिए। इस कारण नई बीजरहित किस्मों का विकास अंगूर सुधार कार्यक्रमों का एक प्रमुख लक्ष्य बन गया है। बीजरहित अंगूर की किस्में फल विकास तथा बीजरहितता के जैविक और आनुवंशिक तंत्र को समझने के लिए

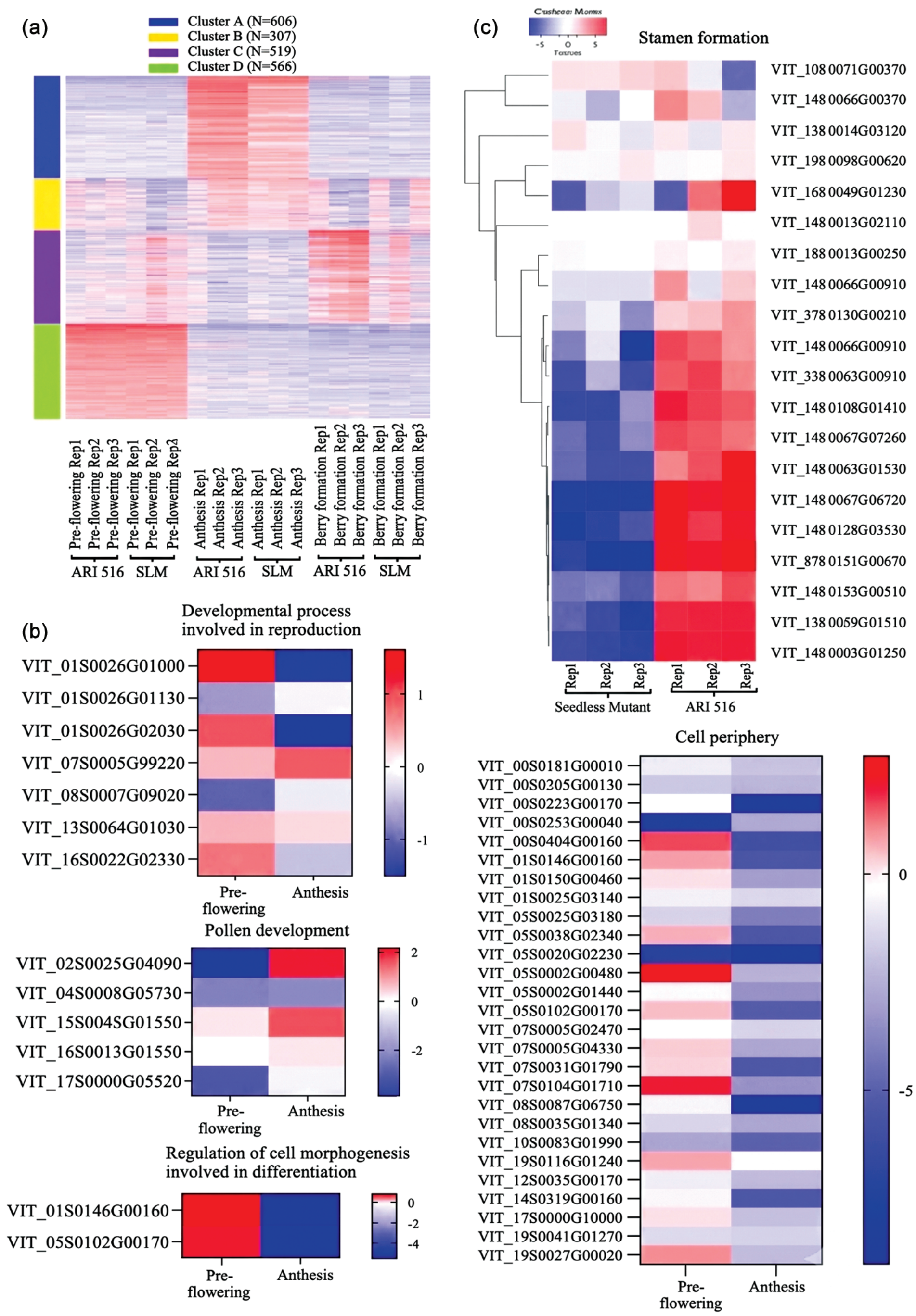
	SLM_Upregulated						SLM_Downregulated				
	E-L 15 (PF)		E-L 23 (AN)		E-L 31 (BF)		E-L 15 (PF)	E-L 23 (AN)		E-L 31 (BF)	
	n	Pathways	n	Pathways	n	Pathways		n	Pathways	n	Pathways
Molecular	6 8 7 8 5 7 3 12	• Ribosome • Ribonucleoprote i n complex • Structural molecule activity • Peptide metabolic process • Cytosol ic ribosome • Peptide biosyntheti c process • Cytosolic small ribosomal subunit • Protein-containing complex	4 5	• Plastid nucleoid • Chlorapias nnucleoid	14 15 19 18	• DNA-binding transcription factor activity • Transcription regulator activity • Regulation of transcription, DNA-templated • Molecula r function regulator	No significant categories			10	• Supramolecalar polymer
Metabolic			2 2	• Superoxide dismutase activity • Carbon fixation	2 4 22	• L-proline biosynthetic process • Bata-1,4-mannosyltnarafe rase activity • Heterocycl e biosynthetic process		4	• Xyloglucan xyloglucosyl transferase activity	40 28 33 5 10 12	• Metabolic pathways • Biosynthesis of secondary metabolites • Oxidation-reduction process • Fructose and mannose metabolism • Cellular polysaccharid e metabolic process • Cellular carbohydrat e metabolic process
Cellular	8	• Cytosol	16 8 6 2 5 4	• Chloroplast • Thyladost • Plastid stroma • Plastid chromosom e • Chloroplat thaylakaid • Plastid organization	25	• Cell periphary		27 2 5	• Cell periphery • Regulation of cell morphagenesis involved in differentiation • Cell growth	9 10 11 15 9	• Microtubula • Microtubul e cytoskeleten • Cytoskaleten • Cell cycle • Microtubule-based process

चित्र 5 — Gene Ontology (GO) classification

उपयुक्त मॉडल प्रदान करती हैं। वर्तमान अध्ययन में अंगूर की बीजयुक्त किस्म ARI 516 तथा उसके गामा विकिरण द्वारा प्राप्त बीजरहित उत्परिवर्ती का तुलनात्मक विश्लेषण किया गया, जिसमें गैमेट विकास, जीन अभिव्यक्ति तथा जीनोमिक परिवर्तनों का अध्ययन किया गया। अध्ययन के परिणामों से यह स्पष्ट हुआ कि बीजरहित उत्परिवर्ती में प्रमुख रूप से पराग बाँझपन (pollen sterility) पाया जाता है, जो बीजरहितता के विकास में महत्वपूर्ण भूमिका निभा सकता है।

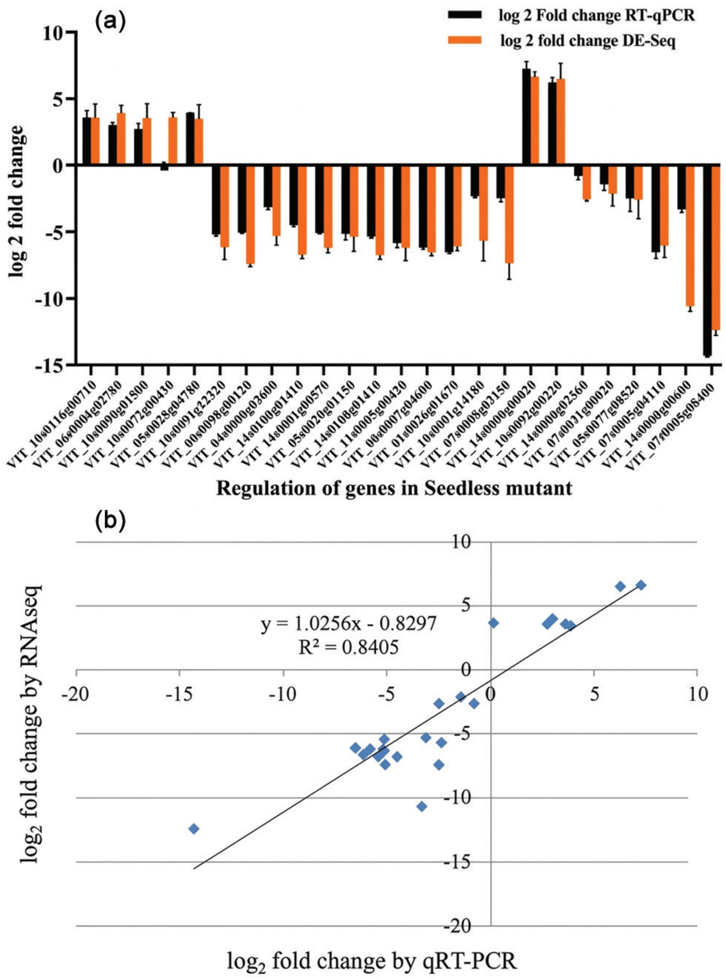
सूक्ष्मगैमेटोजेनेसिस के विश्लेषण से यह पाया गया कि बीजरहित उत्परिवर्ती में परागकणों की संरचना सामान्य नहीं थी। इस उत्परिवर्ती में परागकण सिकुड़े हुए, द्वि-कोलपोरेट तथा अनियमित आकार के पाए गए, जबकि मूल किस्म ARI 516 में परागकणों का सामान्य विकास देखा गया। Alexander staining परीक्षण में भी पराग की जीवितता में उल्लेखनीय कमी पाई गई और पराग अंकुरण माध्यम पर कोई अंकुरण नहीं देखा गया। यह परिणाम स्पष्ट रूप से दर्शाते हैं कि बीजरहित उत्परिवर्ती में पराग क्रियाशील नहीं है। पूर्व के अध्ययनों में भी यह पाया गया है कि असामान्य आकार वाले परागकणों में अंकुरण क्षमता समाप्त हो जाती है और इससे निषेचन प्रक्रिया प्रभावित होती है[16-18]। अंगूर में पराग बाँझपन को बीजरहितता के विकास से भी जोड़ा गया है[6,19,20]। इस प्रकार परिपक्व नर गैमेटोफाइट की अनुपस्थिति बीजरहित उत्परिवर्ती में पार्थेनोकार्पिक फलन की स्थिति उत्पन्न कर सकती है।

पुष्पकोष की संरचना के अध्ययन से यह भी स्पष्ट हुआ कि ARI 516 के पुष्पकोषों में चार सामान्य लोक्यूल तथा स्वस्थ टैपेटम उपस्थित था, जबकि बीजरहित उत्परिवर्ती में टैपेटम अपेक्षाकृत पतला तथा कई स्थानों पर विखंडित पाया गया। टैपेटम पराग विकास के लिए आवश्यक पोषक तत्व उपलब्ध कराता है, अतः इसकी संरचनात्मक असामान्यता पराग विकास को प्रतिकूल रूप से प्रभावित



चित्र 6 — Pathway enrichment analysis

कर सकती है। पूर्व के अध्ययनों में भी यह सिद्ध किया गया है कि टैपेटम की असामान्य संरचना से पराग विकास बाधित होता है तथा नर बाँझपन उत्पन्न हो सकता है[21-23]। इस अध्ययन में यह भी पाया गया कि VvAGL11 तथा VvSUC जैसे जीन, जो स्टेनोस्पर्मोकार्पिक बीजरहितता से संबंधित माने जाते हैं, बीजरहित उत्परिवर्ती में डाउन-रेगुलेट थे। इसके अतिरिक्त p3VvAGL11 तथा VMC7F2 जैसे आणविक मार्कर ARI 516 तथा उसके उत्परिवर्ती में अंतर स्पष्ट नहीं कर पाए। इन अवलोकनों से संकेत मिलता है कि ARI 516 का बीजरहित उत्परिवर्ती संभवतः स्टेनोस्पर्मोकार्पी के बजाय पार्थेनोकार्पी के कारण बीजरहित है।



चित्र 7 — RNA-seq परिणामों का qRT-PCR प्रमाणीकरण

ट्रांसक्रिप्टोमिक विश्लेषण ने यह भी दर्शाया कि बीजरहित उत्परिवर्ती में अनेक ऐसे जीनों की अभिव्यक्ति में परिवर्तन हुआ जो कोशिका विभाजन तथा नर गैमेट के विभेदन से संबंधित हैं। विशेष रूप से DUO POLLEN तथा SIDECAR POLLEN जीनों के समरूप जीनों का डाउन-रेगुलेशन पाया गया। ये जीन परागकणों में कोशिका विभाजन तथा नर गैमेट के विभेदन को नियंत्रित करते हैं[24-26]। इनके अतिरिक्त AAA-ATPase परिवार के जीन तथा AURORA kinase जैसे जीन भी कम अभिव्यक्त पाए गए, जिनकी भूमिका मीओसिस तथा क्रोमोसोम विभाजन में महत्वपूर्ण मानी जाती है[27,28]। इसी प्रकार UBIQUITIN LIGASE तथा PHOSPHATIDYLINOSITOL MONOPHOSPHATE KINASE जैसे जीनों की अभिव्यक्ति में भी कमी देखी गई, जो पराग विकास तथा सिग्नलिंग मार्गों में भूमिका निभाते हैं [29-32]। इन परिणामों से यह संकेत मिलता है कि कोशिका विभाजन तथा नर गैमेट विभेदन से संबंधित जीनों की अभिव्यक्ति में परिवर्तन माइक्रोगैमेटोजेनेसिस को प्रभावित कर सकता है।

पौधों में गैमेट विकास को नियंत्रित करने में पादप हार्मोन भी महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं। ऑक्सिन, गिब्बेरेलिन, साइटोकिनिन, जैसमोनेट तथा एथिलीन जैसे हार्मोन गैमेट विकास के विभिन्न चरणों को नियंत्रित करते हैं[33-35]। वर्तमान अध्ययन में यह पाया गया कि बीजरहित उत्परिवर्ती में बाह्य GA_3 के प्रयोग से बेरी का भार बढ़ गया, जिससे यह संकेत मिलता है कि उत्परिवर्ती में गिब्बेरेलिन की कमी हो सकती है। RNA-seq विश्लेषण में CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE तथा GIBBERELLIN 3-β-DIOXYGENASE जैसे जीनों का डाउन-रेगुलेशन पाया गया, जो गिब्बेरेलिन जैवसंश्लेषण में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं। गिब्बेरेलिन की कमी को कई पौधों में पराग बाँझपन तथा पुष्प विकास में असामान्यता से जोड़ा गया है[36,37]। इसके अतिरिक्त GA oxidase जीनों में उत्परिवर्तन से पराग की जीवितता तथा पराग नलिका वृद्धि प्रभावित होती है[38]। अतः यह संभावना है कि गिब्बेरेलिन जैवसंश्लेषण मार्ग में परिवर्तन बीजरहित उत्परिवर्ती में पराग बाँझपन का एक प्रमुख कारण हो सकता है।

सारणी 1 — जीनोम अनुक्रमण से बीजरहित उत्परिवर्ती में पाए गए समजात तथा विषमजात InDel

InDels in seedless mutant		Gene ID	Description
Homozygous InDels			
Del-56	LOC100853962		Fasciclin-like arabinogalactan protein 7
In-41	VIT_07s0031g00800		Cyclin-dependent kinase inhibitor 7
In-35	VIT_16s0098g01570		Acyl-CoA-binding domain-containing protein 1
Heterozygous InDels			
Del-51	VIT_02s0087g00400		Pectin acetylesterase 8
Del-49	VIT_07s0141g00640		GABA transporter 1
Del-48	VIT_08s0056g01670		BTB/POZ and MATH domain-containing protein 4
Del-46	VIT_04s0043g00240		Importin-5
Del-46	VIT_04s0023g01630		Cytochrome P450 90B1
Del-46	VIT_07s0005g05100		Transcription factor PIF1
Del-46	LOC100853041		Tubulin beta-2 chain
Del-45	VIT_12s0057g00920		Transcriptional adapter ADA2
Del-45	VIT_13s0067g01240		Protein EMB-1
Del-45	LOC100267704		DNA repair protein RadA-like
In-44	VIT_18s0001g02160		SWI/SNF complex subunit SWI3C
Del-44	Vitvi14g04442		Sugar transport protein 12
Del-41	VIT_13s0084g00840		Hydroxyproline O-arabinosyl transferase 3
Del-40	LOC100267057		Protein ECERIFERUM 1-like
In-40	VIT_10s0003g02670		Protein MEI2-like 5
Del-40	VIT_19s0014g03000		Plant intracellular Ras-group-related LRR protein 6
Del-39	VIT_04s0044g01040		Transcription factor HEC3
Del-39	VIT_19s0140g00120		Gibberellin 2-beta-dioxygenase 1 (GA2OX1)
Del-37	VIT_08s0007g02030		Auxin transporter-like protein 2
Del-36	VIT_05s0020g02740		Probable aquaporin NIP7-1
In-36	VIT_01s0011g06580		Protein TOPLESS
Del-36	VIT_11s0052g01720		ADP-ribosylation factor 1
In-36	Vitvi16g04017		Growth-regulating factor 4
Del-36	Vitvi12g04267		Diacylglycerol kinase 5
In-35	VIT_07s0005g05520		Probable pectate lyase 8

ट्रांसक्रिप्टोमिक विश्लेषण से यह भी ज्ञात हुआ कि कई ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर परिवारों की अभिव्यक्ति में परिवर्तन हुआ। विशेष रूप से bHLH, LOB, WRKY तथा NAC ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर परिवारों के अनेक जीन बीजरहित उत्परिवर्ती में डाउन-रेगुलेट पाए गए। bHLH ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर गिब्बेरेलिन सिग्नलिंग तथा टैपेटम विकास में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं[35,39]। इसी प्रकार LOB ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर पराग विकास तथा पराग मात्रा को नियंत्रित करते हैं। इन ट्रांसक्रिप्शन फैक्टरों के लक्ष्य जीन जैसे EXPANSIN, ENDO-1,4-?-GLUCANASE, PECTATE LYASE तथा XYLOSIDASE कोशिका-भित्ति संशोधन में भाग लेते हैं[40]। इस अध्ययन में PECTATE LYASE तथा PECTIN METHYLESTERASE जैसे जीनों का भी डाउन-रेगुलेशन पाया गया, जो पराग संरचना तथा पराग नलिका वृद्धि के लिए आवश्यक माने जाते हैं[41-43]।

इसी प्रकार WRKY ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर भी पराग विकास तथा जीन नियमन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं। अध्ययन में दस WRKY जीनों की अभिव्यक्ति कम पाई गई, साथ ही उनके लक्ष्य जीनों जैसे EXPANSIN तथा SUC (सुक्रोज ट्रांसपोर्टर) की अभिव्यक्ति भी कम थी। Arabidopsis में WRKY2 तथा WRKY34 ट्रांसक्रिप्शन

फैक्टर पराग विकास के लिए आवश्यक पाए गए हैं[44,45]। WRKY प्रोटीनों का MAPK सिग्नलिंग मार्ग के साथ भी संबंध पाया गया है, जो पराग विकास को नियंत्रित करता है[46]। वर्तमान अध्ययन में MAPK जीन का अधिक अभिव्यक्ति स्तर देखा गया, परंतु WRKY जीनों की कम अभिव्यक्ति के कारण इसका प्रभाव स्पष्ट नहीं है और इसके लिए आगे अनुसंधान आवश्यक है।

इसके अतिरिक्त NAC ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर भी कोशिका-भित्ति संगठन तथा पराग अंकुरण में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं। NAC जीनों के डाउन-रेगुलेशन से EXPANSIN तथा अन्य कोशिका-भित्ति संबंधित जीनों की अभिव्यक्ति प्रभावित हो सकती है[47]। इसी प्रकार FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN, XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE तथा CELLULOSE SYNTHASE जैसे जीन भी कम अभिव्यक्त पाए गए, जो पराग कोशिका-भित्ति निर्माण तथा पराग नलिका मार्गदर्शन में भूमिका निभाते हैं[48-51]। इन जीनों की अभिव्यक्ति में कमी पराग नलिका विकास तथा अंकुरण को बाधित कर सकती है।

पुनःअनुक्रमण विश्लेषण से यह भी ज्ञात हुआ कि बीजरहित उत्परिवर्ती में gamma-किरण प्रेरित InDel उत्परिवर्तन उपस्थित थे। ये उत्परिवर्तन ऐसे जीनों में पाए गए जो प्रजनन विकास तथा नर उर्वरता से संबंधित हैं, जैसे FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN, CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR तथा ACYL-COA-BINDING DOMAIN PROTEIN। इन जीनों में उत्परिवर्तन होने से बाँझ अंडाशय तथा परागकण विकसित हो सकते हैं[52-56]। इसके अतिरिक्त PECTIN ACETYLESTERASE, CYTOCHROME P450, HEC3 तथा अन्य जीनों में भी InDel परिवर्तन पाए गए, जो टैपेटम विकास, पराग नलिका वृद्धि तथा निषेचन प्रक्रिया में भूमिका निभाते हैं[57-63]। InDel क्षेत्रों के विश्लेषण से यह भी ज्ञात हुआ कि इन उत्परिवर्तनों के कारण कई ट्रांसक्रिप्शन फैक्टरों के बाइंडिंग साइट प्रभावित हो सकते हैं, जिससे जीन अभिव्यक्ति में परिवर्तन संभव है।

निष्कर्ष

इस अध्ययन में अंगूर की किस्म ARI 516 तथा उसके बीजरहित उत्परिवर्ती का तुलनात्मक विश्लेषण करके बीजरहितता से संबंधित गैमेट विकास, जीन अभिव्यक्ति तथा जीनोमिक परिवर्तनों का अध्ययन किया गया। सूक्ष्मगैमेटोजेनेसिस के परिणामों से यह स्पष्ट हुआ कि बीजरहित उत्परिवर्ती में परागकणों का असामान्य विकास तथा पराग बाँझपन पाया जाता है। परागकणों की असामान्य संरचना, कम जीवितता तथा पराग अंकुरण की अनुपस्थिति के कारण पराग नलिका का विकास बाधित हुआ, जिससे निषेचन प्रक्रिया प्रभावित होती है। ट्रांसक्रिप्टोमिक विश्लेषण से यह ज्ञात हुआ कि बीजरहित उत्परिवर्ती में कई महत्वपूर्ण जीनों तथा ट्रांसक्रिप्शन फैक्टरों की अभिव्यक्ति में परिवर्तन हुआ। विशेष रूप से DUO POLLEN, SIDECAR POLLEN, bHLH, LOB, WRKY तथा NAC जैसे ट्रांसक्रिप्शन फैक्टरों और उनके लक्ष्य जीनों की अभिव्यक्ति में कमी पाई गई, जो कोशिका विभाजन, नर गैमेट विभेदन, गिब्बेरेलिन जैवसंश्लेषण, पराग कोशिका-भित्ति विकास तथा पराग अंकुरण प्रक्रियाओं में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं। इसके अतिरिक्त RNA-seq परिणामों से यह भी स्पष्ट हुआ कि गिब्बेरेलिन जैवसंश्लेषण तथा सिग्नलिंग मार्ग में परिवर्तन हुआ, जो पराग विकास और उर्वरता को प्रभावित कर सकता है। पूर्ण जीनोम पुनःअनुक्रमण विश्लेषण से यह ज्ञात हुआ कि बीजरहित उत्परिवर्ती में गामा-किरण प्रेरित InDel उत्परिवर्तन उपस्थित थे, जो ऐसे जीनों में पाए गए जो प्रजनन विकास, नर उर्वरता, टैपेटम विकास तथा कोशिका-भित्ति संशोधन से जुड़े होते हैं। इन आनुवंशिक परिवर्तनों तथा जीन अभिव्यक्ति में अंतर के परिणामस्वरूप पराग विकास बाधित हुआ और अंततः पार्थेनोकार्पिक बीजरहित फलन विकसित होने की संभावना व्यक्त की गई। अतः इस अध्ययन से यह निष्कर्ष निकलता है कि ARI 516 के बीजरहित उत्परिवर्ती में बीजरहितता मुख्यतः पराग बाँझपन, गैमेट विकास में अवरोध, हार्मोनल सिग्नलिंग में परिवर्तन तथा जीनोमिक उत्परिवर्तन के संयुक्त प्रभाव के कारण उत्पन्न होती है। यह अध्ययन अंगूर में बीजरहितता के आनुवंशिक एवं आणविक आधार को समझने के लिए महत्वपूर्ण जानकारी प्रदान करता है[64]। हालांकि, संभावित उम्मीदवार जीनों की भूमिका की पुष्टि के लिए भविष्य में कार्यात्मक विश्लेषण (जैसे CRISPR-Cas9, RNA interference तथा अन्य जीन संपादन तकनीकें) आवश्यक होंगे, जिससे अंगूर में बीजरहित किस्मों के विकास के लिए नए अवसर उपलब्ध हो सकेंगे।

संदर्भ

1. Malabarba J, Buffon V, Mariath JE, Gaeta ML, Dornelas MC, Margis-Pinheiro M, Pasquali G, Revers LF. The MADS-box gene Agamous-like 11 is essential for seed morphogenesis in grapevine. J Exp Bot. 2017;68(7):1493-506. https://doi.org/10.1093/jxb/erx025.
2. Yim B, Mun JH, Park SH, Shim HR, Kim JH, Hur YY, Yu HJ. Anatomical, biochemical and transcriptome analyses of Vitis vinifera cv.'Hongju'reveal novel information regarding the seed hardness of stenospermocarpic soft?seed grapes. Plant Breed. 2020;139(3):672-83. https://doi.org/10.1111/pbr.12793
3. Nwafor CC, Gribaudo I, Schneider A, Wehrens R, Grando MS, Costantini L. Transcriptome analysis during berry development provides insights into co-regulated and altered gene expression between a

seeded wine grape variety and its seedless somatic variant. BMC Genom. 2014;15:1-22. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1030.

4. Ledbetter CA, Ramming DW. Seedlessness in grapes. Hortic Rev. 1989;11:159-84. https://doi.org/10.1002/9781118060841.

5. Ledbetter CA, Burgos L. Inheritance of stenospermocarpic seedlessness in Vitis vinifera L. J Hered. 1994;85:157-60. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111419.

6. Royo C, Carbonell-Bejerano P, Torres-Pérez R, Nebish A, Martínez Ó, Rey M, Aroutiounian R, Ibáñez J, Martínez-Zapater JM. Developmental, transcriptome, and genetic alterations associated with parthenocarpy in the grapevine seedless somatic variant Corinto bianco. J Exp Bot. 2016;67(1):259-73. https://doi.org/10.1093/jxb/erv452.

7. Kim MS, Hur YY, Kim JH, Jeong SC. Genome resequencing, improvement of variant calling, and population genomic analyses provide insights into the seedlessness in the genus vitis. G3 (Bethesda). 2020;10(9):3365-77. https://doi.org/10.1534/g3.120.401521

8. Wang X, Liu Z, Zhang F, Xiao H, Cao S, Xue H, Liu W, Su Y, Liu Z, Zhong H, Zhang F. Integrative genomics reveals the polygenic basis of seedlessness in grapevine. Curr Biol. 2024; 34(16):3763-77. https://doi.org/10.1016/j.cub. 2024. 07.022.

9. Ye LX, Gan ZM, Wang WF, Ai XY, Xie ZZ, Hu CG, Zhang JZ. Comparative analysis of the transcriptome, methylome, and metabolome during pollen abortion of a seedless citrus mutant. Plant Mol Biol. 2020;104:151-71. https://doi.org/10.1007/s11103-020-01034-7.

10. Ingrosso I, Bonsegna S, De Domenico S, Laddomada B, Blando F, Santino A, Giovinazzo G. Over-expression of a grape stilbene synthase gene in tomato induces parthenocarpy and causes abnormal pollen development. Plant Physiol Biochem. 2011;49(10):1092-9. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.012.

11. Yao JL, Dong YH, Morris BA. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(3):1306-11. https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1306.

12. Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LE, Atares A, Garcia-Martinez JL. Characterization of the procera tomato mutant shows novel functions of the SlDELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. Plant Physiol. 2012;160(3):1581-96. https://doi.org/10.1104/pp.112.204552.

13. Tiwari A, Vivian-Smith A, Voorrips RE et al. Parthenocarpic potential in Capsicum annuum L. is enhanced by carpelloid structures and controlled by a single recessive gene. BMC Plant Biol. 2011;11:143. https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-143

14. Vignati E, Lipska M, Dunwell JM, et al. Options for the generation of seedless cherry, the ultimate snacking product. Planta. 2022;256:90. https://doi.org/10.1007/s00425-022-04005-y.

15. Kaur H, Manchanda P, Kumar P et al. Genome-wide identification and characterization of parthenocarpic fruit set-related gene homologs in cucumber (Cucumis sativus L.). Sci Rep. 2023;13:2403. https://doi.org/10.1038/s41598-023-29660-3

16. Abreu I, Costa I, Oliveira M, Cunha M, De Castro R. Ultrastructure and germination of Vitis vinifera cv. Loureiro pollen Protoplasma. 2006;228:131-5. https://doi.org/10.1007/s00709-006-0167-1.

17. Yin P, Ding W, Zhang H, Liu X, Zhang H, Zeng J, Xu J. Morphological, physiological and molecular characteristics of the seedless 'Hongjiang cheng'sweet orange. Hortic Plant J. 2023;9(3):437-49. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.10.001.

18. Xu L, Xiong X, Liu W, Liu T, Yu Y, Cao J. BcMF30a and BcMF30c, two novel non-tandem CCCH zinc-Finger Proteins, Function in Pollen Development and Pollen Germination in Brassica campestris ssp. chinensis. Int J Mol Sci. 2020;21(17):6428. https://doi.org/10.3390/ijms21176428

19. Alva O, Roa-Roco RN, Perez-Diaz R, Yáñez M, Tapia J, Moreno Y, Ruiz-Lara S, Gonzalez E. Pollen morphology and boron concentration in floral tissues as factors triggering natural and GA-induced parthenocarpic fruit development in grapevine. PLoS ONE. 2015;10(10):e0139503. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139503.

20. Caporali E, Spada A, Marziani G, Failla O, Scienza A. The arrest of development of abortive reproductive

organs in the unisexual flower of Vitis vinifera ssp. silvestris. Sex Plant Reprod. 2003;15:291-300. https://doi.org/10.1007/s00497-003-0169-5

21. Tian A, Zhang E, Cui Z. Full-length transcriptome analysis reveals the differences between floral buds of recessive genic male-sterile line (RMS3185A) and fertile line (RMS3185B) of cabbage. Planta. 2021;253:1-3. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03542-8.
22. Zhang G, Ding Q, Wei B, Yang H. Transcriptome Analysis of Sterile and Fertile Floral Buds from Recessive Genetic Male Sterility Lines in Watermelon (Citrullus lanatus L). J Plant Growth Regul. 2023;42(5):2800-12. https://doi.org/10.1007/s00344-022-10747-6.
23. Verma N. Transcriptional regulation of anther development in Arabidopsis. Gene. 2019;689:202-9. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.022.
24. Chen YC, McCormick S. sidecar pollen, an Arabidopsis thaliana male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. Development. 1996;122(10):3243-53. https://doi.org/10.1242/dev.122.10.3243.
25. Huang J, Dong J, Qu LJ. From birth to function: Male gametophyte development in flowering plants. Curr Opin Plant Biol. 2021;63:102118. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102118.
26. Brownfield L, Hafidh S, Borg M, Sidorova A, Mori T, Twell D. A plant germline-specific integrator of sperm specification and cell cycle progression. PLoS Genet. 2009;5(3):e1000430. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000430.
27. Zhang P, Zhang Y, Sun L, Sinumporn S, Yang Z, Sun B, Xuan D, Li Z, Yu P, Wu W, Wang K. The rice AAA-ATPase OsFIGNL1 is essential for male meiosis. Front. Plant Sci. 2017;8:1639. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01639
28. Demidov D, Lermontova I, Weiss O, Fuchs J, Rutten T, Kumke K, Sharbel TF, Van Damme D, De Storme N, Geelen D, Houben A. Altered expression of Aurora kinases in Arabidopsis results in aneu-and polyploidization. Plant J. 2014;80(3):449-61. https://doi.org/10.1111/tpj.12647.
29. Hepler PK, Rounds CM, Winship LJ. Control of cell wall extensibility during pollen tube growth. Mol Plant. 2013;6(4):998-1017. https://doi.org/10.1093/mp/sst103.
30. Gao XQ, Zhang XS. Metabolism and roles of phosphatidylinositol 3-phosphate in pollen development and pollen tube growth in Arabidopsis. Plant Signal Behav. 2012 ;7(2):165-9. https://doi.org/10.4161/psb.18743.
31. Ramachandran S, Christensen HE, Ishimaru Y, Dong CH, Chao-Ming W, Cleary AL, Chua NH. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. Plant Physiol. 2000;124(4):1637-47. https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1637.
32. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. Plant Mol Biol. 2012;80:75-84. https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2.
33. Chandler JW. The hormonal regulation of flower development. J Plant Growth Regul. 2011;30(2):242-54. https://doi.org/10.1007/s00344-010-9180-x.
34. Kovaleva LV, Dobrovolskaya A, Voronkov A, Rakitin V. Ethylene is involved in the control of male gametophyte development and germination in petunia. J Plant Growth Regul. 2011;30:64-73. https://doi.org/10.1007/s00344-010-9168-6.
35. Plackett AR, Thomas SG, Wilson ZA, Hedden P. Gibberellin control of stamen development: a fertile field. Trends Plant Sci. 2011;16(10):568-78. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.007.
36. Wiese AJ, Torutaeva E, Honys D. The transcription factors and pathways underpinning male reproductive development in Arabidopsis. Front Plant Sci. 2024;15:1354418. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1354418.
37. Hu J, Lan M, Xu X, Yang H, Zhang L, Lv F, Yang H, Yang D, Li C, He J. Transcriptome profiling reveals molecular changes during flower development between male sterile and fertile Chinese cabbage (Brassica rapa ssp. pekinensis) Lines. Life. 2021;11(6):525. https://doi.org/10.3390/life11060525
38. Chhun T, Aya K, Asano K, Yamamoto E, Morinaka Y, Watanabe M, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M. Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. Plant Cell. 2007;19(12):3876-88. https://doi.org/10.1105/tpc.107.054759.
39. Ortolan F, Trenz TS, Delaix CL, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M. bHLH-regulated routes in

anther development in rice and Arabidopsis. Genet Mol Biol. 2023;46:e20230171. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2023-0171.

40. Shi Y, Vrebalov J, Zheng H, Xu Y, Yin X, Liu W, Liu Z, Sorensen I, Su G, Ma Q, Evanich D. A tomato LATERAL ORGAN BOUNDARIES transcription factor, SlLOB1, predominantly regulates cell wall and softening components of ripening. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(33):e2102486118. https://doi.org/10.1073/pnas.2102486118.

41. Jiang J, Yao L, Yu Y, Liang Y, Jiang J, Ye N, Miao Y, Cao J. PECTATE LYASE-LIKE 9 from Brassica campestris is associated with intine formation. Plant Sci. 2014;229:66-75. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.08.008.

42. Wing RA, Yamaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, McCormick S. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen Erwinia. Plant Mol Biol. 1990;14:17-28. https://doi.org/10.1007/BF00015651.

43. Fu Y. The cytoskeleton in the pollen tube. Curr Opin Plant Biol. 2015;28:111-9. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.004.

44. Qian Z, Shi D, Zhang H, Li Z, Huang L, Yan X, Lin S. Transcription factors and their regulatory roles in the male gametophyte development of flowering plants. Int J Mol Sci. 2024;25(1):566. https://doi.org/10.3390/ijms25010566.

45. Lei R, Li X, Ma Z, Lv Y, Hu Y, Yu D. Arabidopsis WRKY 2 and WRKY 34 transcription factors interact with VQ 20 protein to modulate pollen development and function. Plant Sci J. 2017;91(6):962-76. https://doi.org/10.1111/tpj.13619.

46. Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in Arabidopsis. PLoS Genet. 2014;10(5):e1004384. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004384.

47. Yuan X, Xu J, Yu J, Zhu D, Li H, Zhao Q. The NAC transcription factor ZmNAC132 regulates leaf senescence and male fertility in maize. Plant Sci. 2023;334:111774. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111774.

48. Forestan C, Varotto S. The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development. Mol Plant. 2012;5(4):787-98. https://doi.org/10.1093/mp/ssr103.

49. Zhou D, Zou T, Zhang K, Xiong P, Zhou F, Chen H, Li G, Zheng K, Han Y, Peng K, Zhang X. DEAP1 encodes a fasciclin-like arabinogalactan protein required for male fertility in rice. J Integr Plant Biol. 2022;64(7):1430-47. https://doi.org/10.1111/jipb.13271.

50. Wang W, Wang L, Chen C, Xiong G, Tan XY, Yang KZ, Wang ZC, Zhou Y, Ye D, Chen LQ. Arabidopsis CSLD1 and CSLD4 are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes. J Exp Bot. 2011;62(14):5161-77. https://doi.org/10.1093/jxb/err221.

51. Zhang C, He M, Jiang Z, Liu L, Pu J, Zhang W, Wang S, Xu F. The xyloglucan endo transglucosylase/hydrolase gene XTH22/TCH4 regulates plant growth by disrupting the cell wall homeostasis in Arabidopsis under boron deficiency. Int J Mol Sci. 2022;23(3):1250. https://doi.org/10.3390/ijms23031250.

52. Coimbra S, Pereira LG. Arabinogalactan proteins in Arabidopsis thaliana pollen development. Transgenic plants-advances and limitations. 2012:329-52. https://doi.org/10.5772/30833

53. Lung SC, Chye ML. Acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development. Lipids in plant and algae development. 2016:363-404. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_15

54. Xue Y, Xiao S, Kim J, Lung SC, Chen L, Tanner JA, Suh MC, Chye ML. Arabidopsis membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 is involved in stem cuticle formation. J Exp Bot. 2014;65(18):5473-83. https://doi.org/10.1093/jxb/eru304.

55. Cao L, Wang S, Venglat P, Zhao L, Cheng Y, Ye S, Qin Y, Datla R, Zhou Y, Wang H. Arabidopsis ICK/KRP cyclin-dependent kinase inhibitors function to ensure the formation of one megaspore mother cell and one functional megaspore per ovule. PLoS Genet. 2018;14(3):e1007230. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007230.

56. Zhou Y, Wang H, Gilmer S, Whitwill S, Keller W, Fowke LC. Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1

in transgenic Brassica plants. Planta. 2002;215:248-57. https://doi.org/10.1007/s00425-002-0752-2.

57. Palmer JP, Pajak A, Robson B, Zhang B, Joshi J, Diapari M, Pauls KP, Marsolais F. Pectin acetylesterase 8 influences pectin acetylation in the seed coat, seed imbibition, and dormancy in common bean (Phaseolus vulgaris L). Legum Sci. 2022;4(3):e130. https://doi.org/10.1002/leg3.130.

58. Ramesh SA, Tyerman SD, Xu B, Bose J, Kaur S, Conn V, Domingos P, Ullah S, Wege S, Shabala S, Feijó JA. GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. Nat Commun. 2015;6(1):7879. https://doi.org/10.1038/ncomms8879.

59. Zhang Y, Wang Y, Liu R, Fei Z, Fan X, Jiang J, Sun L, Meng X, Liu C. Antibody array-based proteome approach reveals proteins involved in grape seed development. Plant Physiol. 2024;195(1):462-78. https://doi.org/10.1093/plphys/kiad682.

60. Distéfano AM, Setzes N, Cascallares M, Fiol DF, Zabaleta E, Pagnussat GC. Roles of cytochromes P450 in plant reproductive development. Int J Plant Dev Biol. 2021;65(4-5-6):187-94. https://doi.org/10.1387/ijdb.200100gp

61. Meinke DW. Genome-wide identification of EMBRYO-DEFECTIVE (EMB) genes required for growth and development in Arabidopsis. New Phytol. 2020;226(2):306-25. https://doi.org/10.1111/nph.16071.

62. Zhu RM, Li M, Li SW, Liang X, Li S, Zhang Y. Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR-A1s mediate tapetum-controlled pollen development. Plant J. 2021;108(1):268-80. https://doi.org/10.1111/tpj.15440.

63. Kaur D, Moreira D, Coimbra S, Showalter AM. Hydroxyproline-O-galactosyltransferases synthesizing type ii arabinogalactans are essential for male gametophytic development in Arabidopsis. Front Plant Sci. 2022;13:935413. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.935413.

64. Chavan S, Phalake S, Tetali S, Barvkar VT, Patil R. Comparative gametogenesis and genomic signatures associated with pollen sterility in the seedless mutant of grapevine. BMC Plant Biol. 2025 Feb 3;25(1):138. doi: 10.1186/s12870-025-06075-y.