

# ASPECTE FIZIOLOGICE ȘI GENETICE ALE SISTEMULUI ASC-RF LA FLOAREA-SOARELUI \*

Academician *Maria DUCA*

## PHYSIOLOGICAL AND GENETIC ASPECTS OF SUNFLOWER CMS-Rf SYSTEM

Inheritance, genes expression and molecular mechanisms of CMS-Rf system was studied. It were identified 2 - 3 genes which complementary or cumulative interaction and one new gene - Rfl, with specific expression in CMSI.

It was developed a concept according to which the male sterility/male fertility in sunflower are caused by IAA/GA3 ratio.

The structural and functional similarity at morphological, physiological, biochemical and genetic level (including transcription and translation level) of cytoplasmic male sterility and induced (by GA3) male sterility was established.

**Introducere.** Creșterea competitivității și eficienței, precum și sporirea impactului cercetărilor asupra societății, reprezintă una dintre cele mai importante și actuale preocupări, ba mai mult – o prioritate strategică a științei moderne. Acest obiectiv poate fi realizat prin implementarea investigațiilor complexe, bazate pe asocierea cercetărilor fundamentale cu cele aplicative.

Valorificând o abordare multidisciplinară și diversificând de la an la an metodele de cercetare, am încercat să dezvoltăm diverse aspecte ce țin de studiul complex al genelor, de expresia acestora la nivel de ARN și proteine, precum și de elucidarea bazelor genetico-moleculare și fiziologo-biochimice de realizare fenotipică a factorilor ereditari.

**Strategia cercetărilor** s-a axat pe analiza diferitelor sisteme model (*ASC-Rf, linii izogene, lupoaie – floarea-soarelui, plante modificate genetic etc.*) în cadrul cărora genele determină caractere economice valoroase.

Cele mai vaste investigații au fost efectuate asupra sistemului genetic ASC-Rf, care, ca fenomen și funcție, este larg răspândit în natură și frecvent utilizat în practica de ameliorare a culturilor agri-

\*Articol scris în contextul cercetărilor pentru care autoarea a fost aleasă în calitate de membru titular al AȘM, prin decizia Adunării Generale a membrilor AȘM din 6 decembrie 2012.

cole [22]. Totodată, sistemul reprezintă un model excelent în studiul fiziologiei eredității și relevării aspectelor genetico-fiziologice ce conduc spre exteriorizarea genelor, întrucât primul component al sistemului – androsterilitatea citoplasmatică (ASC) la floarea-soarelui – este determinată de gena mitocondrială *orf H 522*, iar al doilea component – genele restauratoare de fertilitate (Rf) – sunt localizate în nucleu și se moștenesc mendelian. Astfel, în realizarea fenotipică a androsterilității/androfertilității (AS/AF) are loc interacțiunea genelor nucleare și citogenelor la nivel de citoplasmă.

Mai mult decât atât: aplicarea exogenă a gibberinelor restaurează androfertilitatea la formele sterile [10] și anume aceste substanțe induc sterilitatea masculină la plantele fertile [13], dereglând derularea normală a programului genetic al microsporo-genezei.

**Metodologia cercetării.** În efectuarea acestui studiu am pornit de la ideea că sistemul funcțional ASC-Rf, fiind determinat de factorii ereditari cromozomali și extracromozomali, posedă mecanisme hormonale temporale și spațiale de autoreglare care se manifestă la diferite nivele de organizare a materiei vii.

**Scopul cercetărilor** efectuate au constat în stabilirea particularităților morfofiziologice și genetico-moleculare de manifestare a androsterilității citoplasmatică și restaurării fertilității masculine la floarea-soarelui pentru a demonstra și a fundamenta interacțiunea mecanismului genetic și fitohormonal de autoreglare în realizarea fenotipică a sistemului ASC-Rf.

**Rezultate și discuții.** Întrucât organizarea și funcționarea sistemului organic dat sunt legate de aparatul genetic celular și indispensabil guvernate de mecanismele ereditare ale acestuia, studiul ASC și restaurării fertilității polenului a fost început cu aspectele genetice.

Androsterilitatea rezultă din blocarea procesului de microsporo-geneză la diverse etape ale acestuia și reprezintă incapacitatea plantelor de a forma polen funcțional. Acest tip de sterilitate a fost descris la numeroase specii de plante de cultură și plante sălbatice. În pofida multitudinii și diversității formelor existente de androsterilitate, în natură se evidențiază doar două căi de geneză a acestui proces:

1. autoplasmică, identificată spontan în populații naturale;
2. aloplasmică, obținută la încrucișarea diferitelor specii filogenetic îndepărtate.

În literatura de specialitate despre floarea-soarelui sunt descrise circa 62 de surse de androsterilitate



Fig. 1. Diferite tipuri de androsterilitate la floarea-soarelui

[12]. O contribuție importantă în explicarea sterilității masculine la plante și utilizarea practică a acestui fenomen are tipizarea surselor de ASC. Efectuarea cercetărilor cu folosirea unui sistem modificat de încrucișări a permis elaborarea și brevetarea metodei hibridologice noi de identificare a surselor de ASC [20]. Această metodă a permis să constatăm, că ASC obținută în baza *ssp. petiolaris* nominalizată ASC<sub>p</sub> și ASC obținută în baza *ssp. lenicularis* nominalizată ASC<sub>1</sub>, reprezintă două tipuri diferite de ASC, deoarece manifestă determinism genetic specific de restaurare a androfertilității [15, 16]. Rezultate, ce confirmă această constatare, au fost obținute mai târziu de R. Horn prin analize moleculare [9].

Tipurile de androsterilitate identificate se deosebesc fenotipic la nivelul morfologiei florii după gradul de atrofiere și degenerare a androceului și sacilor polinici, la fel manifestându-se și androsterilitatea modificatională. Astfel, la formele cu ASC<sub>1</sub>, s-a depistat dezvoltarea normală a anterelor, care se deosebesc de analogii fertili numai prin depigmentație, pe când ASC<sub>p</sub> se manifestă fenotipic prin degenerarea totală a androceului și sacilor polinici (fig. 1).

În ambele tipuri de ASC, prin amplificarea cu primeri specifici, s-a relevat prezența genei *orfH522*, asociată cu androsterilitatea. Genotipurile analizate au prezentat un pattern diferit de amplificare, ceea ce denotă prezența unei populații neomogene de plante fertile și sterile, un nivel absolut de sterilitate fiind constatat doar la 12% dintre liniile maternelne (fig.2).

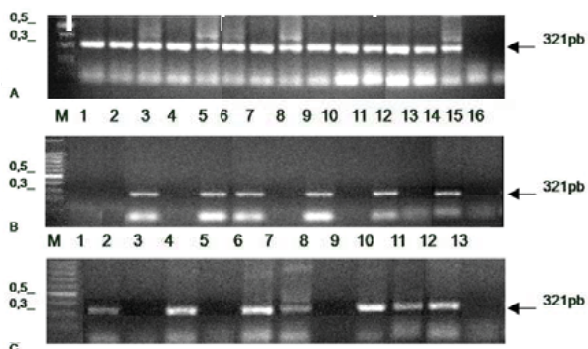


Fig. 2. Electroforeza ampliconilor asociați cu ASC la diverse genotipuri de floarea-soarelui

Rezultatele obținute au pus în evidență posibilitatea estimării nivelului de sterilitate rapid și cu un grad înalt de veridicitate.

Pentru prima dată același produs de amplificare a fost obținut și la plantele fertile tratate cu gibereline, adică la androsterilitatea indusă [5; 6]. Secvențierea și analiza comparativă BLAST a evidențiat o similitudine de 99-100% cu gena mitocondrială *orfH522*, identificată la liniile cu androsterilitate citoplasmatică.

Rezultatele analizei de amplificare în timp real (RT-PCR) demonstrează elocvent că aplicarea exogenă a giberelinelor, prin activarea zonei deja rearanjate, induce transcripti analogi celor ce se exprimă în cazul androsterilității citoplasmatică (fig.3).

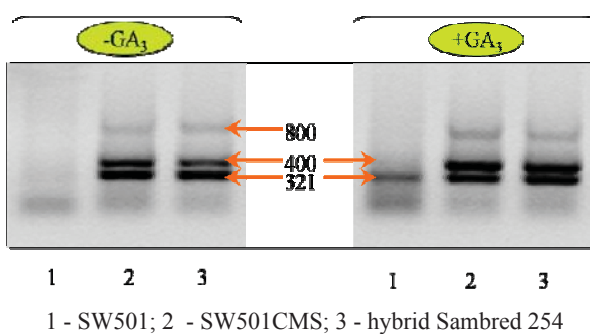


Fig. 3. Efectul AG<sub>3</sub> asupra expresiei genei *orfH522* în flori la diferite faze ale meiozei

Prin aceste rezultate am demonstrat mecanismul molecular similar al androsterilității ereditare și androsterilității induse de gibereline la nivel de transcripție [1].

O altă etapă a cercetărilor a constituit determinarea caracterului eredității genelor Rf în ASC<sub>p</sub> [17] și ASC<sub>1</sub> [18], fiind demonstrate diferențe mono- și digenice și diferite tipuri de interacțiune [8, 16] a genelor Rf (tab.1).

Restaurarea androfertilității în ASC<sub>1</sub> are o natură genetică mai complexă și este asigurată în unele genotipuri de 3 gene Rf, iată de ce am presupus prezența suplimentară a unei gene Rf care nu asigură formarea polenului fertil în ASC<sub>p</sub>. Pentru verificarea acestei ipoteze au fost studiați 40 de hibridi monoheterozigoți F<sub>1</sub> care în încrucișările analizatoare

Restaurarea androfertilității la hibridii de floarea-soarelui pe bază de ASC

Indexul liniei	Generație	Segregare fertile : sterile		$\chi^2$	Numărul de gene	Tip de interacțiune	Numărul de familii
		real	teoretic				
SI 3376-3	F <sub>1</sub>	57:64	1:1	0,52	1	-	11
	F <sub>2</sub>	31:10	3:1	0,02			
	F <sub>B</sub>	125:18	1:1	1,12			
SI 2986-2	F <sub>1</sub>	78:0	-	-	2	Polimerie necumulativă	12
	F <sub>B</sub>	45:15	3:1	0:00			
	F <sub>2</sub>	30:5	15:1	2,98			
VIR 199	F <sub>1</sub>	80:0	-	-	2	Interacțiune complementară	4
	F <sub>2</sub>	19:18	9:7	0,23			
	F <sub>B</sub>	13:30	1:3	0,60			
K 2288-287	F <sub>1</sub>	65:0	-	-	2	Polimerie cumulativă	8
	F <sub>B</sub>	13:24:17	1:2:2	1,09			
	F <sub>2</sub>	26:18:3 <sup>x</sup>	9:6:1	0,36			
VIR 160-352	F <sub>1</sub>	62:8	7:1	0,06	3	Polimerie necumulativă	3

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

pe citoplasmă *ssp. lenticularis* au manifestat un raport de segregare așteptat la acțiunea unei alele dominante Rf, iar în F<sub>a</sub> pe citoplasmă *ssp. petiolaris* s-au evidențiat șase generații omogene cu plante sterile. În generația a doua, în cadrul genotipurilor heterozigote, după genele Rf pentru ASC<sub>1</sub> dimpotrivă, s-au depistat 12 hibridi care aveau numai plante fertile. Cazurile înregistrate demonstrează *identificarea unei noi gene restauratoare a androfertilității la floarea-soarelui, care se deosebește funcțional de cele cunoscute anterior și a fost numită Rf<sub>1</sub>* [21]. Reieșind din datele analizei hibridologice, considerăm că gena Rf<sub>1</sub> este prezentă în stare dominantă homozigotă în ASC<sub>p</sub> și asigură diferența fenotipică în structura morfologică a androceului la diferite tipuri de ASC (fig.1).

Utilizarea testului recombinării la alelism, cu evidențierea liniilor homozigote după genele Rf, obținerea hibridilor (F<sub>1</sub>) între ele, încrucișarea plantelor hibride cu linii analizatoare (Fa), determinarea alelismului genelor Rf după caracterul segregării a confirmat prezența genei Rf<sub>1</sub> în liniile restauratoare specifice pentru ASC *ssp. lenticularis* și a relevat cel puțin trei perechi de gene care controlează restaurarea androfertilității [19].

Astăzi la floarea-soarelui sunt descrise cinci gene restauratoare de fertilitate, inclusiv Rf<sub>1</sub> – identificată pentru prima dată de M. Kinman la linia T 66 006-2, Rf<sub>2</sub> – descoperită în majoritatea liniilor fertile, Rf<sub>3</sub> – care restaurează fertilitatea la diverse

surse ASC și este diferită de Rf<sub>1</sub>, Rf<sub>4</sub> – identificată la *Helianthus maximiliani* 1631, care restaurează fertilitatea la ASC-GIG2 [cit. după 8] și gena Rf<sub>1</sub> cu acțiune specifică în citoplasma *ssp. lenticularis* [21].

Până în prezent este cartată molecular doar gena Rf<sub>1</sub> poziționată în grupul de linkage 6 [11]. Analizele moleculare efectuate cu primerii specifici pentru markerul STS10B1, lincat cu locusul restaurator 1 la o distanță de 3,1 cM de această genă au permis identificarea unui amplicon de 308 bp în majoritatea liniilor materne, paterne și la genotipurile hibride care indică prezența genei Rf<sub>1</sub> (fig.4). Prin digestia ampliconului PCR cu endonucleaza *Hin*I au fost evidențiate trei profile electroforetice în raport de segregare genotipică de 1:2:1 în F<sub>2</sub> și de 1:1 în BC<sub>1</sub>, *date care permit identificarea stării genei restauratoare de fertilitate – dominante homo- și heterozigotă la liniile Rf și hibridi și recesivă homozigotă la liniile materne.*

Analiza comparativă a datelor din literatură cu

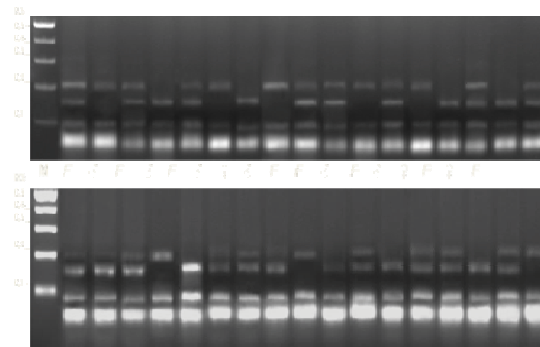


Fig. 4. Electroforeza ampliconilor asociați cu gena Rf<sub>1</sub>



Localizarea proteinelor ASC-Rf

SPECIA		PROTEINA	LOCALIZAREA PROTEINELOR ASC-Rf		
			Noncitoplasmatică	Trans membranară	Citoplasmatică
ASC	Petunia	proteină ASC 402 aa	38–46; 112–402	47–67; 88–111	68–87
Rf		proteina genei Rf-PR591	–	–	1–591
Rf		proteina genei Rf-PR592	–	–	1–591
ASC	Brassica napus	proteina genei orf222	28–89	7–27; 90–108	1–6; 109–222
Rf		proteina genei Rfo	–	–	1–667
ASC	Oryza sativa	ORF 79	1–19	20–38	39–79
Rf		proteina genei Rf1a	–	–	1–791
Rf		proteina genei Rf1b	–	–	1–506
Rf		proteina genei Rf1c	–	–	1–794
ASC	Raphanus	ORF 125	1–23	24–44	45–125
Rf	sativus	proteina genei orf687	–	–	1–687

rezultatele obținute de noi demonstrează că mecanismul de moștenire și interacțiune a genelor *Rf*, constatat pentru floarea-soarelui, este în mare parte similar determinismului genetic în cadrul sistemului genetic ASC-Rf la alte specii de plante, indiferent de originea androsterilității și de poziția lor taxonomică.

Cum mecanismele moleculare ale sistemului ASC-Rf la floarea-soarelui sunt studiate fragmentar și pornind de la considerentele menționate mai sus, ne-am propus să analizăm *in silico* produsele de expresie ale sistemului ASC-Rf pentru alte 24 specii de plante [7].

Am constatat că *indiferent de poziția taxonomică a speciei și de originea ASC*, proteinele asociate cu genele restauratoare de fertilitate posedă domene *CITOPLASMATICE*, în timp ce proteinele asociate cu ASC – trei tipuri de domene: domene *CITOPLASMATICE*, *TRANSMEMBRANARE* și *NONCITOPLASMATICE* (tab. 2).

Aceste date au confirmat rezultatele obținute de noi anterior, prin care am pus în evidență proteina 16 kDa în SDS electroforeză, și au stabilit un nivel mai înalt în fracția mitocondrială [24] com-

parativ cu cea citoplasmatică (fig. 5A). Iar rezultatele analizei bioinformatic demonstrează că primii 23 de aminoacizi ai proteinei ORFH522 de la floarea-soarelui au o localizare intramitocondrială, având un domen NONCITOPLASMATIC; următorii 17 aminoacizi sunt localizați între membrane cu un domen TRANSMEMBRANAR, iar majoritatea acestora (132 de aminoacizi) sunt localizați în citoplasmă și au un domen CITOPLASMATIC (fig. 5B).

Identificarea domenelor proteice prin *Protein Workbench* și caracterizarea acestora cu ajutorul programului *Fobius* a permis să presupunem că cel mai frecvent produșii de expresie a genelor Rf cu motive specifice de recunoaștere contribuie la destabilizarea transcriptului mitocondrial ASC, anihilând astfel întreaga cale metabolică pe care o declanșează genele mitocondriale conducând spre apoptoza celulară. ALDH, asociată de asemenea cu genele Rf, participă deja la acest nivel în interacțiune, detoxificând aldehida acetică care se acumulează drept rezultat al activizării proceselor catabolice și intensificării glicolizei pe fundalul mitocondriilor lezați (fig. 6).

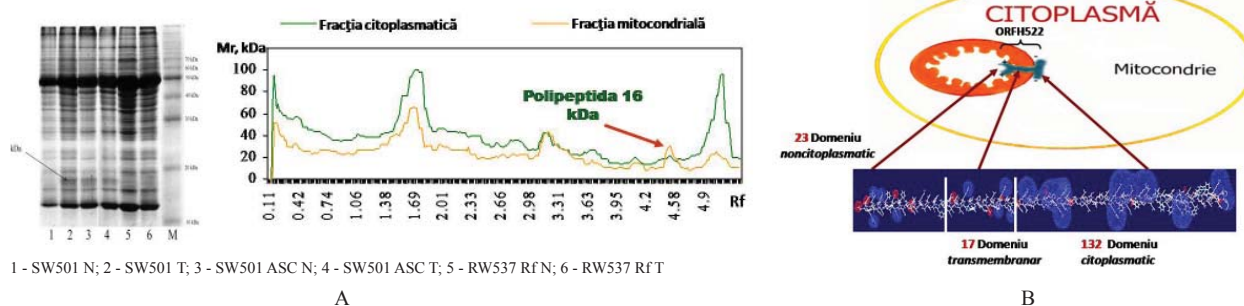


Fig. 5. Distribuire spațială a proteinelor asociate cu ASC, cu un nivel mai înalt în fracția mitocondrială – A; cu localizare în citoplasmă – B

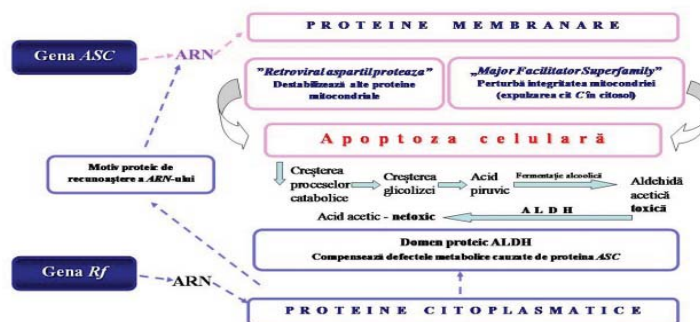


Fig. 6. Mecanismul general de interacțiune dintre componentele sistemului ASC-Rf

Expresia fenotipică a sistemului genetic ASC-Rf reprezintă totalitatea proceselor ce au loc simultan în frunză și calatidiu, fiind inițiate la anumite faze ontogenetice, preponderent în perioada de evocație florală.

Pentru stabilirea succesiunii de evenimente care se produc pe parcursul expresiei diferențiate și realizării fenotipice a factorilor ereditari ce determină androsterilitatea/androfertilitatea, prin metode de bioinformatică au fost selectate gene care manifesta afinitate față de AG<sub>3</sub> și participă la interacțiunea nucleu-mitocondrii, formând diferite rețele genice.

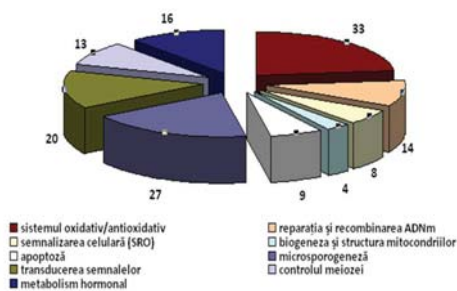


Fig. 7. Gene implicate în microsporogeneza florii-soarelui

Aceste gene, precum și grupurile de gene asociate cu microsporogeneza (fig. 7), au fost incluse într-un studiu molecular pentru a depista procesele care inițiază și determină pe parcurs derularea microsporogenezei ce se reflectă în final prin AS/AF,

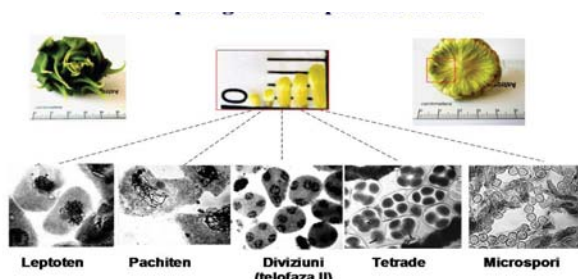


Fig. 8. Analiza citologică a anterelor la diferite etape ale microsporogenezei la plantele martor

utilizând diverse organe ale plantei și primordiile florale la diferite faze ale meiozei (fig.8).

Analiza amplificării în timp real a pus în evidență un nivel de expresie mai înalt al genelor din sistemul oxidativ (fig.9), ceea ce indică asupra ponderii majore a proceselor energetice celulare în asigurarea normală a microsporogenezei [23].

Bazele fiziologice ale acestor evenimente au fost elucidate prin studiul conținutului fitohormonilor endogeni în sistemul radicular și frunze, în calatidii la diverse etape ale ontogenezei, precum și în organele reproductive la diverse faze ale microsporogenezei.

Pe de o parte, materialul genetic selectat și anume a analogilor fertil și steril, adică a liniilor cu cromozomi izogeni care se deosebesc doar după citogene, nominalizate linii izonucleare, a liniilor Rf și a hibridului F<sub>1</sub> cu androsterilitatea restaurată, iar pe de altă parte metoda fenocopiilor, care prevede cercetarea a două stări funcționale pe același genotip, permit evidențierea și separarea modificărilor determinate de ASC-Rf de cele asociate.

Rezultatele cercetărilor efectuate au relevat anumite legități fiziologice ale creșterii și dezvoltării în general, întrucât a fost stabilită pentru prima oară dinamica conținutului de auxine și gibereline [2].

S-a constatat că variabilitatea conținutului de fitohormoni la linia tratată cu gibereline este preponderent determinată de influența factorilor ambientali (tab. 3), pe când la liniile netratate se relevă ponderea majoră a fazei ontogenetice în acumularea auxinelor în frunze și a genotipului – în acumula-

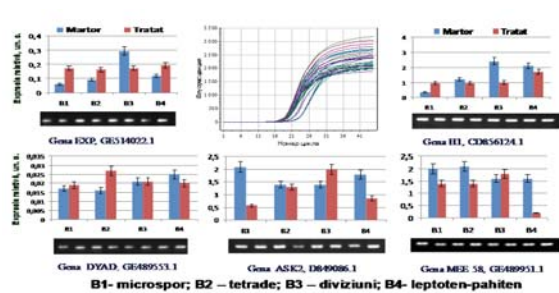


Fig. 9. Nivelul de expresie a genelor la plantele cu androsterilitate indusă

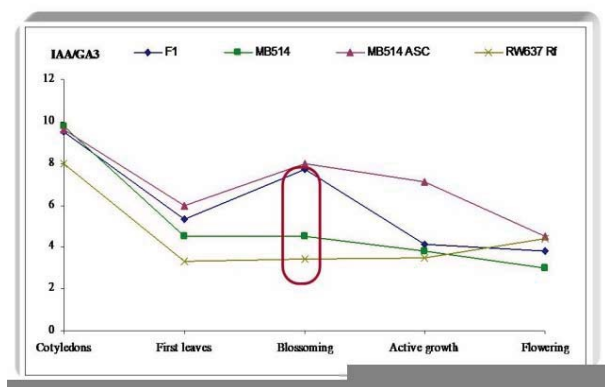


Fig. 10. Raportul AIA/AG<sub>3</sub> la diverse genotipuri de floarea-soarelui

rea giberelinelor la nivelul calatidiului, rezultate care demonstrează afinitatea diversă a organelor și rolul funcțional diferit al acestor doi fitohormoni, corelabil cu mecanisme spațial izolate (tab.4).

S-a demonstrat, de asemenea, implicarea lor directă în fiziologia dezvoltării, probându-se contribuția acestor parametri în inducția florală, evocație și gametogeneză, precum și la realizarea fenotipică a AS-AF. Astfel, linia ASC posedă un conținut redus de gibereline, iar linia restauratoare se caracterizează prin cele mai sporite cantități de AG<sub>3</sub>. Analiza raportului AIA/AG<sub>3</sub> la etapa inducției și diferențierii primordiilor florale, atestă diferențe distincte la genotipurile care alcătuiesc primul sistem (fig.10).

Aceste variații ale raportului de fitohormoni la fazele critice ale formării organelor reproductive și ale microsporogenezei relevă mecanismul fitohormonal de control al sistemului genetic ASC-Rf, întrucât în F<sub>1</sub> cu androfertilitatea restaurată (Rf-) raportul se normalizează deja la faza de creștere activă.

Modificări similare s-au stabilit și la nivelul ASC și ASI, relevând mecanismul fitohormonal de control al microsporogenezei.

Inducerea programelor fiziologice de către fitohormoni include reglarea expresiei genomului plantelor, care reprezintă un ansamblu de evenimente începând cu recepția semnalului fitohormonal în zona senzorială, decodificarea mesajului și terminând cu modificarea biosintezei ARN și proteinelor respective.

Astfel, după cum au demonstrat cercetările, concentrația fitohormonilor depinde de genotip, fază ontogenetică și organ, având o contribuție directă în autoreglarea sistemului ASC-Rf prin concentrația lor, dar în special prin raportul AIA/AG<sub>3</sub>, faza cheie constituind etapa de îmbobocire și diferențiere a conului de creștere [3; 4]. Dezvoltarea anterelor și microsporogeneza decurg normal la o cantitate suficientă de acid giberelic, iar giberelinele reprezintă factorul limită în dezvoltarea gametofitului masculin. Nivelul scăzut al acestui fitohormon la liniile androsterile și nivelul cel mai înalt, depistat

Tabelul 3

**Ponderea (%) factorilor de mediu în variabilitatea conținutului de fitohormoni la floarea-soarelui**

Indexul materialului biologic	FRUNZE		CALATIDIU	
	Auxine	Giberiline	Auxine	Gibireline
MB 514	11,50	15,48	8,15	21,17
MB 514 ASC	15,35	10,71	6,53	20,15
MB 514 t	33,20	12,60	6,7	47,99
RW 637 Rf	13,3	10,19	7,49	10,31
F <sub>1</sub>	16,3	15,82	8,43	19,26

Tabelul 4

**Ponderea diferitor factori în variabilitatea conținutului de fitohormoni la liniile izonucleare de floarea-soarelui**

Fitohormonul	Materialul biologic	P O N D E R E A, %				
		Genotip	Faza ontogenetică	Repetiții	Factori întâmplători	Interacțiuni ale variantelor
Auxine	apex	2,64	85,65	1,56	1,63	8,53
	calatidiu	11,86	42,25	1,28	1,18	23,23
Gibereline	apex	25,92	55,03	0,67	2,28	16,1
	calatidiu	77,4	3,0	1,8	0,4	17,3



la liniile restauratoare de fertilitate, reprezintă o altă confirmare a ipotezei expuse.

**Concluzii.** Cercetările efectuate pe parcursul a peste 30 de ani au scos în evidență similaritatea structurală și funcțională (*la nivel morfologic, fiziologic, biochimic și genetic, inclusiv la nivel de transcripție și translație*) a ASC și ASI. La aplicarea gibberelinelor a fost relevată expresia genei *orfH522* și sinteza *de novo* a proteinei 16 kDa, corelată cu ASC la floarea-soarelui. Aceste studii constituie o contribuție importantă la explicarea mecanismelor care stau la baza gametogenezei și deschid posibilități de dirijare a proceselor de dezvoltare la plante, iar liniile restauratoare de fertilitate, obținute de noi, au contribuit la crearea unei serii de hibrizi, 5 dintre care sunt omologați în Republica Moldova, Federația Rusă și Ucraina.

#### Bibliografie

1. Duca M., Port A., Orozco-Cardenas M., Lovatt L. Mecanisme moleculare ale androsterilității ereditare și induse la floarea-soarelui. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, 2006, N1 (298), p. 86-92.
2. Duca M. The spatial and temporal distribution of auxin and gibberellin in sunflower (*H. annuus* L.). Journal of Cell and Molecular Biology, Turcia, Halik University, 2006, v. 5, N.1, p. 43-49.
3. Duca M., Port A. Genetic-phytohormonal interactions in male fertility and male sterility phenotype in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 17<sup>th</sup> International Sunflower Conference, Crop Production-Physiology. Cordoba, Spain, 2008, p.387-393.
4. Duca M., Port A. Quantitative ratio IAA/GA of some sunflower genotypes representing CMS-Rf system. 17<sup>th</sup> International Sunflower Conference, Crop Production - Physiology. Cordoba Spain, 2008, p. 381-387.
5. Duca M., Port A., Orozco-Cardenas M., Lovatt C. Transcript analyses for mitochondrial sterile type rearrangement in sunflower. Roumanian Biotechnological Letters, 2008, vol. 13, nr. 3, p. 3701-3706.
6. Duca M., Port A., Orozco-Cardenas M., Lovatt C. Gibberellin-Induced Gene Expression Associated With Cytoplasmic Male Sterility In Sunflower. Bulgaria, Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 22/2008/2, p. 691-698.
7. Duca M., Port A., Alexandrov I., Levițchi A., Munteanu V. Studiul comparativ al *orf*-urilor asociate cu ASC la diferite specii de plante. „Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor”. Materialele Conferinței Naționale cu participare Internațională. Chișinău, 9-10 octombrie 2008, p. 70-76.
8. Duca M., Port A., Midoni A., Anisimova I. Moștenirea genelor *Rf* la diverse genotipuri de floarea-soarelui. *Studia Universitatis. Seria Științe ale naturii*. 2010, 1(31), 5-9. ISSN p. 1857-1735.
9. Horn R., Joachim E.G., Hustedt et all. The molecular basis of cytoplasmic male sterility (CMS) in sunflower//*Helia*, 1996, -V.19 -P. 44-45.
10. Kasembe J.N.R. Phenotypic restoration of fertility in a male sterile mutant by treatment with gibberelic acid //*Nature*, 1967, -V.215 -P.668-670.
11. Kusterer B., Horn R., Friedt W. Molecular mapping of the fertility restoration locus *Rf<sub>1</sub>* in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene. *Euphytica*, 2005, vol. 143, -P. 35-42.
12. Serieys H., Vincourt P. Characterization of some new CMS sources from *H. genus* //*Helia*, 1987, -V.10, -P.9-13.
13. Анащенко А.В. Химическая кастрация подсолнечника//Докл. ВАСХНИЛ, 1967, N2, с. 17-18.
14. Анащенко А.В., Дука М.В. Степень восстановления мужской фертильности у гибридов подсолнечника в зависимости от типа ЦМС в разных условиях среды. Докл. ВАСХНИЛ, 1984, № 9, с. 9-12.
15. Анащенко А.В., Дука М.В. О взаимодействии генов *Rf* у подсолнечника при восстановлении фертильности. С.х. биология, 1985, № 3, с. 84-87.
16. Анащенко А.В., Дука М.В. Типы ЦМС у подсолнечника в связи с их происхождением. С.х. биология, 1985, № 6, с. 73-75.
17. Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-*Rf* у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение 1. Восстановительная способность образцов подсолнечника в разных типах ЦМС. Генетика, 1985, № 5, с. 803-808.
18. Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-*Rf* у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение 2. Восстановление фертильности в ЦМС<sub>p</sub>. Генетика, 1985, Т. XXI, № 12, с. 1999-2004.
19. Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-*Rf* у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение 3. Восстановление фертильности в ЦМС<sub>1</sub>. Генетика, 1985, Т. XXI, № 12, с. 2005-2010.
20. Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-*Rf* у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение 4. Идентификация генов *Rf* в разных источниках. Генетика, № 1, 1986, с. 80-85.
21. Анащенко А.В., Дука М.В. Способ идентификации ЦМС у растений. АС, № 1264387, 1986.
22. Дука М.В. Идентификация гена *Rf<sub>1</sub>* восстанавливающего мужскую фертильность у гибридов подсолнечника, созданных на основе ЦМС<sub>1</sub>-типа. Докл. ВАСХНИЛ, 1984, № 6, с.44-46.
23. Дука М.В., Проблемы и перспективы развития в селекции гибридов подсолнечника. МолдНИИ-ИНТИ, 1988, 18 с.
24. Дука М.В., Глижин А., Хоменко Т. Активность АТФ-азного комплекса у различных генотипов подсолнечника (*H.annuus* L.), составляющие генетическую систему ЦМС-*Rf*. Журнал Физиологии и Биохимии культурных Растений Украинской Академии Наук, 2006, № 6, Т.38, с. 483-490.
25. Дука М.В., Глижин А., Хоменко, Т. Качественный и количественный анализ митохондриальных и цитоплазматических белков подсолнечника. Доклады Российской Академии с-х. наук, 2008, N. 3, с. 13-16.