

PROFILUL CITOLOGIC AL DIVIZIUNILOR MEIOTICE LA FLOAREA-SOARELUI CU ANDROSTERILITATE INDUSĂ DE GIBERELINE

Duca Maria, Nechifor Victoria, Port Angela

Universitatea Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

În lucrare sunt prezentate date comparative ale profilului meiotic al anterelor la plantele de floarea-soarelui fertile și androsterile (cu sterilitate citoplasmatică și cu sterilitate indusă de gibereline). Analiza macro- și microscopică a anterelor fixate în preparate citologice a pus în evidență acțiunea AG_3 prin întârzierea/inhibarea semnificativă a fazelor de dezvoltare a meiocitelor, asociate cu diverse anomalii și aberații cromozomiale în microsporogeneza plantelor cu ASI și blocarea inițierii meiozei la cele cu ASC. AG_3 a indus formarea cromozomilor retardatari, punților meiotice, micronucleilor, migrarea cromozomală precoce în 64% din meiocitele la plantele cu androsterilitate indusă.

Cuvinte-cheie: *Helianthus annuus* L., microsporogeneza, cromozomi, fertilitatea polenului, gibereline

Depus la redacție 15 noiembrie 2017

Adresă pentru corespondență: Nechifor Victoria, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 3/2, MD2028 Chișinău, Republica Moldova; E-mail: nechifor.victoria@gmail.com

Introducere

Interesul economic pentru ameliorarea culturilor de floarea-soarelui este determinat de producția semințelor, al cărui potențial biologic poate fi sporit prin cunoașterea exhaustivă a particularităților citogenetice și fiziologice de reproducere. Micro- și macrosporogeneza este frecvent perturbată de numeroși factori biotici și abiotici externi sau de cei interni, așa cum se întâmplă, deseori, în cazurile hibridizării interspecifice. Premisele de bază în opțiunea cercetătorilor pentru hibridizarea interspecifică, în calitate de metodă de ameliorare a rezistenței sistemice și specifice la patogeni, salinitate și aciditatea solului, secetă, precum și de identificare a surselor noi de gene asociate

androsterilității și restaurării de fertilitate, sunt determinate de epuizarea fondului de germoplasmă a floarei-soarelui cultivată [1, 10, 15].

Diversitatea mare a speciilor (perene și anuale, grad diferit de ploidie) din genul *Helianthus* oferă numeroase posibilități de identificare a caracterelor agronomice valoroase [1]. În același timp, această heterogenitate genetică este și cauza multiplelor anomalii în dezvoltarea gametofitului masculin, soldate cu sterilitatea polenului la descendenții interspecifici (F_1 , BC_1) și care sunt explicate sumar prin diferențele în genomul formelor parentale, chiar și atunci când ambele sunt diploide [2, 10, 13].

O formă de manifestare a incompatibilității genetice este fenomenul androsterilității citoplasmatică (ASC), exploatat pe larg în obținerea hibridilor cu grad înalt de heterozis. Actualmente sunt cunoscute peste 70 de surse ASC, majoritatea fiind obținute prin încrucișarea dintre specii indigene anuale și cele de cultură, de ex. *H. annuus*, *H. petiolaris*, *H. argophyllus* etc [11].

Investigațiile citogenetice ale androceului care au evoluat odată cu descoperirea de către Leclercq (1969) a primei surse stabile de ASC (PET1) la floarea-soarelui, au pus în evidență caracteristici diferite ale mecanismului de inducere a sterilității, degenerarea țesutului sporogen având loc în premeioză, diferite faze ale meozei I și II și chiar post-meioză [5, 6, 7, 8]. Au fost propuse diferite teorii, însă cauzele acestor diferențe temporale în degenerarea gameților masculini rămân în continuare neelucidate.

Natura aloplasmică a ASC, determinată de hibridarea interspecifică și expresia diferită a acestui caracter la genotipurile în care s-a realizat introgresia de gene, conferă actualitate și importanță studiilor citogenetice în cadrul progamelor de selecție și ameliorare a germoplasmei de floarea-soarelui. Un interes cognitiv deosebit este și specificul microsporogenezei la plantele cu sterilitate masculină cauzată de gametocide (ASI), care nu are la bază disfuncționalități generate de structura genetică diferită. Unul din cele mai eficiente gametocide se consideră acidul giberelic (AG_3), studiat preponderent în aspectul stabilirii concentrației și fazei de aplicare [14, 17].

Lucrarea prezintă analiza comparativă a profilului citologic al diviziunilor meiotice la plantele de floarea-soarelui fertile și androsterile (cu sterilitate citoplasmatică sau ereditară și cu sterilitate indusă de gibereline).

Material și metode de cercetare

Materialul biologic de cercetare este reprezentat de două linii consangvinizate de floarea-soarelui din colecția de germoplasmă a asociației A.M.G AGROSELECT, or. Soroca: SW501 (linia izogenă B, citoplasma *H. annuus*) și SW501ASC (linie izogenă A, citoplasma sterilă *H. petiolaris* Nutt.).

Condițiile de cultivare și obținere a plantelor cu androsterilitate indusă. Modelul experimental a constat în blocuri randomizate, fiecare parcelă cu 6 rânduri a câte 25 plante/rând cu distanța de semănat de 70 x 35 cm, fiind respectată tehnologia de cultivare recomandată.

Creșterea și dezvoltarea plantelor a fost monitorizată în funcție de etapele fenologice principale VE, V, R1-5 pentru a controla și evita dezvoltarea bolilor. Pe inflorescența a 20-25 de plante/variantă a fost aplicat izolatorul în scopul confirmării fenotipului (fertil sau steril) al plantelor.

Giberelinele au fost aplicate pe un număr de 50 - 55 de plante din fiecare variantă de studiu tratate prin pulverizare cu soluție apoasă de acid giberelic în concentrație

de 0,01% direct pe inflorescență în faza de butonizare R-2 [9] în raport cu un număr similar de plante – martor (stropite cu apă distilată). Astfel, variantele de studiu au inclus un fenotip al anterelor fertile (SW501) și trei fenotipuri (SW501ASC, ASI-AG₃ și ASC-AG₃) ale celor sterile.

Analiza macro- și microscopică a anterelor. Analiza morfometrică a butonilor florali și anterelor s-a realizat cu șublerul digital și ulterior la microscop (x64) prin intermediul unui soft specializat (Future Optics Sci. & Tech.). Principiul de măsurare și stabilirea corelativă a fazelor microsporozei au fost descrise în lucrarea publicată anterior [4].

Cercetarea fazelor succesive ale formării gameților masculini s-au efectuat pe aceeași inflorescență (faza R3, 4,5 cm în diametru) prin selectarea și detașarea florilor tubulare de dimensiuni mai mici de 1,0 mm și de la 1,0 până la 5,0 mm. Pentru fiecare caz experimental au fost examinate 15 antere extrase de la 5 butoni floral/per fază din 3 inflorescențe (3 repetiții individuale).

Preparatele pentru analiza citologică prin microscopie fonică au fost obținute din antere fixate în etanol: acid acetic (3:1) timp de 24 ore la temperatura camerei, spălate în mai multe reprize cu alcool etilic de 70% și colorate în acetocarmină de 1%.

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

Estimarea semnificației diferențelor s-a realizat prin intermediul testului-t, $p \leq 0,05$ prin aplicarea formulelor de calcul statistic ale aplicației Microsoft Excel. Datele din tabele reprezintă valorile medii și eroarea mediei/abaterea standard.

Rezultate și discuții

Caracteristica celulelor mamă polinice în antere. Analiza preparatelor citologice a pus în evidență fazele de diferențiere a meiocitelor până la grăunciorul de polen în cazul plantelor fertile sau până la etapa de degradare a acestora la plantele sterile.

Astfel, butonii florali de 1,0 mm la plantele fertile și androsterile conțin preponderent meiocite în leptoten. La această etapă, spiremul este format la ambele linii izogene. Populația heterogenă de meiocite devine omogenă în pachiten, în florile tubulare de 1,5 mm. Majoritatea celulelor tapetale inițial uninucleate, în această fază se divid formându-se două și mai rar trei sau patru nuclee de dimensiune și formă diferită: sferică, ovală sau alungită.

Creșterea și dezvoltarea ulterioară a organelor generative este asociată cu trăsături specifice microsporozei florilor fertile și sterile.

La linia fertilă, diachineza în tranziție spre metafază și următoarele etape succesive din meioza reduțională și cea euațională decurg rapid comparativ cu profaza I, fiind observate populații mixte de meiocite în preparatele obținute din anterele florilor tubulare de 2,4-2,9 mm, fapt care a determinat includerea acestora într-o fază generală de studiu – diviziuni.

La sfârșitul meiozei II, printr-o citochineză simultană și depozitarea calozei se separă patru nuclee haploizi formându-se tetradele cu microspori. Plasmalema celulelor tapetale devine din ce în ce mai alungită, căpătând un aspect de plasmodiu extins în interiorul lojei staminale, cu nuclee intens poliploidizate.

Dezvoltarea post-meiotică a microsporilor, inclusiv individualizarea și eliberarea acestora din tetradă, depunerea exinei primare, formarea echinulațiilor evoluează corespunzător speciei, fiind pusă în evidență dezintegrarea treptată, sincronizată a țesutului tapetal.

Microsporangiiile liniei SW501ASC atestă distrugerii ale meiocitelor în subfazele pachiten, pachiten-diploten în proporție de 80-90%, care rămân blocate în dezvoltare pe tot parcursul creșterii anterei. Majoritatea celulelor sporogene degenerază, însă în unii butoni florali cu dimensiuni mai mari de 2,5 mm a fost remarcat un număr foarte mic de microsporocite în diachineză, metafaza, anafaza, telofaza din ambele diviziuni meiotice, toate prezentând alterări ale formei și dimensiunii. Tetrade nu au fost depistate.

Aplicarea exogenă a AG_3 asupra plantelor fertile a indus modificări semnificative în celulele reproductive, acestea prezentând o formă distorsionată cu semne de colaps prematur. Particularitățile structurale anormale, caracteristice sterilității masculine au fost evidențiate în toate etapele microsporogenezei, stabilite prin asociere cu dimensiunea florilor tubulare la plantele fertile.

Anterele din butonii florali de până la 1,5 mm în lungime, corespunzător fazei leptoten la plantele fertile conțin meiocite aflate preponderent în premeioză și doar un număr foarte mic (unul sau două în câmpul de vedere) în leptoten. De asemenea, au fost constatate conglomerate de membrane și celule aglutinate. O caracteristică importantă la acest stadiu de dezvoltare este că celulele tapet slab colorate conțin un număr mai mare de nuclee față de cele ale plantelor de control, care sunt mononucleate. Creșterea în dimensiuni a anterelor prezintă leziuni vizibile în dezvoltarea celulelor reproductive. Majoritatea meocitelor rămân blocate în premeioză, fiind observate în cazuri separate câteva celule în leptoten și pachiten. Acestea sunt mai mari și cu formă neregulată spre deosebire de meiocitele bine conturate din microsporangiiul anterei normale.

În anterele florilor tubulare de 2,0-2,5 mm (faza de diviziuni) tapetumul este neuniform colorat și hipertrofiat, ocupând aproape în totalitate cavitatea sacului polinic. Similar plantelor netratate, celula tapetală a avut preponderent două nuclee, dar diferite ca formă, mult mai alungită iar în unele cazuri cromatina indica o stare de condensare ireversibilă (pinoză). Populații foarte mici eterogene de meiocite în premeioză, leptoten, zigoten și pachiten au fost observate. Unele dintre ele sunt bine conturate, cu citoplasma intens colorată, altele reprezintă celule aberante recunoscute după anomalii ale nucleelor, plasmolizare și lipsa peretelui celular.

În preparatele citologice ale anterelor tratate au fost relevate tetrade, însă majoritatea dintre ele cu pereți subțiri, cu formă și dimensiune diferită, fragmentați cu reziduri de material dens colorat în centrul microsporului. Dintre caracteristicile semnificative post-meioză ale sterilității masculine induse pot fi menționați microsporii plasmolizați fără o structurare adecvată a peretelui, conglomerate de membrane calozică și nuclee aglutinate, incapacitatea de a menține o citoplasmă intens-colorată, tapetum persistent și deteriorat selectiv. Este important de remarcat că, în preparatele unor antere tratate, mai mari de 3,5 mm se constată loculi cu populații omogene de spori sterili adiacent celor lipsiți total de microspori.

Tratarea cu AG_3 a plantelor cu ASC a inhibat procesele care asigură intrarea meiocitelor în diviziunile meiotice. Țesutul tapetal este exagerat de hipertrofiat, cu tendință accentuată de aglutinare. În unele preparate ale anterelor de 1,5 mm au fost

observate celulele tapet cu unul și mai mulți nuclei alături de celule degradate și conglomerate de nucleee expulzate din celule. Creșterea anterelor până la dimensiuni corespunzător fazelor de diviziuni, tetrade și microspori indică unul și același tablou: meiocite blocate în premeioză, unele cu dimensiuni reduse iar altele mult mai mari, celule cu nucleu periferic, citoplasmă transparentă, fragmente de membrane, nucleee libere, degradate.

În baza rezultatelor obținute se poate afirma că fenotipul celulelor mamă polinice și tapetale al anterelor sterile relevă cu certitudine abateri esențiale în desfășurarea normală a meiozei, fapt ce indică inevitabil asupra aberațiilor cromozomiale. În cazul plantelor liniei SW501ASC, inclusiv celor tratate cu giberelină, numărul foarte redus de meiocite observate, blocate în etapa incipientă a meiozei și respectiv în premeioză, asociat cu conglomerate de celule distruse este irelevant în contextul analizei iregularităților meiotice.

Aberații cromozomiale în meioza I și II. Profilul citologic al staminelor analizate la plantele cu sterilitate de tipul ASI a pus în evidență o serie de anomalii cromozomiale, reprezentate prin cromozomi retardatari, expulzați din celulă, picnotici, aglutinări cromatice, corpuri și fragmente cromatice, punți, micronuclei și microcite etc. (figura 1).

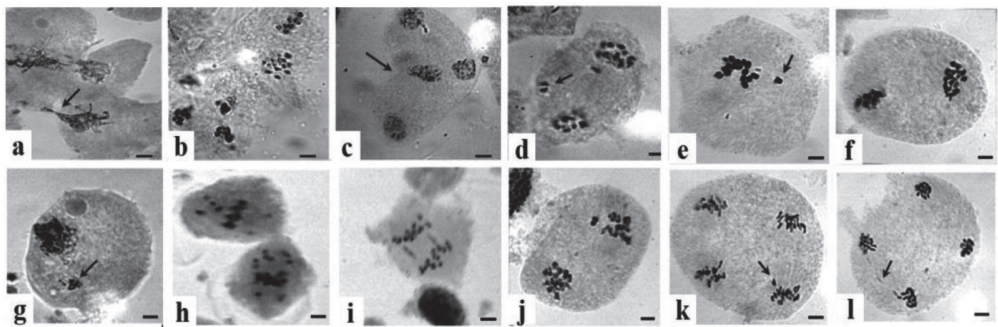


Fig. 1. Tipuri de anomalii meiotice identificate în anterele de floarea soarelui cu androsterilitate indusă. a- transferul cromatinei între două celule mamă polinice în pachiten; b- picnoza; c - telofaza II cu poziție iregulară a nucleilor; citoplasma în proces de dividere/citochineză asimetrică /inegală formând celule cu unu și trei nuclei; d - micronuclei în telofaza I; e - cromozomi neorientați în metafaza II (săgeată); f - asincronizare în diviziunea celulară, cu cromozomii la un pol în metafaza II și la celălalt în anafaza II; g - dezorganizarea cromatinei în pachiten (săgeata); h - migrare precoce a cromozomilor la poli în metafaza I; i - cromozom retardatar în anafaza I; j - cromozomi lipicioși în anafaza II; k - cromozom retardatar în anafaza II; l - Punte meiotică în anafaza II; Bara: 15 μm (a,b,c, e, f, g, j); 5 μm (d, h, i, k, l).

Din numărul total de 2175,86 \pm 5,13 celule analizate, s-a constatat că acestea se întâlnesc într-un procent (64,0 \pm 0,27%) destul de înalt (tabelul 1).

Tratarea cu AG₃ a determinat un proces intens de heterocromatinizare în faza leptoten, urmat de clusterizarea cromozomelor identificată în preparate ca aglutinarea unei mase variabile de cromozomi și care se observă în 26% din celulele analizate în metafaza I și 33% în cele din metafaza diviziunii meiotice II. Separarea unor astfel de cromozomi în anafaza I și II s-a realizat cu abateri, cauzând în anumite cazuri, formarea punților, fragmentelor și devierilor în migrarea acestora spre poli (figura 1f,l).

Fragmentele cromozomale, ulterior formează micronuclei în telofaza I și II, 65% și respectiv 43% din meiocite (figura 1d).

Tabel 1. Ponderele aberațiilor cromozomiale în anterele plantelor fertile în normă și tratate cu AG_3 .

Faza meiozei	Tipuri de aberații cromozomiale	SW501		SW501+ AG_3	
		meiocite			
		analizate (nr.)	cu anomalii (%)	analizate (nr.)	cu anomalii (%)
Total, meocite analizate la diferite faze ale meiozei		2175,86±5,13	0,82±0,04	1062,26±2,70	64,00±0,27
Metafaza I	Cromozomi neorientați Cromozomi lipicioși	302,46±0,54	1,76 ±0,17	155,00±0,83	55,05±0,68 25,95±0,53
Anafaza I	Cromozomi retardatari	312,73±1,33	0,68 ± 0,16	140±0,93	52,19±2,41
Telofaza I	Micronuclei	323,40±1,48	-	150,83±2,55	64,90±0,39
Profaza II	Micronuclei	299,20±2,41	2,58 ± 0,19	151,00±2,81	67,65±2,83
Metafaza II	Migrare cromozomială precoce Cromozomi lipicioși	305,40±1,00	0,69 ± 0,16 -	154,93±0,90	33,09±0,58 32,53±0,41
Anafaza II	Cromozomi retardatari Punți cromozomale	315,40±1,00	- -	155,26±0,82	59,12±0,60 13,52±0,52
Telofaza II	Micronuclei	317,26±0,36	-	154,73±0,74	43,08±0,60

Notă: diferențele față de martor sunt semnificative la $p \leq 0,05$

Celulele cu punți ana-telofazice II (14%) identificate în preparatele temporare, ar putea fi rezultatul atât al unei separări deficiente a cromozomilor, cât și al sudurii porțiunilor terminale ale cromatidelor surori, care au suferit deleții terminale. De asemenea, în metafaza I au fost observați cromozomi neorientați (55%), iar în metafaza II migrări precoce ale cromozomilor (33%) (figura 1e,h).

Numărul de meiocite cu aberații depistat la plantele cu fenotip ASI este diferit de la o fază la altă, cele mai multe anomalii fiind observate în metafaza I (80%) și anafaza II (72%). Cel mai frecvent întâlnite au fost meiocitele cu micronuclei, în special în telofaza I și profaza II (figura 1d).

Un alt gen de iregularitate observat include și fenomenul de asincronie în aceeași celulă, de ex. cromozomii la un pol în metafaza II și la celălalt în anafaza II, (figura 1f). Evenimente de citomixie au fost observate în special în stadiul timpuriu al profazei I (figura 1a).

La varianta fertilă, de asemenea, au fost constatate unele anomalii meiotice (migații precoce, cromozomi neorientați și retardatari și micronuclei) însă, frecvența acestora nu a depășit valoarea de 1%.

Anomalii ale tetradelor și viabilitatea polenului. După două diviziuni meiotice, plantele fertile de floarea-soarelui aveau loculi anterelor plini de microspori aranjați tetraedric cu aspect caracteristic, care ulterior se vor transforma în grăuncioare de polen. Anterele plantelor cu ASI, de asemenea au conținut tetrade, însă într-un număr foarte mic și asociate cu produse post-meiotice atipice (71,31±4,06% din numărul total de produse post-meiotice analizate), precum monade, diade, triade și poliade (figura 2a-f).

Puținele tetrade (28,68±4,60%) cu aspect tipic indică asupra unui număr mare de aberații cromozomiale din diviziunile meiotice asociate și cu alte evenimente interne,

care au loc la nivelul celulelor tapetale. Produsele post – meiotice atipice demonstrează prezența iregularităților în orientarea fusului de diviziune în meioza II.

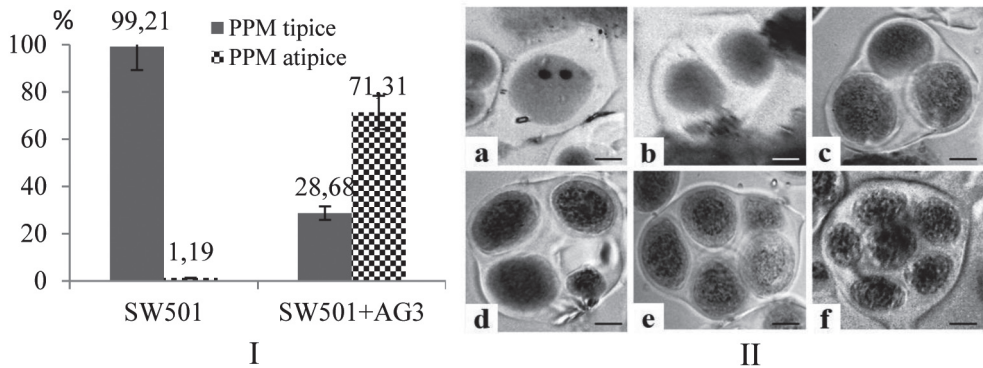


Figura 2. Tipuri de anomalii ale poduselor post-meiotice (PPM) identificate în anterele plantelor de floarea – soarelui cu androsterilitate indusă și ponderea (%) acestora.

I – ponderea procentuală a PPM tipice și atipice la varianta martor (SW501) și tratată cu giberelină; II. tipuri de anomalii ale poduselor PPM: a – monadă cu micronuclei; b – diadă; c – triadă, d – tetradă cu un microcit; e – pentadă; f – poliadă. Bar = 20 μm.

Astfel, procentual tetradele cu microciți și micronuclei au fost cele mai multe urmate de poliade (tabelul 2).

Alte caracteristici ale fenotipului cu androsterilitate indusă de gibereline includ microspori cu dimensiuni reduse, cu conturul celulelor distorsionat conferind un aspect de "stafidă", plasmolizate intens, lipsa echinulațiilor și alte aspecte (figura 3).

Tabel 2. Ponderea procentuală a produselor post – meiotice cu anomalii în anterele plantelor fertile și cu ASI.

Variante	PPM atipice	Tetrade cu:		Monade	Diade	Triade	Poliade
		micro-nuclei	micro-ciți				
SW501	1,19±0,08	0,40±0,08	-	-	0,37±0,05	0,42±0,05	-
SW501+AG ₃	71,31±4,06	9,91±1,11	20,04±1,57	9,12±1,49	6,89±1,56	10,35±1,31	14,10±1,41

Notă: Datele reprezintă valoarea medie a 15 antere. Diferențele dintre varianta martor și tratată cu AG₃ sunt semnificante ($p \leq 0,05$).

Analiza gradului de fertilitate a polenului în anterele atrofiate de acțiunea AG₃ la linia SW501 a evidențiat valori foarte mici de 10-13% de polen aparent fertil, spre deosebire de plantele liniei SW501 la care polenul a fost fertil în proporție de 99-100%, estimat după aspectul morfologic, caracteristic speciei și testului de culoare cu carmină acetică – pozitiv.

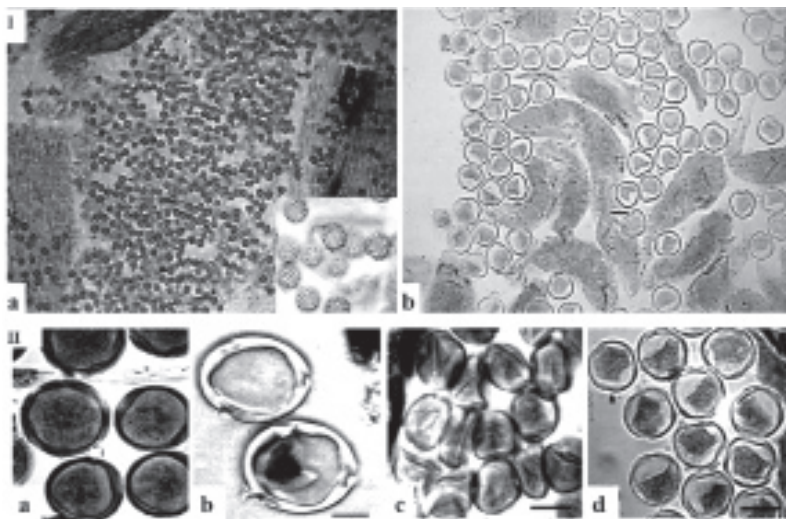


Figura 3. Carcateristici morfologice ale microsporilor asociate cu sterilitatea în anterele plantelor de floarea soarelui cu androsterilitate indusă cu AG_3 . *I* – aspect general al anterei: *a* – pline cu microspori fertili la varianta martor (SW501) și *b* – microspori sterili la varianta tratată cu giberelină; *II* – caracteristici ale microsporilor cu fenotip steril: *a* – fertili; *b* – fără conținut; *c* – cu aspect de stafidă; *d* – plazmolizați. Bar = 20 μ m.

Generalizând rezultatele obținute putem afirma că analiza citologică comparativă a anterelor fertile, cu sterilitate citoplasmatică și cu androsterilitate indusă relevă acțiunea gametocidă a giberelinei prin blocarea inițierii diviziunilor meiotice la plantele cu ASC și întârzierea/inhibarea semnificativă a fazelor de dezvoltare a microsporilor, asociată cu diverse anomalii în diviziunile meiotice și de structură la fenotipul ASI. Efectele AG_3 , care se reflectă prin hipersecreția calozei cu formare de conglomerate membranare, polimorfismul înalt în dimensiunea și forma microsporilor, hipertrofia și endopoliploidia celulelor tapetale, etc. poartă în mare parte un caracter nespecific fiind similare cu cele ale altor gametocide utilizate în inducerea sterilității la floarea-soarelui, cum ar fi cele menționate la tratarea plantelor cu benzotriazol de 1,5% [12], diferite concentrații de benzo(a)pyrene [3], ethrel [11], dimetilsulfat [16].

Concluzii

Analiza citologică comparativă a anterelor fertile, cu sterilitate citoplasmatică și cu androsterilitate indusă relevă particularități specifice procesului de blocare a microsporogenezei și inducere fenotipică a sterilității polenului, determinate de distrugerii ale meiocitelor în subfazele profazei I în proporție de 80-90%, care rămân blocate în dezvoltare pe tot parcursul creșterii anterei la SW501ASC și întârzierea/inhibarea semnificativă a fazelor de dezvoltare a microsporilor, asociată cu anomalii în diviziunile meiotice și de structură la plantele cu ASI.

AG_3 a indus diverse iregularități și aberații, inclusiv cromozomi retardatari, punți meiotice, micronuclei, migrarea cromozomală precece în 64% din meiocitele analizate la SW501 asociate formării unui fenotip steril, în timp ce la plantele SW501ASC+ AG_3 a blocat inițierea diviziunilor meiotice.

Anterele plantelor cu ASI s-au evidențiat printr-un conținut înalt (71,31%) de produse post-meiotice atipice precum monade, diade, triade și poliade, microspori cu dimensiuni reduse, conturul celulelor distorsionat, plasmolizate intens, lipsa echinulațiilor caracteristice speciei.

Referințe

1. *Atlagić J.* Roles of interspecific hybridization and cytogenetic studies in sunflower breeding. //HELIA, 27, Nr. 41, 2004, P. 1-24,
2. *Atlagić J., Terzić S.* Cytogenetic study of hexaploid species *Helianthus tuberosus* and its F1 and BC1F1 hybrids with cultivated sunflower, *H. annuus* //Genetika. –Vol. 38, No. 3. 2006, P. 203-213.
3. *Baghali Z., Majd A., Chehregani A., Pourpak Z.* Cytotoxic effect of benzo(a)pyrene on development and protein pattern of sunflower pollen grains. //Toxicological & Environmental Chemistry, 93:4, 2011, P. 665-677.
4. *Duca M., Port A., Nechișor V.* Corelarea dimensiunii florilor tubulare și anterelor cu fazele microsporogenei și microgametogenezei la *Helianthus annuus* L. //Materialele Simpozionului Științific Internațional „Agricultura modern – realizări și perspective”, dedicate aniversării a 80 de ani de la fondarea UASM, Lucrări științifice: Agronomie și ecologie, Chișinău, 2013, 39, P. 59-63.
5. *Horner H.T.*, A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). //Am. J. Bot., 64, 1977, P. 745-759.
6. *Leclercq P.* Une stérilité cytoplasmique chez le tournesol. //Ann. Amélior. Plant. – 1969. – V. 19. – P. 99-106.
7. *Meric C., Dane F., Olgun G.* Histological aspects of anther wall in male fertile and cytoplasmic male sterile sunflower (*Helianthus annuus* L.). //HELIA, 26, Nr. 39, 2003, P. 7-18.
8. *Paun, L.,*. The cytologic mechanism of male sterility in sunflower. //Proc. of the 6th Inter. Sunfl. Conf., Bucharest, Romania, 22-24 July, 1974, P. 249-257.
9. *Schneider, A.A., J.F. Miller.* Description of Sunflower Growth Stages. //Crop Sci. 21, 1981. P. 901-903.
10. *Skorić D.* Sunflower genetics and breeding. //Novi Sad: Serbian Academy of Sciences and Arts, Branch; 2012. XV. P. 520.
11. *Tripathi S.M., Mani S.* Ethrel Induced Male Sterility in *Helianthus Annuus* L. //Int. J. Mendel, Vol. 24, No. 3-4, 2010, P. 131-132.
12. *Tripathi S.M., Singh K.P.* Abnormal anther development and high sporopollenin synthesis in benzotriazole-treated male sterile *Helianthus annuus* L. //Indian J Exp Biol. 46(1), 2008, P. 71-78.
13. *Yushkina L.L., Nesterova E.V., Kyrychenko V.V., Dolgova T.A., Popov V.N.* Cytogenetic study of an interspecific hybrid *Helianthus praecox* × *H. annuus*, its parental forms and two backcrosses //Cytol. Genetics 43(1), 2009, P. 42-47.
14. *Анащенко А.В.* Мужская стерильность модификационного характера у подсолнечника. //С.-х. биология. – 1968. – Т. 3, № 4. – С. 544-549.
15. *Анащенко А.В., Кукош М.В.* Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). //Сообщ. I. Восстановительная способность образцов подсолнечника в разных типах ЦМС // Генетика. – 1985. – Т. 21, № 5. – С. 803-808.
16. *Кириченко В. В., Васько В. О.* 2015. Мутантное действие диметилсульфата на мейоз м1 подсолнечника. // Селекция і насінництво. Випуск 108, 2015. 99-105 с.
17. *Федоренко Т.С., Воскобойник Л.К., Прокопенко А.И.* Влияние гиббереллина на формирование органов подсолнечника // НТБ ВНИИМК. – 1986. – С.25-30.