**وزارت جهاد کشاورزی**

**سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی**

**موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر**

نشریه فنی

# استفاده از ژرم‌پلاسم وحشی در تولید لاین‌های والدینی هیبریدهای آفتابگردان

**نگارندگان**

**مسعود سلطانی نجف آبادی[۱]، مهدی غفاری[۲]**

[۱]- عضو هیات علمی بانک ژن گیاهی ملی ایران

[۲]- عضو هیات علمی بخش تحقیقات دانه‌های روغنی

# بسم الله الرحمن الرحيم

## فهرست مطالب


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| مقدمه | ۱ |
| مراحل تهیه لاین‌های اینبرد با استفاده از قابلیت‌های ژرم پلاسم وحشی آفتابگردان | ٤ |
| الف- تهیه والدین | ٤ |
| الف-۱- تهیه لاین بازگرداننده باروری | ٤ |
| الف-۱-۱- تایید وجود ژن برگشت دهنده باروری در ژرم‌پلاسم وحشی | ٥ |
| الف-۱-۲- خود گشنی متوالی نتاج حاصل از تلاقی بین گونه‌ای | ۸ |
| الف-۱-۲-۱- انتخاب برای صفت چند شاخگی | ۹ |
| الف-۱-۳- انجام تلاقی برگشتی با والد اینبرد | ۱۰ |
| الف-۱-۴- انتخاب برای تحمل به خشکی | ۱۱ |
| الف-۲- تهیه والد مادری نر عقیم | ۱۱ |
| ب- ترکیب پذیری والدین | ۱۳ |
| مزایای استفاده از ژرم‌پلاسم وحشی در ایجاد هیبریدهای آفتابگردان | ۱۳ |
| معایب استفاده از ژرم‌پلاسم وحشی در تلاقی‌ها | ۱٤ |
| تشکر و قدردانی | ۱٤ |
| منابع | ۱٤ |

**مقدمه**

آفتابگردان یکی از دانه‌های روغنی مهم در اقتصاد جهانی است. سازگاری این گیاه به انواع شرایط آب و هوایی سبب شده این گیاه صنعتی از عرض‌های جغرافیایی بالا (در روسیه و اوکراین) تا عرض‌های پایین مانند فرانسه و آمریکای مرکزی کشت شود. درصد روغن ارقام جدید آن به حدود ۴۵ درصد می‌رسد و دارای روغن با کیفیت تغذیه‌ای خوبی می‌باشد. عملکرد دانه آن در ارقام هیبرید تا چهار تن نیز گزارش شده است.

ارقام آفتابگردان به دو صورت آزاد گرده افشان و هیبرید وجود دارند. تا قبل از تولید تجاری هیبریدها، ارقام آزاد گرده افشان تنها گزینه تولید آفتابگردان در سطح تجاری بودند. این ارقام به‌دلیل نایکنواخت بودن در زمان رسیدگی و نیز تنوع در ارتفاع بوته‌ها، مشکلاتی در مسیر تولید و برداشت مکانیزه فراهم می‌نمایند. همچنین به دلیل وجود انواع ژنوتیپ‌ها، میانگین کلی جمعیت در یک رقم آزاد گرده افشان در شرایط مطلوب چندان بالا نیست. مزیت این ارقام همان وجود تنوع درون جمعیتی است که خاصیت بافری به جمعیت داده و باعث به دست آمدن عملکردی متوسط در شرایط محیطی نامناسب می‌شود.

کشت آفتابگردان در قدیم و در محل پیدایش آن بیشتر برای خوراک پرندگان و استفاده‌های دارویی بوده است. به‌تدریج کشاورزان اولیه با انتخاب‌های هوشمندانه، دست به انتخاب انواعی از بوته‌ها که دارای روغن بیشتر بود، زدند. با گسترش کشت آن از امریکا به شوروی سابق توسط بازرگانان، موضوع اصلاح این گیاه وارداتی در شوروی شکل گرفت. بخشی از انتخاب‌ها در جهت تولید انواع آجیلی انجام شد که ماحصل آن ایجاد ارقام آزاد گرده افشان متعدد با مصرف آجیلی است. اما بخش عمده تحقیقات در جهت افزایش درصد روغن انجام گرفت که ارقام چرنیانکا، آرماویرسکی، آرماویرس و رکورد ماحصل این تلاش‌ها است.

تولید تجاری هیبرید در آفتابگردان مرهون شناسایی سیستم نر عقیمی (یعنی سیتوپلاسم نر عقیم و ژن برگشت دهنده باروری متناظر آن) بود. با کشف سیتوپلاسم نر عقیم در آفتابگردان در سال موضوع تولید ارقام هیبرید در دستور کار به نژاد گران گیاهی قرار گرفت. تا قبل از این کشفیات، هیبریدهایی از آفتابگردان تولید شده بود که به دلیل دشواری فوق العاده در عقیم سازی پایه مادری، توسعه چندانی نیافتند.

نرعقیمی سیتوپلاسمی (Cytoplasmic Male Sterlity , CMS) صفتی است که گیاهان واجد آن قادر به تولید گرده بارورنیستند و یا در اساس گرده‌ای تولید نمی‌کنند. معمولا این ویژگی بواسطه بازآرایی در ناحیه ای از ژنوم میتوکندری ایجاد می‌شود که جریان تامین و تولید انرژی را در دانه گرده مختل می‌نماید.

اولین سیتوپلاسم نر عقیم آفتابگردان توسط لکلرک در سال ۱۹۶۹ و در طی تلاقی تلاقی بین گونه ای *Helianthus petiolaris* Nutt. a و آفتابگردان زراعی شناسایی شد که آن‌را سیتوپلاسم PET1 نامگذاری کرد. پس از آن و در سال ۱۹۷۰، کینمن ژن برگشت دهنده باروری برای سیتوپلاسم PET1 را شناسایی نمود (Kinman 1970) و آن‌را RF1 نامید. تا مدتها سیستم PET1-RF1 تنها سیستم نر عقیمی مورد استفاده در تولید هیبرید آفتابگردان بود. در حال حاضر نیز این سیستم تنها سیستم مورد استفاده در تولید هیبریدهای تجاری در سطح جهان است(Jan *et al*., 1998) .

با پیشرفت تحقیقات در خصوص نرعقیمی آفتابگردان، در سالهای بعد انواع بیشتر سیتوپلاسم نر عقیم شناسایی شد. در سال ۱۹۹۴، Serieys لیستی از منابع سیتوپلاسم نر عقیم تا آن زمان را که بالغ بر ۴۹ مورد بود را منتشر نمود (Serieys 1994). در سال ۲۰۰۵ تعداد منابع سیتوپلاسم نر عقیم در آفتابگردان بیش از ۷۰ مورد اعلام شد(Serieys, 2005) ، با این حال تا کنون PET1 تنها سیتوپلاسم مورد استفاده در تولید تجاری هیبریدهای آفتابگردان بوده است. فقدان لاین‌های واجد ژن برگشت دهنده باروری (لاین بازگرداننده باروری) و نشانگرهای مولکولی که دارای پیوستگی بالایی با این ژن‌های بازگرداننده باروریباشند مانعی برای استفاده از سیتوپلاسم نر عقیم جدید و ایجاد خزانه لاین‌های بازگرداننده باروری و نگه دارنده برای این سیتوپلاسم‌های نر عقیم جدید بوده است. استفاده از فقط یک سیستم CMS-PET1/Rf1 خطراتی نظیر آن‌چه برای کمربند سبز ذرت اتفاق افتاد را به همراه خواهد داشت. در دهه‌های ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ سیتوپلاسم T ذرت به طور گسترده برای تولید هیبرید ذرت مورد استفاده قرار می گرفت. در سال‌های ۱۹۶۹ و ۱۹۷۰ بیماری بلایت برگی ذرت ناشی از قارچ *Bipolaris maydis* به تواحی جنوب و مرکزی ایالات متحده حمله نمود. در این هجوم ذرت‌های واجد سیتوپلاسم T شدیدا آسیب دیدند. پس از آن استفاده از سیتوپلاسم‌های متعدد به جای یک سیتوپلاسم مورد تاکید قرار گرفت (Levings 1993). این موضوع در آفتابگردان نیز دنبال شد و تحقیقات فراوانی برای شناسایی سیتوپلاسم‌های نر عقیم جدید و ژن‌های برگشت دهنده باروری سازگار با آنها انجام شد.

در سال ۱۹۸۰، Whelanو Dedio از تلاقی بین گونه ای *Helianthus petiolaris* و *H. annuus* سیتوپلاسم نر عقیم جدیدی به نام CMS PET2 که CMG-1 نیز نامیده میشود را به دست آوردند. که متفاوت از سیستم PET بود. از نظر مولکولی نیز ثابت شده که لوکوس‌های متفاوتی در ایجاد نر عقیمی بین این دو سیتوپلاسم دخیل هستند ( Hans Köhler *et al*., 1991; Horn, 2002; Horn *et al*., 1996).

در سال ۱۹۸۱ Whelan در تلاقی بین گونه ای *H. gigantheus* با *H. annuus* سیتوپلاسم نرعقیمی شناشایی کرد که CMS gig نام گرفت. در آن زمان از بین سه منبع ژن برگشت دهنده باروری، تنها یک منبع قادر به بازگرداندن باروری به این سیتوپلاسم بود (Whelan, 1981). از نظر نحوه ایجاد نر عقیمی، سیتوپلاسم PET1 و GIG دارای مشابهت‌هایی هستند ;Horn & Friedt, 1999) (Horn *et al*., 1991. در سال ۱۹۸۰ سیتوپلاسم نر عقیم PEF1 حاصل از تلاقی بین گونه ای *H. petiolaris* ssp *fallax* با *H. annuus* گزارش گردید (Serieys, 1984). مطالعات مولکولی حاکی از وجود مولفه‌های مشترک در لوکوس‌های عامل ایجاد این نرعقیمی با سیتوپلاسم PET2 بوده است(De la Canal *et al*., 2001) .

بموازات شناسایی منابع سیتوپلاسم‌های نرعقیم جدید،، تلاش برای یافتن ژن‌های بازگرداننده باروری برای منابع مختلف سیتوپلاسم نر عقیم به موازات شناسایی منابع جدید نرعقیمی انجام گرفته است. برای مثال در تلاقی آزمون بین منابع سیتوپلاسم نر عقیم شامل (Serieys, 1994)ANL1 ، (Heiser, 1982)ANL2، (Whelan, 1980)MAX1، (Serieys, 1984)PEF1، ( Whelan, 1981)PET2، (Serieys, 1984)ANN1، ANN2، ANN3 و ANN4 با لاین‌های بازگرداننده باروری و نگه دارنده سیستم PET1 ایجاد شده تا سال ۱۹۹۷، یک لاین بازگرداننده باروری برای سیستم PET1، قادر به برگشت کامل باروری به سیتوپلاسم PET2 بود (Horn & Friedt, 1997).

اولین ژن برگشت دهنده باروری در آفتابگردان RF1 بود که در لاین T66006-2-1 در برنامه‌های اصلاحی شناسایی شد. این ژن قادر به بازگرداندن باروری سیتوپلاسم PET1 بود (Kinman, 1970). ژن RF3 اولین بار در تلاقی *H. annuus* با *H. argophyllus*

توسط Miller و Gulya در سال ۱۹۹۸ در تلاش برای شناسایی ژن‌های مقاومت به سپیدک کرکی گزارش شد ( Miller & Gulya, 1988). لکلرک در ۱۹۷۱ به حضور یک ژن برگشت دهنده باروری به نام MSC1 اشاره کرده بود. در همین گزارش اشاره شده بود که این ژن احتمالا همان RF3 باشد. Abratti و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که ژن RF3 کاملا با دو ژن RF1 و RF2 متفاوت بوده و حتی بر روی گروه‌های لینکاژی متفاوتی قرار دارند و در حین تلاقی آفتابگردان زرا عی با *H. argophyllus* برای انتقال یک ژن مقاوم به سپیدک کرکی منتقل شده بود (Abratti et al., 2008). این ژن در اصلاح آفتابگردان آجیلی نیز به کار رفته است ( Liu et al., 2012) و قادر به بازگرداندن باروری در نرعقیمی ناشی از سیتوپلاسم PET1 است (Jan & Vick, 2007) اما کاملا متفاوت از RF1 وRF2 هست به طوری که حتی بر روی گروه‌های لینکاژی متفاوتی مکان یابی شده‌اند (RF1 و RF2 بر روی گروه لینکاژی LG13 و RF3 بر روی گروه لینکاژی LG7).

ژن RF4 قادر به برگشت باروری در سیتوپلاسم CMS GIG2 بود. این ژن در گونه *H. maximiliani* توسط Feng و Jan (۲۰۰۸) شناسایی شد. سیتوپلاسم GIG2 کاملا متفاوت از سیتوپلاسم GIG1 بوده که هر دو از در تلاقی *H. annuus* با *H. giganteus* ایجاد شدند. مکان این ژن بر روی گروه لینکاژی LG3 قرا ردارد (Feng & Jan, 2008). برای سیتوپلاسم GIG1 هنوز ژن بازگرداننده باروریی شناسایی نشده است.

در تلاش برای شناسایی و انتقال مقاومت به زنگ آفتابگردان به آفتابگردان زراعی، از یک گونه وحشی *H. annuus* با شماره دسترسی PI 6137748 از اوکلاهما امریکا، استفاده شد (Qi *et al*., 2012) که در تلاقی با انواع لاین‌های نر عقیم مشخص شد دارای ژن برگشت‌دهنده باوری جدید است که آن‌را RF5نامیدند (Qi *et al*., 2011). مکان این ژن نیز بروی روی گروه لینکاژی LG13 و در نزدیکی RF1 است(Qi *et al*., 2012).

در سال ۲۰۰۷ یک سیتوپلاسم نر عقیم جدید از تلاقی بین گونه‌ای *H. annuus* و *H. tuberosus* در چین ایجاد شده است (Dexing & Liangji, 2007). ژن‌های بازگرداننده باروری که تا آن سال شناسایی شده بودند برای غلبه بر این سیتوپلاسم مورد استفاده قرار گرفت، ۳۳ لاین بازگرداننده باروری و نگه دارنده از پنج کشور دنیا و نیز ۲۰ لاین بازگرداننده باروری از دپارتمان کشاورزی آمریکا (USDA–ARS) که معمولا برای شناسایی ژن‌های بازگرداننده باروری به کار می‌روند قادر به بازگرداندن باروری به این سیتوپلاسم نبودند. این موضوع گویای وجود یک سیتوپلاسم نرعقیم منحصر به فرد در مقایسه با سیتوپلاسم های CMS PET-1, CMS CMG1, CMS CMG2, and CMS CMG3 است (Dexing & Liangji, 2007). لیو و همکاران (۲۰۱۳) موفق به شناسایی ژن بازگرداننده باروریی که باروری را به این سیتوپلاسم اعاده می‌کند شدند و آن‌را RF6 نامیدند. این ژن از گونه آمفی‌پلوییید *H. angustifolius* به‌دست آمد. ژن RF6 بر روی گروه لینکاژی LG3 نقشه یابی شده است (Liu *et al*., 2013).

ژن RF1 به طور وسیعی در برنامه های اصلاحی آفتابگردان وارد شد و در سطح جهان منتشر گردید. ژن RF2 ژن دوم بازگرداننده باروری در آفتابگردان بود که شناسایی شد. این ژن تقریبا در تمامی لاین های اینبرد وجود دارد و نقش مکمل برای RF1 را در بعضی ژنوتیپ ها ایفا می‌کند. (Serieys, 2005) بنابراین RF1 ژن اصلی در برنامه های اصلاحی تولید هیبرید آفتابگردان می باشد (Leclercq & Philippon, 1984) و سه سیستم نرعقیمی PET1-RF1، GIG-MAXI و Tub-Angusti مجزا تا کنون در آفتابگردان گزارش شده است.

در سال ۲۰۱۹، با استفاده از اطلاعات مولکولی نقشه مرجع ژنوم آفتابگردان و طراحی نشانگرهای مولکولی، تلاش برای نزدیک شدن تا حدامکان به لوکوس RF1 انجام شد (Horn *et al*., 2019). در سال ۲۰۲۳، فاصله نشانگر تا لوکوس RF1 کاهش یافته و لیست تعداد ژن‌های کاندیدا به سه ژن بسیار پیوسته با یکدیگر کاهش یافت. تحقیق برای یافتن نشانگرهای مبتنی بر ژن برای RF1 ادامه دارد (Sivolapova *et al*., 2023).

جدای از شناسایی و انتقال سیستم های نر عقیمی، استفاده از گونه‌های وحشی در اصلاح آفتابگردان برای انتقال صفاتی نظیر مقاومت به انواع بیماری‌ها مانند پژمردگی ورتیسیلومی، زنگ سفید، زنگ آفتابگردان(Gutierrez *et al*., 2012) و تنش‌های غیر زنده (Mercer *et al*., 2007; Škorić, 2009) رایج می‌باشد (Gutierrez *et al*., 2012). گونه *H. argophyllus* منبعی برای ژن‌های مقاومت به سپیدک کرکی (PlArg) و نیز تحمل به خشکی، بواسطه وجود کرک‌های نقره‌ای کوتیکولی شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به این‌که این گونه واجد ژن RF3 است (Abratti *et al*., 20 ) استفاده از آن در برنامه‌های تولید لاین‌های بازگرداننده باروری مقاوم به بیماری سپیدک کرکی و متحمل به خشکی مورد تاکید است (Hussain et al., 2017).

با توجه به اینکه آفتابگردان بومی ایران نبوده و دارای پایه ژنتیکی محدود می‌باشد ، استفاده از گونه‌های وحشی، ضمن استفاده از تنوع بالای موجود در ژرم پلاسم وحشی، امکان کاهش ضریب خوش آمیزی در بین لاین‌های حاصل از ورود این ژرم پلاسم به برنامه‌های اصلاحی را فراهم می آورد که نتیجه بلافصل آن، افزایش هتروزیس در هیبریدها است. در این دستور العمل، شیوه استفاده از ژرم‌پلاسم وحشی در تولید لاین‌های والدینی هیبریدهای آفتابگردان تشریح خواهد شد.

## مراحل تهیه لاین‌های اینبرد با استفاده از قابلیت‌های ژرم پلاسم وحشی آفتابگردان

### الف- تهیه والدین

برای تولید هیبرید در آفتابگردان نیاز به در دسترس بودن سه نوع لاین است. لاین بازگرداننده باروری یا لاین پدری، لاین نر عقیم و لاین نگه‌دارنده نر عقیمی. در زیر مراحل تهیه هر سه این لاین‌ها با استفاده از قابلیت‌های ژرم پلاسم وحشی آفتابگردان با تمرکز بر تحمل به تنش خشکی توضیح داده می شود:

### الف-۱- تهیه لاین بازگرداننده باروری

وجود ژن های برگشت دهنده باروری (RF) در منابع مختلف گزارش شده است. ژن برگشت دهنده باروری که در حال حاضر در هیبرید های تجاری در سطح جهان، و بالطبع ایران، وجود دارد RF1 است(Yue et al., 2010) . گونه *H. argophyllus* واجد ژن برگشت دهنده باروری RF3 می باشد. در این بخش نحوه انتقال این ژن از ژرم پلاسم وحشی به پس زمینه زراعی *H. annuus* تشریح می‌شود.

قبل از شروع فرایند انتقال، باید با استفاده از نسل‌های متوالی خودگشنی اقدام به ایجاد لاین‌های اینبرد به‌عنوان پایه گیرنده ژن کرد. بذر گونه *H. argophyllus* با شماره دسترسی HEL 588 از بانک ژن گیاهی آلمان، IPK، و بذر لاین نرعقیم (A-line) از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی قابل تهیه است. این گونه وحشی چند شاخه، چند طبق، دارای برگ‌های کوچک و لایه مومی و کرک‌های نقره در سطح برگ (شکل ۱) است. وجود دو ویژگی اخیر سبب ایجاد تحمل به خشکی در این گونه شده است.

الف-۱-۱- تایید وجود ژن برگشت دهنده باروری در ژرم‌پلاسم وحشی

به منظور تایید وجود ژن بازگرداننده باروری، بذر گونه‌های وحشی در گلخانه و یا مزرعه کشت می‌شود و به دلیل عدم همزمانی گلدهی گونه‌های وحشی و زراعی، باید تاریخ کاشت را با تمرکز بر امکان ایجاد تلاقی بین این دو گونه تنظیم نمود.پس از ظهور طبق‌های گونه زراعی، طبق‌ها به منظور ممانعت از باروری با گرده‌های ناخواسته، با کیسه‌های مخصوص خودگشنی آفتابگردان پوشانده می‌شوند . از آنجا که طبق‌های گونه وحشی معمولا کوچک هستند، برای جمع آوری گرده کافی برای تلاقی‌های بعدی، طبق‌های متعددی از یک بوته پوشانده می‌شوند (شکل ۱).

شکل ۱. کشت و مشخصات گونه وحشی *H. argophyllus* الف: وجود لایه مومی و کرک های سفید بر روی برگ‌ها. ب: تعداد زیادی طبق زیر توری و یا کیسه‌های مخصوص خود گشنی برده می‌شوند (سلطانی نجف آبادی ۱۳۹۴).

در زمان مشاهده گرده روی گلچه‌های لوله‌ای گونه‌های وحشی، گرده‌ها با تکان دادن و ضربه ملایم به پشت طبق بر روی کاغذهای کالک، جمع‌آوری می‌شوند (شکل ۲). سپس گرده تا پیدا شدن طبق مناسب از گونه زراعی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و محیط خشک نگه‌داری خواهد شد. انتقال گرده از کاغذ کالک روی طبق گونه زراعی نر عقیم (شکل ۳) توسط پنبه و در صبح انجام می‌گیرد و پس از آن، کیسه مخصوص خود گشنی مجددا بر روی طبق گونه وحشی قرار داده می‌شود.

شکل ۲. گرده‌گیری از طبق گونه وحشی. با ضربه زدن ملایم پشت طبق، گرده‌ها بر روی کاغذ کالک ریخته می‌شوند. (عکس اصلی)

شکل. ۳. مقایسه شکل ظاهری طبق دو بوته نر بارور (چپ) و نرعقیم (راست). (عکس اصلی)

پس از مرحله رسیدگی فیزیولوژیک، طبق‌های گونه زراعی و نیز گونه‌های وحشی جداگانه برداشت، بذور تشکیل شده بر روی طبق گونه زراعی و نرعقیم ( بذور $F_1$) با زدن ضربه به پشت طبق از طبق جدا و جمع‌آوری می‌شوند.

مشخصات فنوتیپی بوته‌های $F_1$ حاصله ارزیابی خواهند شد. برای مثال گرده دار بودن یا نبودن، وضعیت شاخه‌دهی (تک شاخه یا چند شاخه) و ارتفاع بوته. معمولا اندازه برگ‌های بوته‌های $F_1$ کوچک‌تر از برگ‌های والد زراعی هستند، ارتفاع بوته‌ها بلندتر از ارتفاع هر دو والد و طبق‌ها کوچکتر از طبق والد زراعی و بزرگتر از طبق والد پدری هستند. همچنین وجود پرزهای نقره‌ای بر روی برگ های نتاج $F_1$ مشهود است (شکل ۴). برای بررسی نوع توارث ژن برگشت دهنده باروری، ضمن خودگشن نمودن بوته‌های $F_1$ ، اقدام به تلاقی برگشتی از طریق انتقال گرده از طبق بوته‌های $F_1$ به طبق لاین نر عقیم زراعی (والد دوره‌ای) می‌شود. مشاهده نسبت‌های ژنتیکی بین بوته‌های نربارور و نرعقیم تعیین کننده نوع توارث ژن(های) برگشت دهنده باروری است. معمولا در تلاقی‌هایی با مشارکت یک گونه زراعی نرعقیم و گونه *H. argophyllus* ، نسبت ۳ نربارور به ۱ بوته عقیم در نتاج خود گشنی و نسبت ۱ بارور به ۱ عقیم در نتاج تلاقی برگشتی، به‌دست می‌آید(سلطانی نجف آبادی، ۱۴۰۳) که گویای وجود یک ژن غالب برگشت دهنده باروری در ژرم پلاسم وحشی مورد استفاده است. وجود چنین نسبت‌هایی بین بونه‌های نرعقیم و نربارور در نتاج تلاقی‌های بین گونه‌ای با شرکت گونه *H. argophyllus* و یک لاین اینبرد نرعقیم از گونه *H. annuus* مشاهده شده است (جدول۱). همچنین مشاهده بوته‌های واجد کرک‌های نقره‌ای بر روی برگ نتاج (با هر نسبتی) گویای انتقال موفقیت صفات مرتبط با تحمل به خشکی به نتاج تلاقی بین گونه ای است. تشکیل بذور حاصل از خودگشنی نشان از طبیعی بودن مرحله میوز و جفت شدن صحیح کروموزوم‌ها دارد که معیاری از سازگاری ژنتیکی بین گونه مورد تلاقی است.

شکل ۴. مشخصات طبق و بوته نتاج $F_1$ تلاقی بین گونه‌ای لاین نر عقیم زراعی آفتابگردان با *H. argophyllu* (الف) بوته هیبرید بین گونه‌ای، وجود پرزهای نقره ای بر روی برگ‌ها مشهود است، (ب) طبق هیبرید بین گونه‌ای در انتهای گلدهی (ج)، طبق هیبرید بین گونه‌ای در شروع گلدهی و (د) طبق گونه *H. argophyllus* (عکس اصلی)

جدول ۱. خلاصه وضعیت نتاج نسل اول، نسل دوم و تلاقی برگشتی در تلاقی‌های بین دو گونه وحش آفتابگردان و یک لاین نرعقیم زراعی (سلطانی نجف آبادی، ۱۴۰۳)

| گونه وحشی | نتاج $F_1$ | $F_2$ | نتاج $BC_1$ |
|---|---|---|---|
| *H. argophyllus* | ۱۲ بوته بارور (از ۱۲ بوته) | ۱۶ بوته بارور، ۴ بوته عقیم (از مجموع ۲۰ بوته) | ۹ بوته بارور ، ۱۱ بوته عقیم (از مجموع ۲۰ بوته) |

شکل ۵. تلاقی برگشتی لاین نرعقیم زراعی با گرده‌های هیبرید بین گونه‌ای *H. annuus ×H. argophyllus* (عکس اصلی)

به منظور تهیه والد بازگرداننده باروری، ی یکی از دو روش زیر مورد استفاده قرار می‌گیرد:

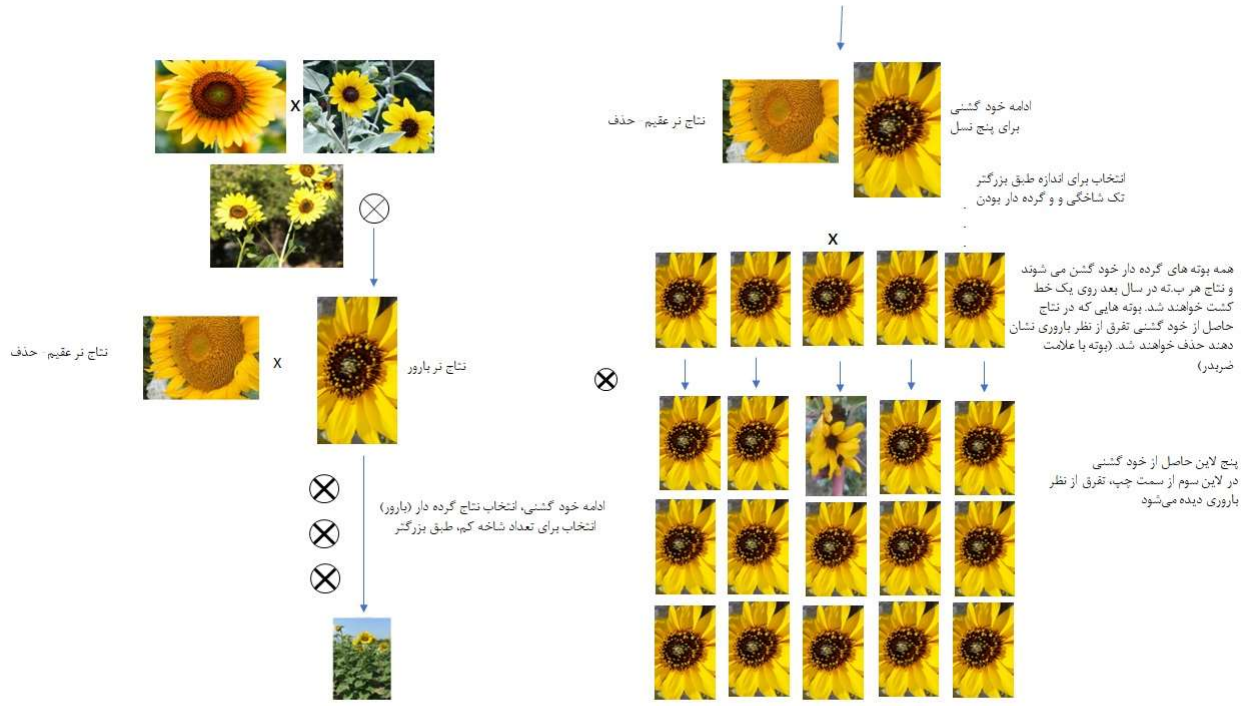
الف-۱-۲- خود گشنی متوالی نتاج حاصل از تلاقی بین گونه‌ای

در طی نسل‌های مختلف خودگشی خلوص افزایش یافته و نیز انتخاب برای صفات مطلوب مانند برگ‌های کوچک‌تر، کانوپی نقره‌ای، قطر طبق بزرگتر نسبت به گونه وحشی و تک شاخگی انجام می‌گیرد. از آنجا که به همراه ژن بازگرداننده باروری شمار زیادی ژن دیگر نیز منتقل می‌شوند که عمدتا مربوط به ویژگی‌های وحشی هستند (مانند الگوی شاخه‌دهی، طبق‌های کوچک، دیررسی) و نحوه توارث بسیاری از از آنها هنوز مشخص نیست، اقدام به انجام چندین نسل خودگشنی می‌نماییم. در این فرایند، صفات نامطلوبی که توسط آلل‌های مغلوب کنترل می‌شوند به مرور ظاهر و حذف می‌شوند.

در این شیوه، پس از خودگشن نمودن بوته‌های $F_1$، بذور $F_2$ حاصل می‌گردد. در نسل بعد، با بررسی ظاهری، نتاج فاقد گرده حذف خواهند شد. و خودگشنی برای ایجاد خلوص و نیز ظاهر شدن صفات با توارث مغلوب ادامه می یابد. در هر نسل همه بوته‌هایی که دارای برگ‌های کوچکتر، کانوپی نقره‌ای و قطر طبق طبق بزرگتر نسبت به گونه وحشی هستند برای تداوم خودگشنی انتخاب خواهند شد. این رویه تا پنج نسل ادامه می‌یابد تا سرانجام لاین‌های تقریبا خالص دارای ژن برگشت دهنده باروری (لاین‌های R) حاصل آید. دقت شود که در همان نسل‌های اولیه خودگشنیصرفا بوته‌های تک شاخه انتخاب خواهند شد زیرا گونه‌های وحشی واجد ژن چند شاخگی غالب می‌باشند (Nikolova & Christov, 2004) در صورت وجود این ژن در لاین‌های اینبرد نهایی حاصل از این تلاقی‌ها، هیبرید حاصل چند شاخه خواهد بود که پدیده نامطلوبی است

در پایان برای ایجاد لاین‌های خالص از نظر ژن بازگرداننده باروری، لاین‌های R خودگشن شده و نتاج بر روی خطوط مجزا کشت خواهند شد (روش طبق به ردیف). از بین لاین‌های R، آنهایی انتخاب خواهند شد که در نتاج حاصل از خودگشنی آنها، هیچ بوته

نر عقیم و چند شاخه مشاهده نگردد به عنوان لاین بازگرداننده باروری انتخاب خواهند شد.




شکل ۶- رویه ایجاد لاین‌های بازگرداننده باروری آفتابگردان به روش خودگشنی. پس از ایجاد اولین نسل تلاقی بین‌گونه‌ای، در نسل‌های مکرر، خودگشنی‌های مکرر برای افزایش خلوص و نیز ظاهر شدن صفات با توارث مغلوب انجام می‌گیرد.

الف-۱-۲-۱- انتخاب برای صفت چند شاخگی

چند شاخه بودن لاین‌های پدری هیبریدها (لاین‌های بازگرداننده باروری) برای تو.لید بذر بیشتر هیبرید مناسب‌تر هستند. لیکن، این صفت بایستی مغلوب بوده و در بوته‌های هیبرید ظاهر نگردد. به همین منظور بایستی در نسل های مختلف خود گشنی و انتخاب توجه نمود که علاوه بر ردیابی ژن برگشت دهنده باروری، انتخاب علیه آلل مغلوب چند شاخگی انجام پذیرد. با توجه به اینکه نتاج نسل اول تلاقی‌های بین گونه‌ای با گونه *H. argophyllus* همگی چند شاخه هستند و والدهای اینبرد زراعی در نسل‌های مختلف خود گشنی برای صفت تک شاخگی انتخاب می‌شوند، این گونه دارای ژن غالب چند شاخگی است. برای جلوگیری از مشکل بروز پدیده چند شاخگی در هیبریدها، بایستی آلل مغلوب مسبب چند شاخگی وارد تلاقی‌ها شود. یک راه‌کار، ورود یکی از لاین‌های بازگرداننده باروری در دسترس به عنوان والد دهنده این آلل در همان ابتدای خود گشنی است. به این منظور، نتاج $F_1$ حاصل از تلاقی بین‌گونه‌ای با یک لاین بازگرداننده باروری تجاری تلاقی داده می‌شود و عملیات خود گشنی بر روی نتاج این تلاقی ادامه می‌یابد. در هر نسل، خود گشنی بر روی بوته‌هایی ادامه می یابد که واجد ژن چند شاخگی مغلوب باشند. برای این منظور از نشانگرهای مولکولی ایجاد شده برای این نوع چند شاخگی استفاده خواهد شد (Nambeesan et al., 2015). همچنین با توجه به اینکه لاین‌های بازگرداننده باروری تجاری دارای ژن RF1 هستند به جهت حذف این ژن و عدم اختلاط اثر آن با ژن بازگرداننده

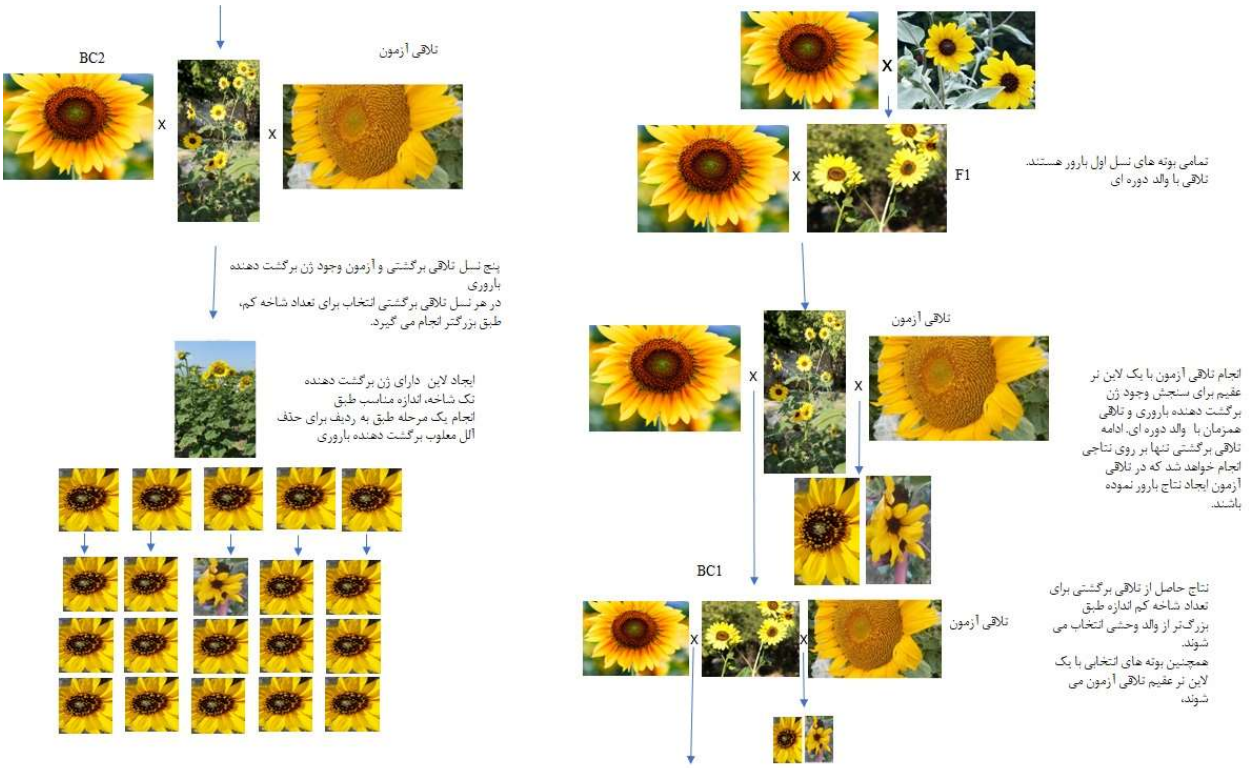
باروری با منشاء *H. argophyllus*، در هر نسل خودگشنی، از نشانگرهای مولکولی شناسایی شده برای ژن RF1 و انتخاب علیه آن استفاده خواهد شد (Sivolapova et al., 2023).

راه‌کار دیگر، انجام تلاقی با لاین بازگرداننده باروری تجاری پس از نیل به لاین‌های اینبرد حاصل از خودگشنی است. این راهکار اگرچه مستلزم صرف یه دوره سه ساله (به شرط قابلیت مدیریت دو نسل در سال) بیشتر است، لیکن به دلیل وقوع نوترکیبی ها بین نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های چند شاخگی، احتمال وجود ژن چند شاخه غالب را به شدت کاهش می‌دهد. در این راهکار نیز از نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن RF1 استفاده خواهد شد.

الف-۱-۳- انجام تلاقی برگشتی با والد اینبرد

به این منظور در هر نسل تلاقی، بذور لاین اینبرد مادری، بذور لاین زراعی نر عقیم و بذور حاصل از تلاقی بین گونه‌ای کشت شده و در زمان گرده افشانی، گلچه‌های والد اینبرد مادری اخته شده و آن‌گاه گرده از بوته‌های حاصل از تلاقی بین گونه‌ای به طبق‌های والد نر عقیم و نیز والد اخته شده منتقل خواهد شد (شکل ۷). بررسی وجود گرده کافی در بوته‌های نسل بعد حاصل از تلاقی با والد نر عقیم، تعیین کننده ادامه دخیل بودن بوته حاصل از تلاقی در ادامه روند تلاقی‌های برگشتی است. این رویه تا پنج نسل تداوم خواهد یافت تا سرانجام بوته‌های واجد ژن برگشت دهنده باروری با حداکثر پس زمینه ژنتیکی از والد اینبرد زراعی و حداقل صفات از والد وحشی (لاین های R) حاصل آیند. در پایان برای ایجاد لاین‌های خالص از نظر ژن بازگرداننده باروری، لاین‌های R خودگشن شده و نتاج بر روی خطوط مجزا کشت خواهند شد (روش طبق به ردیف). از بین لاین‌های R، آنهایی انتخاب خواهند شد که در نتاج حاصل از خودگشنی آنها، هیچ بوته نر عقیمی مشاهده نگردد (شکل ۸). در هر نسل انتخاب برای صفت تک شاخگی انجام خواهد گرفت.

شکل ۷- انتقال گرده به پایه اخته شده. الف- وضعیت کلاله ها پس از اخته شدن دستی، ب- برداشتن گرده‌ها از روی کاغذ کالک به کمک برگ، ج- انتقال گرده‌ها بر روی کلاله ها (عکس اصلی)




شکل ۸-رویه ایجاد لاین‌های بازگرداننده باروری آفتابگردان به روش تلاقی برگشتی. پس از ایجاد اولین نسل تلاقی بین‌گونه‌ای، در نسل‌های مکرر، تلاقی برگشتی با والد زراعی نر عقیم و انتخاب در هر نسل انجام می‌گیرد.

الف-۱-۴- انتخاب برای تحمل به خشکی

گونه *H. argophyllus* واجد صفات تحمل به خشکی می‌باشد. این تحمل ناشی از وجود کوتیکول مومی، رنگ نقره‌ای برگ‌ها و همچنین دارای بودن برگ‌های کوچک (شکل ۱) می‌باشد. بنابراین چنانچه هدف تولید لاین‌های اینبرد متحمل به خشکی باشد، در نسل‌های مختلف تلاقی برگشتی و یا خودگشنی، برای حضور این صفات انتخاب انجام می‌شود. همچنین کشت نسل‌ها در شرایط تنش خشکی و انتخاب مواد ژنتیکی که تحمل به حشکی نشان می‌دهند، به‌عنوان راهکار مکمل پیشنهاد می‌شود.

الف-۲- تهیه والد مادری نر عقیم

تلاقی گونه وحشی *H. petiolaris* به عنوان والد پدری با گونه *H. annuus* منجر به بروز پدیده نر عقیمی در نتایج تلاقی می‌گردد. در حقیقت اولین سیتوپلاسم نر عقیم که در آفتابگردان شناسایی شد از همین منشا بوده است که تا امروز همچنان در تولید هیبریدهای تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گونه وحشی چند شاخه و دارای برگ‌های کوچکتر و درازتر نسبت به گونه زراعی است (شکل ۹).

شکل ۹-مقایسه ظاهر گونه وحشی *H.petiolaris* با گونه زراعی .*H. annuus* الف- چند شاخگی و برگ‌های کوچک در گونه وحشی، ب- تک شاخگی و برگ‌های بزرگ در گونه زراعی. گونه زراعی از رقم آزاد گرده افشام لاکومکا است.

به موازات رویه تهیه لاین‌های بازگرداننده باروری، می‌توان اقدام به تولید والدین نر عقیم نمود. برای این منظور، کشت گونه *H. petiolaris* و لاین‌های اینبرد استخراجی از جوامع آزاد گرده افشان انجام می‌گیرد. به لحاظ دیر گل بودن گونه وحشی نسبت به گونه زراعی، کشت گونه وحشی یک ماه زودتر انجام می‌گردد. در زمان ظهور طبق‌های گونه وحشی، طبق‌ها با کسیه‌های پلاستیکی با قابلیت تبادل هوا پوشانده شده و در چندین نوبت نسبت به گرفتن گرده از آنها اقدام می‌شود. گرده ها در داخل کاغذ کالک و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، بدون رطوبت و در تاریکی تا زمان مورد استفاده نگه داری می‌شوند در زمان ظهور و آشکار شدن اولین گلچه‌های لوله‌ای بر روی طبق لاین‌های اینبرد، در صبح به کمک پنس پرچم‌های گل خارج شده و سپس طبق با آب مقطر شسته می‌شود تا بقایای گرده‌هایی که حین عمل اخته سازی آزاد شده و بر روی کلاله ریخته شده‌اند شسته شوند. سپس طبق‌ها با همان کیسه‌های قبلی پوشانده می‌شوند. این عمل دو روز متوالی انجام می‌گیرد. در روز دوم لایه‌های بعدی گلچه‌های طبق که هنوز بازنشده‌اند، تخریب شده و با چاقو از طبق خارج می‌شود تا در روزهای بعدی گرده افشانی‌های ناخواسته صورت نگیرد. روز بعد از تخریب بخش مرکزی طبق، اقدام به انتقال دانه گرده نموده و سپس روی طبق مجددا پوشیده می‌شود.

پس از زرد شدن پشت طبق والد دریافت کننده گرده که نشاندهنده رسیدگی فیزیولوژیک است، اقدام بر برداشت بذرهای تشکیل شده از روی طبق می‌نماییم.

نتاج در پاییز همان سال در گلخانه کشت شده و در زمان باز شده گل‌ها، وضعیت گرده‌دار بودن یا نبودن آنها بررسی می‌شود. بوته‌هایی بدون گرده (نر عقیم) انتخاب می‌شوند این بوته‌ها واجد سیتوپلاسم نرعقیم PET1 هستند. این نر عقیمی در واقع به دلیل ایجاد یک واژگونی در یک ژن مهم میتوکندریایی دخیل در بیوسنتز ATP ایجاد می‌شود. بذور حاوی سیتوپلاسم نرعقیم برداشت شده و در نسل بعد (بهار سال بعد)، در مجاورت والدین اینبرد اولیه کشت خواهند شد. تلاقی بین والد اینبرد به عنوان والد پدری و بوته نر عقیم به عنوان والد مادری انجام خواهد گرفت. نتاج حاصل این تلاقی همگی نر عقیم بوده و مجددا با لاین اینبرد تلاقی داده خواهند شد. این عمل برای شش نسل متوالی، انجام خواهد شد. طبیعتا در همه این تلاقی‌ها، والد اینبرد نقش والد پدری و بوته‌های عقیم به‌عنوان والد مادری ایفای نقش می‌نمایند. در هر نسل تلاقی برگشتی، انتخاب بر علیه صفت چند شاخگی انجام می گیرد تا در نهایت بوته‌های نر عقیم تک شاخه حاصل شوند. لاین نگه دارنده این والدین نر عقیم، همان لاین اینبرد اولیه است.

ب- ترکیب پذیری والدین

در اختیار بودن لاین‌های اینبرد بازگرداننده باروری، نر عقیم و نگهدارنده، مسیر را برای سنجش ترکیب پذیری عمومی و خصوصی از طریق تلاقی لاین در تستر و یا دای الل باز می‌نماید. ترکیب لاین‌هایی با منشاء متفاوت (جوامع مستر، لاکومکا و پروگرس) منجر به بروز هتروزیس بالاتر خواهد شد.

**مزایای استفاده از ژرم‌پلاسم وحشی در ایجاد هیبریدهای آفتابگردان**

استفاده از ژرم‌پلاسم وحشی به خصوص برای گیاهانی که دارای پایه ژنتیکی باریک هستند امری اجتناب ناپذیر است. استفاده از این ژرمپلاسم ها نسبت به استفاده از ارقام تجاری (رویه اصلاح معکوس) دارای مزایای زیر است:

۱- احتمال ظهور هتروزیس بیشتر به دلیل استفاده از جوامع آزاد گرده افشان برای ایجاد لاین های اینبرد
۲- کاهش خطر فرسایش ژنتیکی که بواسطه استفاده طولانی مدت از هیبریدهای تجاری برای استخراج لاین‌های اینبرد ایجاد می‌شود.
۳- کاهش ضریب اینبریدینگ در والدین هیبریدها
۴- استفاده از ژن‌های متنوع برگشت دهنده باروری
۵- کاهش خطرات اگروتروریستی که در استفاده از پس زمینه ژنتیکی ارقام تجاری محتمل است.
۶- استفاده پایدار از تنوع ژنتیکی در تولید ارقام

**معایب استفاده از ژرم‌پلاسم وحشی در تلاقی‌ها**

وجود پیوستگی بین صفات مورد نظر (صفات مطلوب) و صفات نامطلوب به لحاظ زراعی باعث ورود شمار زیادی صفت نامطلوب به زمینه ژنتیکی زراعی در نتاج تلاقی‌های بین گونه‌ای می‌شود که چندین نسل تلاقی برگشتی و یا خودگشنی با اعمال انتخاب‌های دقیق علیه صفات نامطلوب را اجتناب ناپذیر می‌نماید.

**تشکر و قدردانی**

بخش عمده مطالب این مجموعه برگرفته از آزمایشات انجام شده در بانک ژن گیاهی ملی ایران است. این آزمایشات با حمایت رییس محترم بانک ژن گیاهی ملی ایران، آقای دکتر بهزاد سرخی انجام گرفت که بدینوسیله از ایشان تشکر می‌نماییم. از بخش تحقیقات دانه های روغنی برای فراهم نمودن امکان تلاقی و مواد ژنتیکی آفتابگردان زراعی تشکر و قدر دانی می نمایم. همچنین زحمات آقای مهندس حبیب تشکری، مهدی هرسمی و خانم‌ها مرجان حقیقی و عفیفه حاجی‌پور در مراحل انجام تلاقی ها قدردانی می‌شود.

**منابع**

سلطانی نجف آبادی، م. (۱۳۹۴). تهیه مواد ژنتیکی، تکثیر و احیاء چند گونه وحشی آفتابگردان و جوامع فرانسوی. گزارش نهایی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شماره ثبت ۴۷۲۲۵.

سلطانی نجف آبادی، م. (۱۴۰۳). مکاتبات شخصی.

Abratti, G., Bazzalo, M. E., & León, A. (2008). Mapping a novel fertility restoration gene in sunflower. Proceedings of the 17th international sunflower conference,

De la Canal, L., Crouzillat, D., Quetier, F., & Ledoigt, G. (2001). A transcriptional alteration on the atp9 gene is associated with a sunflower male-sterile cytoplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, *102*, 1185-1189.

Dexing, W., & Liangji, C. (2007). Establishment of new cytoplasmic male sterility by introduction of cytoplasmic from wild species in sunflower. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, *29*(4).

Feng, J., & Jan, C.-C. (2008). Introgression and molecular tagging of Rf 4, a new male fertility restoration gene from wild sunflower Helianthus maximiliani L. *Theoretical and Applied Genetics*, *117*, 241-249.

Gaborieau, L., Brown, G. G., & Mireau, H. (2016). The propensity of pentatricopeptide repeat genes to evolve into restorers of cytoplasmic male sterility. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1816.

Gutierrez, A., Cantamutto, M., & Poverene, M. (2012). Disease tolerance in Helianthus petiolaris: a genetic resource for sunflower breeding. *Plant Production Science*, *15*(3), 204-208.

Hans Köhler, R., Horn, R., Lössl, A., & Zetsche, K. (1991). Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the atpA gene. *Molecular and General Genetics MGG*, *227*, 369-376.

Heiser, C., Jr. (1982). Registration of Indiana-1 CMS sunflower germplasm (Reg. No. GP 6).

Horn, R. (2002). Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasms in the genus Helianthus. *Theoretical and Applied Genetics*, *104*, 562-570.

Horn, R., & Friedt, W. (1997). Fertility restoration of new CMS sources in sunflower (Helianthus annum L.). *Plant breeding*, *116*(4), 317-322.

Horn, R., & Friedt, W. (1999). CMS sources in sunflower: different origin but same mechanism? *Theoretical and Applied Genetics*, *98*, 195-201.

Horn, R., Hustedt, J. E., Horstmeyer, A., Hahnen, J., Zetsche, K., & Friedt, W. (1996). The CMS-associated 16 kDa protein encoded by orfH522 in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasms of sunflower. *Plant molecular biology*, *30*, 523-538.

Horn, R., Köhler, R. H., & Zetsche, K. (1991). A mitochondrial 16 kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant molecular biology*, *17*, 29-36.
Horn, R., Radanovic, A., Fuhrmann, L., Sprycha, Y., Hamrit, S., Jockovic, M., Miladinovic, D., & Jansen, C. (2019). Development and validation of markers for the fertility restorer gene Rf1 in sunflower. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1260.
Hussain, M. M., Rauf, S., Riaz, M. A., Al-Khayri, J. M., & Monneveux, P. (2017). Determination of drought tolerance related traits in Helianthus argophyllus, Helianthus annuus, and their hybrids. *Breeding science*, *67*(3), 257-267.
Jan, C.-C., & Vick, B. (2007). Inheritance and allelic relationships of fertility restoration genes for seven new sources of male-sterile cytoplasm in sunflower. *Plant breeding*, *126*(2), 213-217.
Jan, C., Vick, B., Miller, J., Kahler, A., & Butler III, E. (1998). Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, *96*, 15-22.
Kinman, M. (1970). New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. Proceedings of the 4th international sunflower conference,
Leclercq, P., & Philippon, J. (1984). Identification de gènes de restauration de fertilité sur cytoplasmes stérilisants chez le tournesol. *Agronomie*, *4*(6), 573-576.
Liu, Z., Wang, D., Feng, J., Seiler, G. J., Cai, X., & Jan, C.-C. (2013). Diversifying sunflower germplasm by integration and mapping of a novel male fertility restoration gene. *Genetics*, *193*(3), 727-737.
Lurin, C., Andreés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., & Hoffmann, B. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell*, *16*(8), 2089-2103.
Mercer, K. L., Andow, D. A., Wyse, D. L., & Shaw, R. G. (2007). Stress and domestication traits increase the relative fitness of crop–wild hybrids in sunflower. *Ecology letters*, *10*(5), 383-393.
Miller, J., & Gulya, T. (1988). Registration of six downy mildew resistant sunflower germplasm lines.
Nambeesan, S. U., Mandel, J. R., Bowers, J. E., Marek, L. F., Ebert, D., Corbi, J., Rieseberg, L. H., Knapp, S. J., & Burke, J. M. (2015). Association mapping in sunflower (Helianthus annuus L.) reveals independent control of apical vs. basal branching. *BMC plant biology*, *15*, 1-12.
Nikolova, L., & Christov, M. (2004). Interspecific hybridization between Helianthus argophyllus and H. annuus L. Cross compatibility and first hybrid generation characterization. Proc. 16th Inter. Sunflower Conf., Fargo, ND, USA,
Qi, L., Gulya, T., Seiler, G. J., Hulke, B. S., & Vick, B. A. (2011). Identification of resistance to new virulent races of rust in sunflowers and validation of DNA markers in the gene pool. *Phytopathology*, *101*(2), 241-249.
Qi, L., Seiler, G., Vick, B., & Gulya, T. (2012). Genetics and mapping of the R 11 gene conferring resistance to recently emerged rust races, tightly linked to male fertility restoration, in sunflower (Helianthus annuus L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *125*, 921-932.
Schmitz-Linneweber, C., & Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in plant science*, *13*(12), 663-670.
Serieys, H. (1984). Wild Helianthus species, a potential source of androsterilities. Second Eucarpia meeting on the sunflower, Leningrad,
Serieys, H. (1994). Report on the past activities of the FAO working group:" identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources", for the period 1991-1993.
Serieys, H. (2005). Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources, in the FAO Subnetwork. *Proceedings of the Sunflower Subnetwork Progress Report*, 47-53.
Sivolapova, A. B., Polivanova, O. B., Goryunov, D. V., Chebanova, Y. V., Fedorova, A. V., Sotnikova, E. A., Karabitsina, Y. I., Benko, N. I., Mukhina, Z. M., & Anisimova, I. N. (2023). Refinement of Rf1-gene localization and development of the new molecular markers for fertility restoration in sunflower. *Molecular Biology Reports*, *50*(9), 7919-7926.
Škorić, D. (2009). Sunflower breeding for resistance to abiotic stresses/mejoramiento de girasol por resistencia a estreses abióticos/sélection du tournesol pour la résistance aux stress abiotiques. *Helia*, *32*(50), 1-16.
Whelan, E. D. (1980). A new source of cytoplasmic male sterility in sunflower. *Euphytica*, *29*, 33-46.
Whelan, E. D. (1981). Cytoplasmic Male Sterility in Helianthus giganteus L.× H. annuus L. Interspecific Hybrids 1. *Crop science*, *21*(6), 855-858.
Yue, B., Vick, B., Cai, X., & Hu, J. (2010). Genetic mapping for the Rf1 (fertility restoration) gene in sunflower (Helianthus annuus L.) by SSR and TRAP markers. *Plant breeding*, *129*(1), 24-28.