Iranian Journal of Cotton Researches
ISSN: 2345-5306

Heterosis in Cotton: Challenges and Opportunities in The Production of Hybrid Crops

Fatemeh Saeidnia[1*], Rasmieh Hamid[2]

[1] Assistant Professor of Agricultural and Horticultural Science Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, 91769-83641, Iran, Email: f.saeidnia@areeo.ac.ir

[2] Assistant Professor of Plant Breeding Department, Cotton Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, 49166-85915, Iran.

Article Info

Article type:
reviewed

Article history:
Received: 22 - 10 - 2023
Accepted: 18 - 4 - 2024

Keywords:
Sporophytic
Transgenic
Gametophytic
restorer line
cytoplasmic male sterility
genetic male sterility

ABSTRACT

Cotton, as a strategic crop and the most important fibre crop, is one of the most valuable agricultural crops that has a special economic, agricultural and commercial importance in the world and in Iran and has long been a subject for hybrid variety breeding. In this review, we have presented the latest advances in theoretical and applied research in the field of cotton heterosis and the methods used to develop hybrid varieties in recent decades. Three types of hybrids produced by manual emasculation, cytoplasmic male sterility and genetic male sterility have been developed and are being cultivated. The most desirable method of producing hybrid seed is to use the GMS or CMS line in combination with insect pollination when sufficient pollen is available to be pollinated by honey bees. The A and B lines can produce the same yield of seed cotton in the field. Currently, most hybrids grown commercially are produced by manual emasculation and pollination. Due to the high cost of producing F1 seed, F2 seed is therefore widely cultivated. The F2 generation of these combinations was 5 to 15 better in yield than the control varieties. One advantage of the F2 generation is that only half of the pollen of the F1 hybrid regains its fertility. However, the selection and certification of high heterosis in the F2 generation is necessary, as some F2 generations show no heterosis, although high heterosis is present in the F1 generation. In addition, there is heterosis in yield but not in fibre quality in F2. GMS genes (ms2 and ms5ms6) used in hybrid seed production and occasional mitochondrial genes for G. *harknessii* CMS were cloned. On the other hand, the discovery and improvement of environmental male sterility (EGMS), which is induced by environmental factors such as light and temperature, has enabled the utilisation of some GMS traits for hybrid breeding. The EGMS line can be used both as a sterile line and as a maintenance line by controlling the appropriate environment and realising the crossing of two lines. In this review, the challenges and opportunities of heterosis in cotton and the development of hybrid varieties are discussed.

Cite this article: Saeidnia, F., Hamid, R. (2022). Heterosis in cotton: Challenges and opportunities of hybrid cultivars production. *Iranian Journal Cotton Researches*, 11 (1), 77-96.

© The Author(s).
DOI: 10.22092/ijcr.2024.365051.1209
Publisher: Cotton Research Institute of Iran

مجله پژوهش‌های پنبه ایران

شاپا: ۲۳۴۵-۵۳۰۶

هتروزیس در پنبه: چالش‌ها و فرصت‌های تولید ارقام هیبرید

فاطمه سعیدنیا[1]*، رسمیه حمید[2]

[1] استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران. رایانامه: f.saeidnia@areeo.ac.ir

2 استادیار بخش تحقیقات به نژادی، مؤسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله مروری

تاریخ دریافت: 1402/7/30
تاریخ پذیرش: 1403/1/30

واژه‌های کلیدی:
اسپوروفیت
تراریخته
گامتوفیت
لاین بازگرداننده باروری
نرعقیمی سیتوپلاسمی
نرعقیمی ژنتیکی

چکیده

پنبه به‌عنوان گیاهی راهبردی و مهمترین گیاه لیفی، یکی ازپرارزش‌ترین گیاهان زراعی است که اهمیت اقتصادی، کشاورزی و تجاری ویژه‌ای در جهان و ایران یافته است، و از گذشته اصلاح ارقام هیبرید در این گیاه مدنظر بوده است. در این مقاله مروری، آخرین پیشرفت‌ها در زمینه هتروزیس پنبه همراه با ساز و کار توسعه ارقام هیبرید به‌صورت سنتی، و استفاده از لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) و ژنتیکی (GMS) در چند دهه گذشته مورد بررسی قرار خواهند گرفت. در حال حاضر، سه نوع هیبرید حاصل از روش سنتی، CMS و GMS در تولید و کشت و کار پنبه به کار می‌روند. از میان اینها، مطلوب‌ترین روش تولید بذور هیبرید استفاده از لاین GMS یا CMS همراه با گرده‌افشانی به کمک حشرات است و در صورتی که دانه گرده به اندازه کافی وجود داشته باشد، لاین‌های A و B گرده‌افشانی شده به کمک زنبور عسل می‌توانند عملکردهای مساوی از بذر پنبه در مزرعه تولید کنند. در حال حاضر، بیشتر هیبریدهای تجاری با استفاده از روش سنتی و دستی تولید می‌شوند که روشی بسیار پرهزینه است. بنابراین، در بسیاری از نقاط دنیا به دلیل هزینه بالای تولید بذر F_1، بذر هیبرید F_2 به‌طور گسترده کشت می‌شود. عملکرد هیبریدهای نسل F_2 معمولاً 5 تا 15 درصد بیشتر از ارقام شاهد است. یکی از مزایای استفاده از نسل F2 این است که با اینکه فقط نیمی از دانه‌های گرده F_1 توانایی بازگرداندن باروری را دارند، والدین F_2 توانایی بازگرداندن کامل باروری را دارند. با این وجود، گزینش و تأیید هتروزیس بالا در نسل F_2 ضرورت دارد؛ زیرا با وجود اینکه هتروزیس بالایی در نسل F_1 وجود دارد، برخی از هیبریدهای F_2 هتروزیس نشان نمی‌دهند. بعلاوه، در نسل F_2 هتروزیس در عملکرد وجود دارد، اما در کیفیت الیاف F_2 هتروزیس وجود ندارد. برای توسعه لاین‌های نرعقیم و شناسایی مکانیسم نرعقیمی، ژن‌های GMS مانند ms_2 و ms_5ms_6 و ژن‌های میتوکندریایی (نرعقیمی سیتوپلاسمی) از *G. harknessii* کلون شده‌اند. از سوی دیگر، شناسایی و بهبود نرعقیمی ژنتیکی حساس به شرایط محیطی القاء شده به‌وسیله عواملی مانند نور و دما این امکان را فراهم ساخته است تا از برخی صفات GMS به‌منظور اصلاح گیاهان هیبرید استفاده شود. لاین EGMS می‌تواند به‌عنوان یک لاین نرعقیم، و همچنین در صورت کنترل شرایط مساعد محیطی و تحقق اصلاح متقاطع دو لاین، به‌عنوان لاین نگهدارنده باروری مورد استفاده قرار گیرد. در این مقاله مروری به چالش‌ها و فرصت‌های استفاده از هتروزیس و توسعه ارقام هیبرید در پنبه پرداخته خواهد شد.

استناد: سعیدنیا، فاطمه؛ حمید؛ رسمیه. (۱۴۰۲). هتروزیس در پنبه: چالش‌ها و فرصت‌های تولید ارقام هیبرید. *مجله پژوهش‌های پنبه ایران*، ۱۱ (۱)، ۹۶-۷۷.

DOI: 10.22092/ijcr.2024.365051.1209

ناشر: موسسه تحقیقات پنبه کشور

© نویسندگان.

مقدمه

پنبه (*Gossypium sp.*) یک گیاه مهم لیفی و روغنی است که توسط کشاورزان در سراسر جهان به‌عنوان یک گیاه صنعتی درآمدزا کشت می‌شود و نقش بسزایی در اقتصاد و توسعه جوامع انسانی دارد. بهره‌برداری از بنیه هیبرید یا هتروزیس در بهبود عملکرد گیاهان زراعی امری حیاتی است (اشنابل و اسپرینگر، 2013). از گذشته تاکنون، هتروزیس به‌عنوان یک راهکار مهم برای بهبود عملکرد و کیفیت الیاف در پنبه بکار می‌رود. در تمامی روش‌های تولید هیبرید پنبه، لاین‌های F_1 برتری زیادی از نظر صفاتی مانند زودرسی، عملکرد بالا، شاخص‌های کیفیت الیاف، تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی و.. نسبت به والدین خود نشان داده‌اند (ژانگ و پن، 1999؛ منیر و همکاران، 2016؛ تیان و همکاران، 2019؛ زیدی و همکاران، 2020). بنابراین، اصلاح و تولید ارقام هیبرید در پنبه را می‌توان به‌عنوان یک راه مهم برای دستیابی به اهداف به‌نژادی و توسعه ارقام مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در نظر گرفت.

بیشتر هیبریدهای F_1 که به صورت تجاری در کشت و کار پنبه بکار می‌روند، با استفاده از روش سنتی (عقیم‌سازی و گرده‌افشانی دستی) تولید می‌شوند. اگرچه بذرهای F_2 به‌عنوان هیبرید در نظر گرفته نمی‌شوند، اما به‌دلیل هزینه بالای تولید بذرهای F_1، بذرهای F_2 به‌طور گسترده در چین و هند کشت می‌شوند. استفاده از لاین‌های نرعقیم می‌تواند فرآیند تولید بذر هیبرید را در مقیاس بزرگ سهولت بخشد. سیستم نرعقیمی یکی از ابزارهای اساسی برای اصلاح و تولید بذر هیبرید در پنبه است (ژانگ و پن، 1999؛ بودر و پلتیر، 2001)، هیبریدهای حاصل از نرعقیمی سیتوپلاسمی (CMS) و نرعقیمی ژنتیکی (GMS) هر دو به صورت تجاری در چین و هند کشت می‌شوند.

در چند دهه اخیر، بیش از 100 رقم هیبرید در پنبه ایجاد شده‌اند که اکثر آنها حامل صفت مقاومت به کرم غوزه بوده و در کشورهای چین و هند کشت شده‌اند. این هیبریدهای تراریخته Bt حاصل دورگ‌گیری ارقام تراریخته با ارقام تجاری به روش سنتی، نرعقیمی سیتوپلاسمی و نرعقیمی ژنتیکی بوده، و تقریباً در تمامی مناطق پنبه‌کاری چین و هند کشت می‌شوند. عمده هیبریدهای حال حاضر محصول دورگ‌گیری سنتی هستند. در این مقاله به بررسی آخرین پیشرفت‌ها در توسعه ارقام هیبرید پنبه با استفاده از رویکردهای نرعقیمی سیتوپلاسمی، ژنتیکی و سنتی پرداخته می‌شود، و چالش‌ها و فرصت‌های پیش رو در توسعه ارقام هیبرید در این گیاه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

اصلاح و تولید ارقام هیبرید به روش سنتی (عقیم‌سازی و گرده‌افشانی دستی): در پنبه تولید بذر هیبرید یا به‌وسیله روش ستی اخته کردن و گرده‌افشانی دستی انجام می‌شود و یا به‌وسیله روش‌های غیر متداول (روش‌های مبتنی بر نرعقیمی). اکثر هیبریدهایی که تاکنون آزادسازی شده‌اند از نوع سنتی هستند. تولید چنین هیبریدهایی سه مرحله را دربر می‌گیرد که عبارتند از: 1- شناسایی و پرورش والدین نر و ماده؛ 2- اخته کردن والد ماده؛ و 3- گرده‌افشانی والد ماده با والد نر شناسایی شده. پنبه اغلب یک گونه دگرگشن است. متوسط دگرگشنی در آن 6٪ می‌باشد. دانه گرده پنبه سنگین و چسبنده است و بنابراین دگرگرده‌افشانی فقط به‌وسیله حشرات یعنی زنبورهای عسل و زنبورهای بامبل انجام می‌شود. در پنبه‌های دیپلوئید روش سنتی بسیار غیراقتصادی است زیرا تشکیل غوزه به‌دلیل سایز کوچک گل و ساقه شکننده کم است. تولید هیبریدها با استفاده از سیستم نرعقیمی فرآیند اخته کردن را حذف می‌کند زیرا بساک‌ها در والد ماده عقیم و بدون دانه گرده هستند. بنابراین هزینه تولید بذر هیبرید کاهش می‌یابد. با این وجود، گرده‌افشانی باید به‌صورت دستی انجام شود.

در روش سنتی، اخته کردن والد ماده یک فرآیند بسیار دقیق، پرزحمت و وقت‌گیر است. روش‌های مختلفی برای اخته کردن ابداع شده‌اند که بسته به نوع گل می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. غنچه‌های گلی که احتمال دارد روز بعد باز شوند برای اخته کردن انتخاب می‌شوند، که بهترین زمان برای این کار هنگام

عصر است. تلاقی والدین باید یک هفته پس از آغاز گلدهی شروع شود. غنچه‌های اخته شده صبح روز بعد بین ساعت 8 تا 11 گرده‌افشانی می‌شوند، زیرا در این زمان پذیرش کلاله به حداکثر مقدار خود می‌رسد. با این وجود، بسته به پذیرش کلاله می‌توان این کار را تا ساعت 13 تمدید کرد. زمانی که تلاقی در ماه‌های مهر تا پایان آبان انجام می‌شود، به‌منظور پخش مؤثر دانه گرده، گل‌های نر باید روی پارچه پهن شوند و به مدت چند ساعت در زیر آفتاب قرار گیرند. گل‌های تلاقی داده شده مبا یک پاکت پوشانده می‌شوند تا از غنچه‌های اخته شده در انتظار گرده‌افشانی متمایز گردند. به‌منظور شناسایی غنچه‌های تلاقی داده شده در زمان برداشت، یک نخ به ساقه بسته می‌شود. لقاح بعد از گذشت 30-12 ساعت از زمان گرده‌افشانی رخ می‌دهد و بنابراین غنچه‌های تلاقی داده شده باید به مدت 4-3 روز پس از گرده‌افشانی پوشیده باقی بمانند.

در صورتی که ایزولاسیون مناسبی انجام شود و از حذف گل‌های باز والد ماده در صبح زود اطمینان حاصل شود، نیازی به پاکت‌گذاری قبل و بعد از گرده‌افشانی نیست. همه این عملیات از قبیل اخته کردن و گرده‌افشانی باید توسط افراد آموزش دیده و تحت نظارت کارکنان فنی واجد شرایط انجام شود. برای تشکیل و توسعه خوب غوزه، برنامه تلاقی باید در دوره زمانی 14-10 هفته اول گلدهی انجام شود. آبیاری سبک و مکرر باید در طول تلاقی و تشکیل غوزه انجام شود.

هتروزیس F_2 و کاربردهای آن: هتروزیس موجود در هیبریدهای F_2 به سرعت پس از هتروزیس F_1 گزارش شد و توجه ویژه‌ای را در ایالات متحده به خود جلب کرد (ژانگ و همکاران، 2023). در مقایسه با گیاهان F_1، گیاهان F_2 ممکن است عملکرد کمتری داشته باشند، اما نسبت به واریته‌های زراعی مرسوم عملکرد بالاتری دارند. در چین تقریباً همزمان با شناسایی و کاربرد لاین نرعقیم ژنتیکی Dong-A در اواسط دهه هفتاد، بنیه هیبرید F_2 در تولید پنبه تأیید شده و مشخص شد که هیبریدهای F_2 معمولاً 5 تا 15٪ عملکرد بالاتری نسبت به ارقام شاهد دارند (هوانگ، 2007). هیبرید F_1 از نظر ژنتیکی هتروزیگوت است و به همین دلیل است که هتروزیس قابل توجهی را نشان می‌دهد، در حالی که نسل F_2 شامل مجموعه‌ای از لاین‌های هموزیگوت و هتروزیگوت است. از همان اوایل به خوبی مشخص شده بود که بنیه هیبرید در نسل F_2، وجود دارد (کیم و تیلی، 1947). اگرچه معمولاً در مقایسه با F_1 در نسل F_2 کاهش عملکرد مشاهده می‌شود، با این وجود F_2 در چین اغلب به‌عنوان جایگزینی ارزان‌تر برای هیبریدهای F_1 استفاده می‌شود. بر این اساس، کاهش بنیه هیبرید در F_2به‌دلیل کاهش تعداد گیاهان هتروزیگوت است. با این وجود هنوز ممکن است تعدادی فرد هتروزیگوت و مقداری هتروزیس وجود داشته باشد. در آزمایش مقدماتی ارقام جدید پنبه که از سال 1994 تا 1996 در استان هونان انجام شد، عملکرد الیاف XZM 2 به‌طور متوسط 19/30 درصد در F_1 و 7/4 درصد در F_2افزایش یافت. نقشه‌یابی QTL با استفاده از جمعیت XZM 2 نشان داد که واریانس غالبیت نقش مهمی در اساس ژنتیکی هتروزیس برای عملکرد و اجزای آن ایفا می‌کند (لیو و همکاران، 2017) با این حال، واریانس ژنتیکی افزایشی عمدتاً مسئول تنوع ژنتیکی صفات کیفی الیاف بود، بنابراین، برای این صفات سطح پایین هتروزیس درهیبرید XZM2 مشاهده شد (وانگ و همکاران، 2007). این رقم هیبرید در سال 1997 در هونان آزادسازی شد، و در سال 2001 در *YaRCGR* گسترش یافت و در بیش از 1/5 میلیون هکتار کشت شد. در آزمون عملکرد ارقام جدید پنبه در استان آنهویی چین در سال 1996، رقم هیبرید Wanza 40 به میزان 16/48 درصد افزایش در عملکرد الیاف (F_1) نشان داد در سال 1997 افزایش 11/40 درصدی عملکرد الیاف در لاین‌های F_2 مشاهده شد. این هیبرید در سطحی معادل 1/3 میلیون هکتار کشت شد. قابل ذکر است که این دو لاین (XZM 2 و Wanza 40) توسعه یافته توسط مؤسسه تحقیقات پنبه چین در هونان و آنهویی دارای نشانگرهای مشخص دانه گرده زرد برای والد نر در XZM 2 و ویژگی فقدان غده برای

والد ماده در Wanza 40 بودند؛بنابراین، تشخیص F1 و F2 آنها از طریق درجه‌بندی بذر یا کارایی مزرعه‌ای نشانگرهای شاخص، که در نسل F1 فاقد تفرق بوده اما در نسل F2 به طور مشخص تفرق می‌یابند، بسیار آسان است. معمولاً انتظار می‌رود که هیبرید F_2 تقریباً نیمی از اثر هتروزیس F_1 را نشان دهد. با این حال، در هیبرید F_2 هزینه تولید بذر هیبرید بیش از 10 برابر کاهش می‌یابد. هیبرید تراریخته Bt با نام ZMS29 که توسط CRI/CAAS آزادسازی شده است، یکی از موفق‌ترین هیبریدهایی است که بیشترین سطح زیر کشت در چین را دارا می‌باشد.

بهره‌برداری از قدرت هتروزیس با استفاده از لاین‌های GMS

لاین‌های نرعقیم ژنتیکی :نرعقیمی می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مهم برای اصلاح هیبرید و استفاده از هتروزیس در محصولات مختلف، به‌ویژه در محصولات خودگرده‌افشان و همچنین در مقیاس کمتر در گیاهان دگرگرده‌افشان بکار رود. نرعقیمی به نقص در اندام‌های نرینگی و از دست دادن توانایی تولیدمثلی اشاره دارد که منجر به ناباروری می‌شود و در گیاهان پدیده رایجی است (چن و لیو، 2014b). در اکثر موارد، این پدیده در نتیجه جهش خود به خودی ظاهر می‌شود که منجر به ایجاد جهش یافته نرعقیم می‌شود. لاین‌های نرعقیم بر اساس نحوه توارث می‌توانند به دو گروه نرعقیم ژنتیکی (GMS) و سیتوپلاسمی (CMS) تقسیم‌بندی شوند.

بسیاری از لاین‌های نرعقیم که عقیمی کامل یا جزئی نشان می‌دهند در جنس گوسیپیوم شناسایی شده‌اند. لاین GMS عموماً توارث ساده‌ای دارد و توسط یک یا دو ژن غالب یا مغلوب کنترل می‌شود. از زمانی که جاستوس و لاین وبر، برای اولین بار یک لاین GMS به نام ms_1 را در سال 1960 شناسایی کردند، در مجموع 19 ژن GMS در 17 لاین GMS شامل ms_1، ms_2، ms_3، Ms_4، ms_5، ms_6، Ms_7، ms_8، ms_9، Ms_{10}، Ms_{11}، Ms_{12}، ms_{13}، ms_{14}، ms_{15}، ms_{16}، Ms_{17}، Ms_{18} و Ms_{19} به‌طور متوالی شناسایی شده‌اند. در میان آنها، ms_1، ms_2، ms_3، ms_{13}، ms_{14}، ms_{15} و ms_{16} توسط یک ژن به ارث می‌رسند، در حالی که ms_5ms_6 و ms_8ms_9 توسط یک جفت ژن مغلوب به ارث می‌رسند. به جز Ms_{11}، Ms_{12}، ms_{13}، Ms_{18}، و Ms_{19} که در *G. barbadense* مشاهده شده‌اند، بقیه در *G. hirsutum* شناسایی شده‌اند (ژانگ و پن، 1999). در سال 1972 دانشمندان در استان سیچوان چین یک گیاه نرعقیم را در رقم دونگتینگ 1 شناسایی کردند (ژانگ و جینگ، 1997). تجزیه و تحلیل ژنتیکی نشان داد که این رقم حاصل یک جهش طبیعی GMS است که با عنوان Dong-A نام‌گذاری شده و به‌وسیله یک ژن نرعقیم مغلوب کنترل می‌شود (ژانگ، 1995). در حال حاضر تنها لاین‌های کاملاً نرعقیم مانند لاین‌های (1355A) ms_2، (Dong-A) ms_{14} و ms_5ms_6 برای تولید بذر هیبرید استفاده می‌شوند.

ژنومیکس و ژنتیک مولکولی GMS در پنبه: مطالعات اولیه روی لاین‌های GMS پنبه عمدتاً بر جمع آوری و شناسایی آنها متمرکز بود. با استفاده از آزمایش‌های لینکاژ، ژن‌های نرعقیم ms8ms9 بر روی کروموزوم 12 و 26 یا کروموزوم A12 و D12 (راین، 1991)، ms_3 بر روی کروموزوم D07 (کوهل و همکاران، 1984)، و Ms_{11} بر روی کروموزوم A12 (تورکات و فیستر، 1979) نقشه‌یابی شدند. وانگ و همکاران (2007)، با استفاده از لاین نرعقیم ژنتیکی *1335A* ژن ms_2 را بر روی کروموزوم D02 نقشه‌یابی کردند. چن و همکاران (2009)، با استفاده از لاین "Zhongkang-A" (ZK-A)، ژن ms_5 را روی کروموزوم A12 بین نشانگرهای ریزماهواره NAU3561 و NAU2176 با فاصله ژنتیکی 3/2 سانتی‌مورگان و ms6 را روی کروموزوم D12 بین نشانگرهای BNL1227 و NAU460 در فاصله ژنتیکی 3/1 سانتی‌مورگان نقشه‌یابی کردند. علاوه‌براین، ژن ms15 بر روی کروموزوم A12 در فاصله ژنتیکی 2/7 سانتی‌مورگان بین دو نشانگر NAU2176 و NAU1278 نقشه‌یابی شد (چن و همکاران، 2009).

با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP برای غربالگری ژن‌های دارای بیان متفاوت در گیاهان

نربارور و نرعقیم لاین Dong-A، هو و همکاران (2002) سه ژن GHA27، GHA28 و GHA47 را که بیان متفاوتی داشتند، در مرحله تک هسته‌ای شناسایی کردند. بیان بسیاری از ژن‌های کلیدی دخیل در رشد بساک در مراحل میوز و میکروسپور تک هسته‌ای در لاین نرعقیم Dong-A سرکوب شده بود (وی و همکاران، 2013). این ژن‌ها عمدتاً با سنتز هورمون، متابولیسم ساکارز و نشاسته، گلیکولیز، متابولیسم فلاونوئید و سنتز هیستون مرتبط بودند. ژن‌های دارای بیان متفاوت در فرآیندهایی مانند توسعه دیواره سلولی دردانه گرده لاین ms_5ms_6 نقش داشتند (ما و همکاران، 2007). در مجموع 2446 ژن دخیل در سنتز دیواره دانه گرده و رشد بساک که بین گیاهان نربارور و نرعقیم بیان متفاوتی داشتند، از طریق RNA-seq در مراحل مختلف رشد بساک درلاین نرعقیم 1355(ms2) A شناسایی شدند (وو و همکاران، 2015).

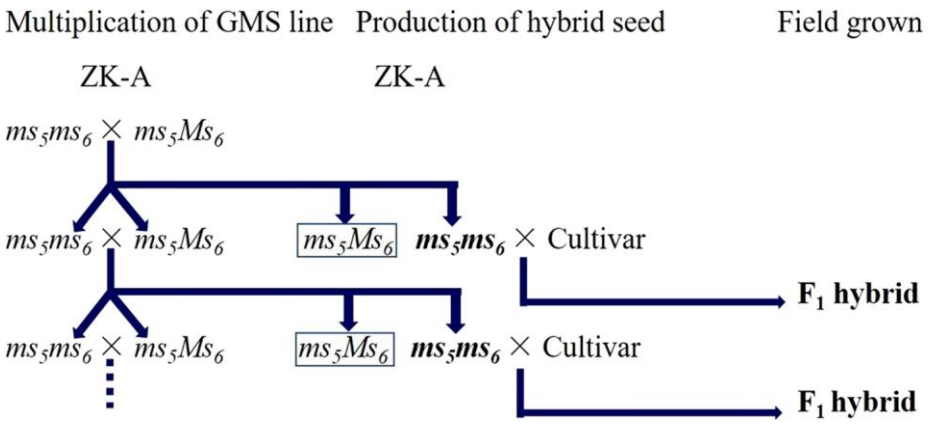
با انتشار توالی ژنوم پنبه (هو و همکاران، 2019)، پیشرفت در تحقیقات ژنتیکی و ژنومی از جمله کلون‌سازی ژن‌های نرعقیم در پنبه تسریع شد. ژن‌های نرعقیمی ژنیکی ms_2 و ms_5ms_6 در پنبه کلون شده‌اند (ما و همکاران، 2022؛ وو و همکاران، 2022؛ مائو و همکاران، 2022). وو و همکاران (2022) ژن نرعقیم ms_2 در لاین A1355 را که پروتئین پلی گالاکتورونار (GhNSP) را کد می‌کند، نقشه‌یابی و کلون کردند. جهش‌های مضاعف در ژنGhCYP450، که یک پروتئین سیتوکروم P450 ضروری برای تشکیل اگزین دانه گرده را کد می‌کند، منجر به تولید نرعقیمی در لاین ms_5ms_6 می‌شود. پروتئین GhCYP450 به‌عنوان هیدروکسیلیشن مونواکسیژناز عمل می‌کند تا هیدروکسیلاسیون اسیدهای چرب (C12) را برای تولید اسید 7-OH-lauric مورد نیاز برای پیش‌ساز سنتز اسپوروپولنین، تسریع نماید. در مقایسه با نوع بارور TM-1، GhCYP450-At (ms5) منجر به پایان زودرس ترجمه GhCYP450 می‌شود، در حالی که GhCYP450-Dt (ms_6) علاوه بر تغییرات در سه اسید آمینه(D98E، E168K، G198R در ناحیه کد کننده، 7 جفت باز (GGAAAAA) اضافه شده در دنباله پروموتور نیز دارد. بررسی مکانیسم‌های نرعقیمی ms_5ms_6 به ما درک عمیق‌تری نسبت به ایجاد و کاربرد هتروزیس می‌دهد (مائو و همکاران، 2022).

توسعه ارقام هیبرید پنبه با استفاده از لاین‌های GMS: لاین نرعقیم ژنتیکی Dong-A و لاین‌های خواهری آن در اصلاح بیش از بیست هیبرید مختلف دارای عملکرد بالا، کیفیت فوق‌العاده الیاف و هیبریدهای تاریخته Bt مانند Chuanzamian (CZM) 4، CZM 27، CZM 32، CZM . 35، CZM 40 که عموماً نسبت به ارقام محلی بیش از 10 درصد عملکرد بیشتری دارند، استفاده شده است (هوانگ، 2007؛ زینگ و همکاران، 2017). در میان این هیبریدها، CZM 1، 2 و 4 اولین هیبریدهای GMS بودند که در سال 1985 در چین ایجاد و آزادسازی شدند. CZM 4 اولین هیبرید مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی بود و بنابراین در مقیاس وسیعی کشت شد (هوانگ و شی، 1988).

در هند، لاین نرعقیم ms_5ms_6، به نام Greg در سال 1970 از ایالات متحده آمریکا وارد شد. اولین هیبرید GMS به نام "Suguna" ایجاد و آزادسازی شد، اما به‌طور گسترده کشت نشد (رجا و همکاران، 2018). این لاین GMS مغلوب مضاعف در تولید بذر هیبرید پنبه در چین استفاده می‌شود. ارقام هیبرید متعددی با استفاده از این لاین‌های نرعقیمms_5ms_6، اصلاح شده‌اند که شامل ارقام با کیفیت الیاف خوب مانند NAU 98-4 و ارقام هیبرید تاریخته Bt با عملکرد بالا مانند6 NAU هستند و به‌طور گسترده در YaRCGR کشت شده‌اند (ژانگ و ژو، 2004 و 2005). با انتقال ژن‌های Bt و GMS ms_5ms_6 به رقم تجاری ZMS 12 (زینگ و همکاران، 2017)، رقم موفق ZK-A GMS توسط CRI/CAAS آزادسازی شد (زینگ و همکاران، 1999). با استفاده از ZK-A به‌عنوان والد، هیبریدهای تاریخته Bt ZMS38 و ZMS54 ایجاد و به‌طور گسترده در YaRCGR کشت شده‌اند (زینگ و همکاران، 2017).

تولید بذر هیبرید GMS با گرده‌افشانی دستی: نحوه تولید بذر هیبرید GMS با گرده‌افشانی دستی شامل شناسایی و عقیم‌سازی گیاهان بارور پایه پدری و انجام گرده‌افشانی قبلاً بررسی شده است (ژانگ و پن، 1999). تکثیر لاین GMS مانند ms_5ms_6 و تولید بذر هیبرید در شکل 1 شرح داده شده است. زمانی که گیاهان نربارور هتروزیگوت مانند $Ms_5ms_5ms_6ms_6$ یا $ms_5ms_5Ms_6ms_6$ اصلاح شده و به‌عنوان والد نر با گیاهان نرعقیم ($malster_5ms_6$) تلاقی داده می‌شوند، نتاج آنها به نسبت 1:1 به گیاهان نرعقیم و نربارور تفرق می‌یابند. این نتاج می‌توانند به‌عنوان لاین نرعقیم مغلوب در تولید بذور هیبرید بکار روند. در تولید بذر هیبرید به سه ناحیه ایزوله برای تکثیر لاین GMS، لاین برگداننده باروری والدین و تولید بذر هیبرید نیازاست. بذور هیبرید در مساحت بزرگی با روش گرده‌افشانی دستی گیاه به گیاه با رقم برگداننده باروری تولید می‌شوند. این یکی از ویژگی‌های مهم لاین‌های GMS است.

در تولید بذر هیبریدی F_1 باید تا مرحله گلدهی صبر کرد تا گیاهان بارور شناسایی و حذف شوند. این روش پرزحمت و زمان‌بر است و هزینه تولید بذر هیبرید را افزایش می‌دهد. بنابراین، توسعه لاین GMS با ویژگی‌های ظاهری مشخص (نشانگر) که در مرحله بذر یا گیاهچه تظاهر می‌یابند، مفید خواهد بود. اگرچه چنین لاین‌هایی شناسایی شده‌اند، اما تاکنون هیچ رقم هیبریدی با استفاده از این لاین‌های GMS ایجاد نشده است. با استفاده از این لاین‌های با ویژگی‌های ظاهری مشخص در فرآیند "یک لاین با دو هدف" که در شکل 1 نشان داده شده است، بذور هیبرید تولید شده با استفاده از لاین GMS مضاعف می‌توانند برای تولید هیبریدهای F_1 و F_2 استفاده شوند تا هزینه تولید بذور هیبرید کاهش یابد. اگرچه تقریباً 6٪ از گیاهان نرعقیم در این جمعیت F_2 تفرق می‌یابند، اما ممکن است بتوان از روی فنوتیپ مشخص در مرحله جوانه‌زنی یا گلدهی در مزرعه، بدون تأثیر زیاد بر عملکرد کل این گیاهان را حذف کرد. علاوه بر این، در منطقه‌ای با درصد تلاقی طبیعی بالا، حتی نیازی به حذف چنین گیاهان نرعقیمی نیست (جینگ و همکاران، 1994).



شکل 1- تکثیر و استفاده از لاین‌های GMS ms_5ms_6 در تولید بذور هیبرید

بهره‌برداری از هتروزیس با استفاده از لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS)

لاین‌های دارای نرعقیمی سیتوپلاسمی: با توجه به روند سقط دانه گرده، نرعقیمی سیتوپلاسمی را می‌توان به انواع اسپوروفیتی و گامتوفیتی تقسیم کرد. نرعقیمی اسپوروفیتی توسط ژنوتیپ اسپوروفیت کنترل می‌شود، و هیبرید F_1 حاصل از تلاقی لاین CMS با لاین بازگداننده باروری توانایی تولید دانه گرده بارور را دارد. لاین‌های نرعقیم *G. harknessii* CMS-D2-2 و 104-7A از نوع نرعقیمی اسپوروفیتی

هستند. با این وجود، لاین CMS-D8 *G. trilotum* به‌عنوان لاین نرعقیم گامتوفیتی شناخته شده است، و باروری آن توسط ژنوتیپ گامتوفیت کنترل می‌شود، و تنها نیمی از دانه‌های گرده هیبرید F_1 حاصل از آن بارور هستند.

انواع زیادی از لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS) در پنبه ایجاد شده‌اند (ژانگ و پن، 1999). از سال 1965، لاین‌های CMS با سیتوپلاسم‌هایی از *G. arboreum* (A2)، *G. anomalum* Wawr. and Peyr (B1) (مایر و مایر، 1965)، *G. harknessii* Brandg. (D2-2) (مایر، 1975)، و *G. trilobum* (DC.) Skov (D8) (استوارت، 1992) در آمریکا ایجاد شده‌اند. یک نوع جدید از لاین‌های CMS، به نام 104-7A، منتخب از بین نتاج حاصل از تلاقی *G. hirsutum* cv. Shiduan 5 و *G. batbadense* cv. Junhaimian در چین ایجاد شد (جیا، 1990). یک لاین CMS به نام "Xiangyuan A " نیز از تلاقی G. thurberi با لاین GMS به نام Dong-A و تلاقی برگشتی با *G. hirsutum* به‌عنوان والد تکرار شونده، ایجاد شد (ژو و همکاران، 2013). تعیین ارتباط بین لاین‌های CMS اخیراً شناسایی شده نیاز به بررسی دارد. نرعقیمی لاین‌های CMS در سیتوپلاسم *G. arboreum* و *G. anomalum* پایدار نیست؛ زیرا توسط عوامل محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و فاقد ارزش عملی است (مایر و مایر، 1965). فقط لاین‌های CMS مربوط به (CMS-D2-2) *G. harknessii* و 104-7A به‌ترتیب برای تولید هیبرید پنبه در هندوستان و چین مورد استفاده قرار گرفته‌اند (زینگ و همکاران، 2017).

ژنتیک و ژنومیکس بازگرداندن باروری لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (CMS): دو ژن غالب مستقل به نام‌های Rf_1 و Rf_2، با فاصله 0/93 سانتی‌مورگان، بازگرداندن باروری دو سیستم CMS اصلی، یعنی CMS D2-2 و CMS-D8 ، را کنترل می‌کنند (ژانگ و استوارت، 2004). ژن Rf_1 مربوط به D2-2 می‌تواند باروری را به هر دو لاین CMS D2-2 و CMS-D8 بازگرداند، اما ژن Rf_2 از D8 فقط می‌تواند باروری را به لاین‌های CMS-D8 بازگرداند (ژانگ و استوارت، 2001). بنابراین، ژن Rf_1 دارای پتانسیل زیادی برای بهره‌برداری از هتروزیس می‌باشد.

هر دو ژن بازگرداننده باروری، یعنی Rf_1 و Rf_2، به‌طور دقیق نقشه‌یابی شده‌اند. گائو و همکاران (1998) نخستین بار یک مارکر دارای تکثیر تصادفی قطعات چندشکل DNA (RAPD) به نام $OPV\text{-}15_{300}$، را که با ژن Rf_1 پیوسته می‌باشد، گزارش کردند. با کمک تجزیه تفرق توده (bulked segregant analysis) و لاین‌های ایزوژن نزدیک (NIL)، این آزمایشگاه ژن Rf_1 را با سه مارکر SSR و دو مارکر RAPD دیگر متصل نمود (لیو و همکاران، 2003). یک نقشه ژنتیکی با وضوح بالا که دربردارنده‌ی 13 مارکر در فاصله ژنتیکی 0/9 سانتی‌مورگان بود، از ژن Rf_1 ایجاد شد و برای غربالگری یک کتابخانه کروموزوم مصنوعی باکتریایی (BAC) از یک لاین بازگرداننده باروری به نام 0-613-2R (که دربردارنده‌ی ژن Rf_1 بود) بکار برده شد. براساس توالی‌های دنباله‌های 50 کتابخانه مصنوعی باکتریایی از تک کلون‌های مثبت غربال شده، دو مارکر نقاط نشانمند از توالی (STS) دارای لینکاژ شدید با ژن Rf_1 نشانمند شده و در این نقشه ادغام شدند. نقشه فیزیکی ژن Rf_1 به‌وسیله انگشت‌نگاری کلون‌های مثبت برش یافته با آنزیم HindIII ایجاد شد. موقعیت مکانی ژن Rf_1 به حداقل دو کلون BAC گسترده شده در فاصله تقریباً 100 جفت بازی بین دو کلون طراحی شده K 05-081 و 052-01N، محدود شده است (یین و همکاران، 2006). با توالی‌یابی این دو کتابخانه مصنوعی باکتریایی، 5 ژن پروتئین تکرار شونده پنتاتریکوپپتید (PPR) بسیار مشابه و خوشه‌ای به‌عنوان کاندیداهای ژن Rf_1 برای بازگرداندن باروری CMS-D2-2 شناسایی شدند (یانگ و همکاران، 2010)، که با اکثر گزارشاتی که در آن ژن‌های بازگرداننده باروری (*Rf*) پروتئین PPR کد می‌کنند، مطابقت داشت (کیم و ژانگ، 2018). با این وجود، تشخیص اینکه کدام ژن (یا احتمالاً چندین ژن) مسئول Rf_1 یا حتی Rf_2 است،

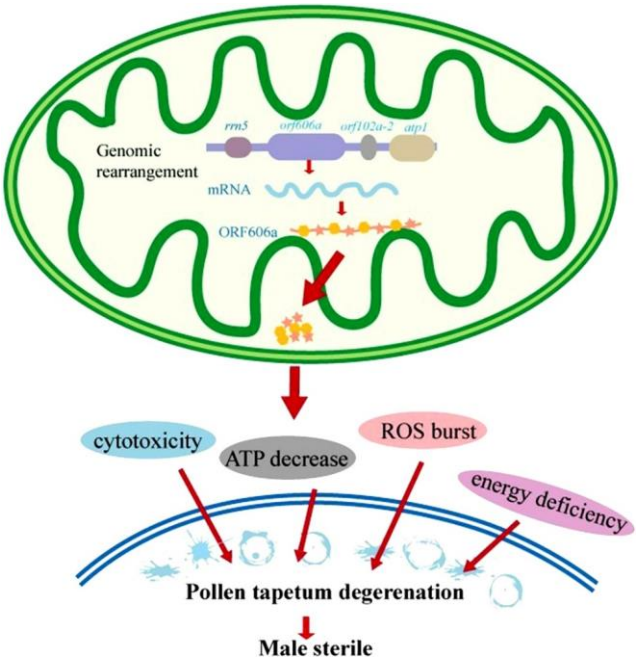
مشکل می‌باشد. به‌دلیل اهمیت این ژن در استفاده از هتروزیس، بسیاری از مارکرها مانند RAPD، SSR، STS و InDEL پیوسته با *Rf1* توسعه یافته و در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (ژانگ و استوارت، 2004؛ فنگ و همکاران، 2005).

یک نشانگر RAPD به نام UBC188-500، دارای پیوستگی نزدیک با *Rf2* برای اولین بار گزارش شد (ژانگ و استوارت، 2001 و 2004). ژن‌های *Rf1* و *Rf2* با عنوان بازگرداننده‌های باروری به‌ترتیب CMS-D2 و CMS-D8 در یک فاصله ژنتیکی 1/4 سانتی‌مورگانی متصل شدند (وانگ و همکاران، 2007a؛ وانگ و همکاران، 2009b). ژن‌های PPR در درون مکان‌های ژنی *Rf1* خوشه‌بندی شدند (وو و همکاران، 2014؛ وو و همکاران، 2017؛ ژانگ و همکاران، 2018). با استفاده از فناوری توالی‌یابی homocap، گائو و همکاران (2022) تفاوت‌های گسترده‌ای را در درون خوشه ژنی D05-PPR در لاین بازگرداننده باروری گزارش کردند، که نشان‌دهنده این است که خوشه ژنی D05-PPR با بهبود باروری مرتبط است. کلون کردن ژن‌های بازگرداننده باروری می‌تواند استفاده از آنها را در هتروزیس پنبه تسهیل نماید و کارایی سیستم هیبرید سه لاینی را بهبود بخشد.

مکانیسم مولکولی نرعقیمی سیتوپلاسمی در پنبه: میتوکندری، به‌عنوان یک اندامک نیمه‌مستقل، تعداد زیادی توالی تکرار شونده دارد، که بازآرایی ژن را برای ایجاد ژن‌های شیمری جدید دارای پیوستگی نزدیک با نرعقیمی سیتوپلاسمی، وساطت می‌کنند (هو و همکاران، 2014). تاکنون، 31 ژن CMS در ژنوم میتوکندری 14 گونه گیاهی مانند برنج، ذرت، سویا و گندم شناسایی شده‌اند (جینگ و همکاران، 2012؛ لئو و همکاران، 2013؛ یاماگیشی و همکاران، 2019؛ ملونک و همکاران، 2021؛ جیانگ و همکاران، 2022؛ یانگ و همکاران، 2022). وانگ و همکاران (1998) DNA میتوکندریایی مربوط به چندین لاین CMS را با استفاده از مارکرهای RAPD آنالیز کردند و دریافتند که محرک اصلی CMS در پنبه، DNA نابجای میتوکندریایی (Aberrant mitochondrial DNA) است. فنگ و همکاران (2000) به‌وسیله مارکر RFLP تفاوت‌های عمده‌ای بین ژنوم‌های میتوکندریایی لاین CMS مربوط به *G. harknessii* و لاین نربارور طبیعی *G. hirsutum* مشاهده کردند. به کمک مطالعات مقایسه‌ای پروتئین‌ها و DNAهای میتوکندریایی بین لاین A دارای نرعقیمی سیتوپلاسمی *G. harknessiii* و لاین B مربوط به آن، فقدان یک پلی پپتید 31 کیلو دالتونی در مرحله سقط جنین لاین CMS میتوکندریایی کشف شد (وانگ، 2000). با استفاده از چهار ژن میتوکندریایی به‌عنوان کاوشگر (probe) (*rrn26S*، *atp9*، *atp6*، *coxII*) مشاهده شد که لاین CMS فاقد یک قطعه 1/9 کیلو بازی همسان با ژن *coxII* می‌باشد. موتاسیون در ژن *coxII* می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد میتوکندری و در نتیجه ایجاد نرعقیمی شود (وانگ، 2000؛ وانگ و همکاران، 2009a). لی و همکاران (2018) ژنوم‌های میتوکندریایی 2074A، 2074S و همچنین لاین B و لاین بازگرداننده نرباروی مربوطه‌شان را هم‌گذاری (Assemble) کردند و چهار ORF (open reading frame) رونویسی شده در 2074A را شناسایی نمودند. یک رونویسی نابجا از *cox3* در لاین نرعقیم سیتوپلاسمی H276A یافت شد (خان و همکاران، 2022a). ژن‌های متیله شده مرتبط با مسیرهای متابولیسم نشاسته، سوکروز و گالاکتوز و پنج ژن کلیدی مرتبط با CMS شناسایی شده‌اند (یو و همکاران، 2022). برخی از بیان‌های متفاوت miRNAها ممکن است تنظیم کننده‌های وقوع نرعقیمی باشند (لی و همکاران، 2021).

اطلاعات ژنوم توالی‌یابی شده میتوکندری برای سیستم هیبرید سه لاینی در پنبه در جدول 1 ارائه شده است. به‌وسیله آنالیز مقایسه‌ای ژنوم میتوکندری و ترانسکریپتوم، چهار ORF اختصاصی در لاین CMS-D2 ی Simian 3A شناسایی شدند، که از میان آنها، orf606a، که همولوگ orf610a می‌باشد، در لاین CMS-D2 به میزان زیادی بیان شده است، و به‌عنوان ژن کاندید CMS-D2 فرض شده است (حمید و

همکاران، 2018 و 2019؛ ژوان و همکاران، 2022). به‌طور مشابه، توالی کامل ژنوم میتوکندریایی لاین CMS-D2 با نام "ZBA" به‌صورت یک مولکول دایره‌ای شکل منفرد با طول 634036 جفت باز هم‌گذاری شده است. از میان 194 تا ORF حاشیه نویسی شده (Annonated)، 36 ژن کد کننده پروتئین، شش RNA ریبوزومی و 24 تا RNA ناقل، یک ژن شیمری از قبل ناشناخته با نام orf610a که از atp1 و یک توالی 48 جفت بازی پایین دست با ماهیت ناشناخته تشکیل شده، شناسایی شده است. Orf610a به‌طور اختصاصی در لاین CMS-D2 بیان می‌شود. بیان نابجای ORF610a در گیاه آرابیدوپسیس نرعقیمی جزئی ایجاد کرد. تعامل بین ORF610a و پروتئین هسته‌ای RD22 ارتباط بین ORF610a و سقط دانه گرده را نشان می‌دهد، که بیانگر این است که ژن CMS میتوکندریایی، یعنی orf610a، ممکن است عامل نرعقیمی CMS-D2 باشد (ژانگ و همکاران، 2022). فرآیند سقط دانه گرده لاین CMS با مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) همراه است (شکل 2).



شکل 2- مدلی از مکانیسم اساسی لاین نرعقیم CMS-D2 در پنبه. پروتئین ORF606a ممکن است سمی باشد و منجر به کاهش سنتز ATP، و انفجار ROS در تاپتال دانه گرده، و به‌تدریج منجر به نرعقیمی شود.

تولید و توسعه ارقام هیبرید CMS: سیستم اصلاح هیبرید مبتنی بر CMS از یک سیستم هیبرید سه لاینی، شامل لاین نرعقیم (لاین A)، لاین نگهدارنده نرعقیمی (لاین B) و لاین بازگرداننده باروری (لاین R)، استفاده می‌کند. از بین این لاین‌ها، انتخاب لاین R بسیار مهم است و براساس هیبریداسیون متقاطع (Cross hybridizing)، اصلاح برگشتی (Backcross breeding) و غربالگری تست کراس (Test-cross screening) انجام می‌شود. وانگ و همکاران (2003) با وارد کردن گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) به لاین بازگرداننده باروری توسط اگروباکتریوم[1]، لاین بازگرداننده "Zhedaqianghu" را ایجاد کردند که به‌وسیله آن هیبرید نرعقیم Zheza 2 تولید شد (ژو و همکاران، 2006). لاین‌های نرعقیم A و R بسیار عالی‌ای طی دهه‌های گذشته انتخاب شده‌اند، که سهم بسزایی در هتروزیس پنبه ایفا کرده‌اند.

[1] Agrobacterium

در سال 2005، برای نخستین بار دو هیبرید CMS سه لاینی با نام‌های Yinmian 2 و Zheza 2 به‌ترتیب توسط مؤسسه بیوتکنولوژی CAAS و دانشگاه Zhejiang تولید شد. Yinmian 2 یک رقم هیبرید تراریخته مقاوم به Bt است (ژو و همکاران، 2006؛ گوا و همکاران، 2007). این هیبرید عملکرد بالایی داشت، و 21/1 درصد عملکرد بالاتری نسبت به رقم شاهد ZMS 41 نشان داد. متعاقباً، هیبریدهای CMS تراریخته Bt به نام‌های ZMS83 و ZMS99 تولید شده توسط CRI/CAAS به‌ترتیب در سال‌های 2011 و 2016، و هیبرید Luza 2138 تولید شده توسط مرکز تحقیقات پنبه Shangdong چین در سال 2017، آزادسازی و در چین کشت شدند (زینگ و همکاران، 2017). با این حال، به‌دلیل هزینه بالای تولید بذرهای هیبرید به‌وسیله CMS و با گرده‌افشانی دستی، این هیبریدها در سطح وسیع کشت نمی‌شوند. تعدادی هیبرید بین گونه‌ای CMS-D2-2 مانند Xinluzhong 24 و Xinluzhong 43 در Xinjiang تولید شده‌اند. Xinluzhong 43 که حاصل تلاقی بین *G. hirsutum* acc. H-286A و *G. barbadense* acc. 75R می‌باشد، در سال 2009 در Xinjiang آزادسازی شد. عملکرد محلوج آن (2217/9 کیلوگرم در هکتار) مشابه رقم شاهد (2185/1 کیلوگرم در هکتار) بود، اما کیفیت الیاف آن خیلی بهتر بود، و طول الیاف آن 35 میلی‌متر، استحکام الیاف 34/46 CN/tex و ضریب میکرونری آن 3/53 بود.

جدول 1- اطلاعات ژنوم میتوکندریایی توالی‌یابی شده برای سیستم هیبرید سه لاینی در پنبه

گونه	مواد ژنتیکی	ژنوم(bp)	شماره نمونه ژنتیکی	ژنها	منبع
G. hirsutum	2074S (CMS-AD1)	668584	JX944505.1	37 protein genes, 30 tRNA genes and 8 rRNA genes	Li et al.(2018)
G. harknessii	2074A (CMS-D2)	668464	JX536494.1	37 protein genes, 30 tRNA genes and 8 rRNA genes	Li et al.(2018)
G. hirsutum	2074B (maintainer)	621884	JX065074.1	36 protein genes, 29 tRNA genes and 8 rRNA genes	Li et al.(2018)
G. harknessii	E5903 (Restorer)	666081	JX944506.1	37 protein genes, 30 tRNA genes and 8 rRNA genes	Li et al.(2018)
G. hirsutum	ZBA (CMS-D2)	634036	SRR17406254	44 protein genes, 24 tRNA genes and 6 rRNA genes	Zhang et al.(2022)
G. hirsutum	SI3A (CMS-D2)	634203	ON931349,ON931350,ON931351	33 protein genes, 25 tRNA genes and 6 rRNA genes	Xuan et al.(2022)
G. hirsutum	0–613-2R (Restorer)	607367	ON931352	33 protein genes, 26 tRNA genes and 6 rRNA genes	Xuan et al.(2022)

گزارش شده است که سیتوپلاسم مربوط به *G. harknessii* می‌تواند اثرات مضری بر روی عملکرد هیبریدهای F_1 داشته باشد. عقیمی جزئی پایه مادری منجر به بذور ناقصی می‌شود که عملکرد بذر و الیاف پنبه را کاهش می‌دهد (وانگ و همکاران، 1997). بنابراین، هیبرید برتر می‌تواند از طریق تست‌کراس گسترده انتخاب شود و گزینش می‌تواند بر اثرات منفی غلبه نماید.

تولید بذور هیبرید با لاین‌های نرعقیم گرده‌افشانی شده توسط حشرات: پنبه دارای دانه‌های گرده بزرگ کروی است. این دانه‌های گرده خاردار و بزرگ به‌وسیله باد پخش نمی‌شوند و حشرات عوامل طبیعی نقل و انتقال دانه‌های گرده پنبه هستند. بنابراین برای تولید بذور هیبرید توجه زیادی به استفاده از لاین‌های نرعقیم گرده‌افشانی شده توسط حشرات معطوف شده است (ژانگ و پن، 1999). زنبور

عسل (*Apis mellifera* L.) ناقل اصلی برای گرده‌افشانی پنبه است و بازدهی انتقال به تعداد و توزیع کلونی زنبور عسل بستگی دارد. اگر منبع زنبور برای تولید بذر هیبرید به‌طور اساسی تأمین شود، و یا تعداد کافی‌ای زنبور از مزرعه بازدید کنند (در هر 100 گل تعداد 1-0/5 زنبور برای توزیع خوب دانه گرده لازم است)، گرده‌افشانی به‌وسیله زنبور عسل از طریق لاین نرعقیم برای تولید بذور هیبرید امکان‌پذیر خواهد بود. با این وجود، در مناطقی که در آن نرخ تلاقی طبیعی بالا است، متوسط عملکرد بذر پنبه در گیاه نرعقیم قابل مقایسه با گیاه نربارور نخواهد بود، و در مناطقی که در آنها نرخ تلاقی تصادفی پایین است، عملکرد کاهش بیشتری نشان می‌دهد (فنگ، 1990).

زنبور عسل به‌صورت مصنوعی به‌طور وسیعی پرورش داده می‌شود و به آسانی در دسترس است؛ بنابراین، به‌عنوان مؤثرترین ناقل برای تولید بذور هیبرید شناخته شده است. در منطقه تولید پنبه در Sichuan چین، 22 نوع حشره متعلق به *Hymenoptera* و 5 نوع حشره متعلق به *Diptera* در مرحله گلدهی شناسایی شدند که با گرده‌افشانی پنبه مرتبط می‌باشند. در میان حشرات *Hymenoptera*، زنبور عسل، زنبور bumble (*Bumbus* spp) و زنبورهای برنده برگ (*Megachile conjunctifomis*) ناقل‌های اصلی گرده‌افشانی پنبه هستند. در شهر Zu بخش هبی چین دو دوره اوج بازدید زنبور عسل از مزرعه پنبه یعنی ساعت 11 صبح و 3 بعدازظهر مشاهده شد. فعالیت حشرات به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد، به‌ویژه، اسپری کردن حشره‌کش‌ها شدیدترین اثرات را در مرحله گلدهی کامل خواهد داشت. شرایط آب و هوایی نامساعد مانند طوفان شدید، رعد و برق و بارش باران نیز بر گرده‌افشانی توسط زنبور عسل تأثیر منفی می‌گذارد (فنگ، 1990).

چالش‌ها و فرصت‌ها

توسعه هسته والدی برای بهره‌برداری از هتروزیس: تقویت ژرم پلاسم اساس کار اصلاح هیبرید است. ZMS-12 که بزرگ‌ترین رقم پنبه آپلند رشد یافته در چین است، با عملکرد بالا، کیفیت بهتر الیاف، مقاومت به بیماری، سازگاری وسیع و قدرت ترکیب‌پذیری بالا شناخته می‌شود. ZMS-12 و لاین‌های حاصل از شجره آن برای ایجاد هیبریدهای برتر شامل ZMS-28، ZMS-29، XZM 2 و Jimian 18 مورد استفاده قرار گرفتند. به‌دلیل توانایی ترکیب‌پذیری خوب ZMS-12، 84 رقم به‌طور مستقیم از ZMS-12 اصلاح شده‌اند، که از این تعداد، هفت رقم هیبرید و شش رقم تراریخته مقاوم به Bt قبل از 2002 اصلاح شده‌اند (گوا و همکاران، 2002). در بین این ارقام، ZMS-12، ZMS-28 و Jimian 18 در YeRCGR، و ZMS-29 و XZM-2 در YaRCGR کشت شدند (هوانگ، 2007؛ زینگ و همکاران، 2017). با انتقال ژن‌های Bt و GMS ms_5ms_6 به ZMS-12، یک لاین GMS به نام Zhongkang-A (ZK-A) در پس زمینه ZMS-12 اصلاح شده است (زینگ و همکاران، 2017). با کمک این ZK-A هیبریدهای برتر به‌دلیل قابلیت ترکیب‌پذیری بالا به راحتی شناسایی شده‌اند و ارقام ZMS-38 و ZMS-54 در CRI/CAAS توسعه یافته‌اند. بنابراین، ZMS-12 به‌عنوان والد اصلی نقش بسیار مهمی در اصلاح پنبه و کاربرد هتروزیس در چین، ایفا می‌کند. شجره و کاربرد ارقام ZMS-12 و همچنین Shiyuan 321 در اصلاح ارقام هیبرید در شکل 3 ارائه شده است. با توسعه و کاربرد ZMS-12 به‌عنوان والد اصلی توجه زیادی به سمت ایجاد هسته والدی معطوف شده است.

کاربرد هتروزیس F_2 در پنبه: به‌دلیل افزایش مداوم هزینه تولید، کاشت ساده، مؤثر و کم هزینه پنبه به امری اجتناب‌ناپذیر تبدیل شده است، که همین موضوع منجر به چالش در کاربرد هتروزیس در پنبه می‌شود. گرده‌افشانی کارآمد و قابل کنترل پیش‌نیازی برای تولید تجاری انبوه بذور هیبرید است. در هیبرید F_2 هتروزیس وجود دارد و معمولاً 5 تا 15 درصد عملکرد بالاتری نسبت به ارقام شاهد دارد. کاربرد هتروزیس F_2 حداقل در چین هنوز شیوه‌ای برای اصلاح پنبه در آینده می‌باشد. امروزه منطقه سین کیانگ اویغور به یکی از بزرگ‌ترین پایگاه‌های تولید

پنبه در سرتاسر جهان تبدیل شده است. در سال 2021، پنبه در منطقه سین کیانگ در مساحتی بالغ بر 2/50 میلیون هکتار کشت شد و 5/39 میلیون تن محلوج تولید کرد، که حدود 82/8 درصد از سطح زیر کشت و 89/5 درصد از تولید پنبه چین را به خود اختصاص داد که به نوبه خود تقریباً یک پنجم تولید پنبه جهان را شامل می‌شود؛ بنابراین، سین کیانگ جایگاه منحصر بفردی را در صنعت پنبه دنیا به خود اختصاص داده است.

جدول 2- اثرات تولید هیبرید با نسبت‌های مختلف گیاه والدی (زینگ و همکاران، 2005)

مکان	نانیانگ، هنان				آنیانگ، هنان			
نسبت	1:3	1:4	1:5	1:6	1:3	1:4	1:5	1:6
تعداد غوزه در هر گیاه	16/3	15/4	11/5	8/1	14/0	13/3	11/2	5/7
عملکرد بذر پنبه (kg/hm2)	2700/4	2566/8	1932/0	1360/8	2940/0	2793/0	2352/0	1197/0
عملکرد بذر (kg/hm2)	1620/4	1540/0	1056/4	796/8	1675/6	1564/5	1340/6	694/8
بذر هیبرید (kg/hm2)	1215/2	1232/5	880/3	682/9	1225/7	1251/6	1117/2	595/5

چالش‌های توسعه هیبرید F_2 به‌شرح زیر می‌باشند (ژانگ و همکاران، 2023):

1- در گزینش لاین‌های والدینی، تفاوت زیادی در طول الیاف دو والد (در محدوده 1/5 میلی‌متر) و مرحله رشدی نباید وجود داشته باشد، در غیر این صورت یکنواختی طول الیاف در نسل F_2 نمی‌تواند نیازهای صنعت نساجی را برآورده سازد.

2- هیبرید (هیبریدهای) تولید شده با استفاده از *G. hirsutum* CMS-D8 به‌عنوان نرعقیم گامتوفیتی می‌توانند در نسل F_2 مورد استفاده قرار گیرند، زیرا با اینکه فقط نیمی از دانه‌های گرده F_1 توانایی بازگرداندن باروری را دارند، والدین F_2 توانایی بازگرداندن کامل باروری را دارند.

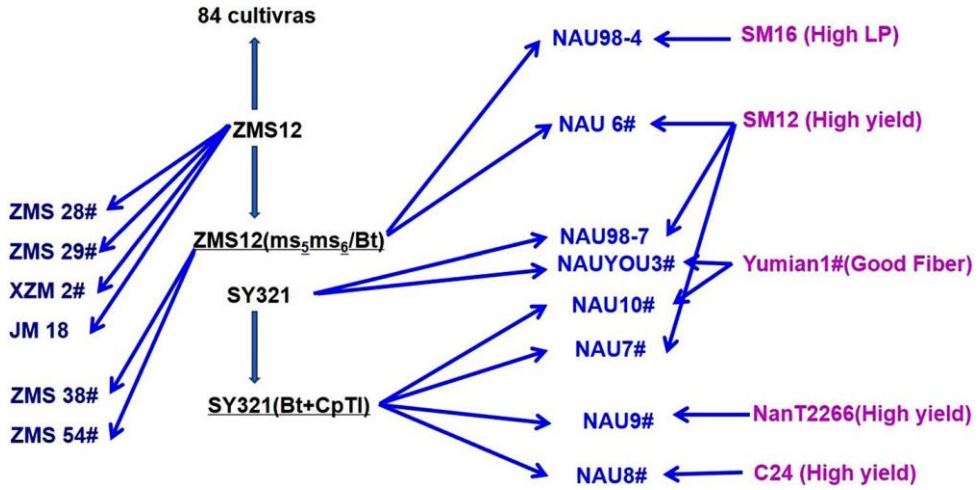
3- گزینش و تأیید هتروزیس بالا در نسل F_2، زیرا با وجود اینکه هتروزیس بالایی در نسل F_1 وجود دارد، برخی از هیبریدهای F_2 هتروزیس نشان نمی‌دهند.

4- در نسل F_2 هتروزیس در عملکرد وجود دارد، اما در کیفیت الیاف F_2 هتروزیس وجود ندارد.

5- استفاده از گامت‌کش‌های شیمیایی. تولید ارقام هیبرید با روش اخته‌سازی دستی راحت است و تلاقی‌ها به‌راحتی انجام می‌گیرد. برخی گامت‌کش‌های شیمیایی برای کشتن پرچم‌هادر پنبه غربال‌گری شده‌اند که هیچ‌گونه آسیبی به مادگی و قابلیت باروری طبیعی آن وارد نمی‌سازند.

بررسی و تقویت نرعقیمی ژنتیکی حساس به محیط: مطلوب‌ترین روش تولید بذور هیبرید استفاده از لاین GMS یا CMS همراه با گرده‌افشانی به کمک حشرات است و در صورتی که دانه گرده به اندازه کافی وجود داشته باشد، لاین‌های A و B گرده‌افشانی شده به کمک زنبور عسل می‌توانند عملکردهای مساوی از بذر پنبه در مزرعه تولید کنند. شناسایی و بهبود نرعقیمی ژنتیکی حساس به شرایط محیطی القاء شده به‌وسیله عواملی مانند نور و دما این امکان را فراهم ساخته است تا از برخی صفات GMS به‌منظور اصلاح گیاهان هیبرید استفاده شود. لاین EGMS می‌تواند به‌عنوان یک لاین نرعقیم، و همچنین در صورت کنترل شرایط مساعد محیطی و تحقق اصلاح متقاطع دو لاین، به‌عنوان لاین نگهدارنده باروری مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به عوامل محیطی غالب، EGMS می‌تواند به سه دسته تقسیم شود: حساس به طول دوره نوری (PGMS)، حساس به دما (TGMS) و حساس به دما و نور (PTGMS) (چن و همکاران، 2019). در پنبه آپلند، یک موتانت PGMS به نام CCRI9106 مشتق شده از CCRI040029 با استفاده از تکنولوژی اصلاح به روش موتاسیون فضایی شناسایی شده است. CCRI9106 جهش یافته تحت

شرایط طول روز بلند نرعقیم می‌شود و این نرعقیمی به‌صورت ژنتیکی با یک ژن مغلوب به نام ys-1 که به کروموزوم D12 متصل است، کنترل می‌شود (لیو و همکاران، 2014؛ ژانگ و همکاران، 2020). GMS حساس به طول روز و حساس به دما در برنج به وسیله یک جهش نقطه‌ای در RNA جدید غیرکد شونده که RNA کوچکی تولید می‌کند، ایجاد شده است (ژو و همکاران، 2012)، با این وجود، برای رفع مشکل هزینه بالای گرده‌افشانی در تولید بذر هیبرید، تعیین مکانیسم موتاسیون ys-1 و نحوه استفاده از این PGMS در بهره‌برداری از هتروزیس، نیاز به بررسی بیشتر دارد.



شکل 3- شجره هیبریدهای تولید شده با استفاده از ZMS12 و SY321 به‌عنوان والدین اصلی

جمع‌بندی و چشم اندازهای آینده

یکی از اهداف اصلاحی پنبه، تولید ارقامی است که با توجه به شرایط اقلیمی هر منطقه، دارای صفات مطلوب باشند. راه‌های متفاوتی برای رسیدن به این اهداف وجود دارد که یکی از آن‌ها دورگ‌گیری درون و بین گونه‌ای است، که منجر به تولید هیبریدهای دارای صفات مطلوب می‌شود. در هیبریداسیون درون گونه‌ای، واریته‌های زراعی با واریته‌ها و یا ژنوتیپ های دارای صفات مطلوب تلاقی داده می‌شوند و بدین ترتیب با بهبود صفات نامطلوب در واریته زراعی مورد نظر و اضافه کردن یک سری صفات مطلوب به آن، یک رقم ایده‌آل بدست می‌آید. واریته‌های هیبرید اغلب به‌دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی مانند هتروزیس، یکنواختی، عملکرد بالا، سازگاری و غیره، بهتر از واریته‌های با گرده‌افشانی باز عمل می‌کنند. به‌منظور پاسخگویی به تقاضای غذا، پوشاک، خوراک و مواد خام، برای جمعیت رو به رشد جهان، کشت واریته‌های هیبریدی در حال حاضر روشی کارآمد در افزایش تولید جهانی پنبه است. در حال حاضر هیبریدهای پنبه با استفاده از لاین‌های GMS و CMS، همراه با گرده‌افشانی به کمک حشرات، به‌طور همزمان در تولید و کشت و کار پنبه به‌کار می‌روند. با این حال، بیشتر هیبریدهای تجاری هنوز به‌وسیله روش‌های سنتی و دستی تولید می‌شوند، که هزینه‌بر است. در نتیجه، استفاده گسترده از بذرهای هیبرید F2 در بسیاری از نقاط دنیا مشاهده می‌شود. عملکرد بیشتر و امکان بازگرداندن کامل باروری از ویژگی‌های این نوع بذرهاست. استفاده از لاین‌های نرعقیم ژنتیکی، سیتوپلاسمی و محیطی، نه تنها در کاهش هزینه‌های تولید بسیار کارآمدند، بلکه در تولید هیبریدهای با هتروزیس یکنواخت و تکرارپذیر، بسیار مؤثرند. با این حال، توسعه این ارقام نرعقیم و همچنین توسعه و نگهداری لاین‌های مفید والدینی، لاین‌های نگهدارنده و یا بازگرداننده باوری، در دوره‌های اصلاحی، بسیار هزینه بر و چالش‌برانگیز است. ظهور فناوری جدید اصلاح مولکولی برای تولید

بذر هیبرید نویدبخش است. استفاده از فناوری‌هایی همچین ویرایش ژنومی و یا توسعه نشانگرهای مولکولی مرتبط با نرعقیمی در توسعه لاین‌های GMS و لاین‌های نگهداری در نرعقیمی CMS رویکردی امیدبخش است. استفاده از این تکنولوژی‌ها در توسعه لاین‌های نرعقیم و متعاقباً تولید هیبرید، می‌تواند منجر به توسعه هیبریدهای کارآمدتر و قوی‌تری شود و نقشی محوری در تأمین امنیت غذایی ایفا کند.

منابع

1. Bohra, A., Jha, U. C., Adhimoolam, P., Bisht, D., & Singh, N. P. (2016). Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Reports*, 35, 967–993. doi: 10.1007/s00299-016-1949-3.
2. Budar, F., & Pelletier, G. (2001). Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*, 324, 543–550. https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01324-5
3. Chen, L., & Liu, Y. G. (2014). Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 579–606. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040119
4. Chen, D. Y., Ding, Y. Z., Guo, W. Z., & Zhang, T. Z. (2009). Molecular mapping of genic male-sterile genes *ms15*, *ms5* and *ms6* in tetraploid cotton. *Plant Breeding*, 128, 193–198. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01562.x
5. Feng, F. Z. (1990). Primary studies on insect pollination male sterile line to produce hybrid seeds. *China Cottons*, 17(5), 16.
6. Feng, C. D., Stewart, J. M., & Zhang, J. F. (2005). STS markers linked to the Rf1 fertility restorer gene of cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 237–243. doi: 10.1007/s00122-004-1817-3.
7. Feng, J., Zhang, X., Zhang, M., Guo, L., Qi, T., Tang, H., Zhu, H., Wang, H., Qiao, X., Xing, C., & Wu, J. (2021). Physical mapping and InDel marker development for the restorer gene Rf2 in cytoplasmic male sterile CMS-D8 cotton. *BMC Genomics*, 22, 24. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07342-y.
8. Feng, C., Guo, J., Nie, Y., Wu, Z., Zhang, X., Zhang, J., & Stewart, J. M. (2000). Cytoplasmic-nuclear male sterility in cotton: comparative RFLP analysis of mitochondrial DNA. Proceedings Beltwide Cotton Production Research Conference, San Antonio, USA, pp. 511–512.
9. Gao, B., Ren, G., Wen, T., Li, H., Zhang, X., & Lin, Z. (2022). A super PPR cluster for restoring fertility revealed by genetic mapping, homocap-seq and de novo assembly in cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 135, 637–652. doi: 10.1007/s00122-021-03990-0.
10. Guo, W. Z., Zhang, T. Z., Pan, J. J., & Kohel, R. J. (1998). Identification of RAPD marker linked with fertility-restoring gene of cytoplasmic male sterile lines in upland cotton. *Chinese Science Bulletin*, 43, 52–54. https://doi.org/10.1007/BF02885512.
11. Guo, X. M., Tan, L. W., & Liu, Z. D. (2002). Evaluating germplasm resource value of Zhongmian 12. *China Cotton*, 29, 12–14
12. Guo, S. D., Zhang, R., & Wang, Y. (2007). Research on genetic basis of three-line cotton. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 12, 11–12
13. Hamid, R., Marashi, H., Tomar, R. S., Malekzadeh Shafaroudi, S., & Sabara, P. H. (2019). Transcriptome analysis identified aberrant gene expression in pollen developmental pathways leading to CGMS in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *PloS one*, 14(6), p.e0218381. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218381.
14. Hamid, R., Tomar, R. S., Marashi, H., Shafaroudi, S. M., Golakiya, B. A., & Mohsenpour, M. (2018). Transcriptome profiling and cataloging differential gene expression in floral buds of fertile and sterile lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 660, 80-91. DOI: 10.1016/j.gene.2018.03.070
15. Horn, R., Gupta, K. J., & Colombo, N. (2014). Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Mitochondrion*, 19, 198–205. doi: 10.1016/j.mito.2014.04.004.

16. Hou, L., Xiao, Y., Li, X., Wang, W., Luo, X., & Pei, Y. (2002). The cDNA-AFLP differential display in developing anthers between cotton male sterile and fertile line of "Dong A." *Journal of Genetics and Genomics*, 29, 359–363.
17. Hu, J., Huang, W., Huang, Q., Qin, X., Yu, C., Wang, L., Li, S., Zhu, R., & Zhu, Y. (2014). Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. *Mitochondrion*, 19, 282–288. doi: 10.1016/j.mito.2014.02.008.
18. Hu, Y., Chen, J., Fang, L., Zhang, Z., Ma, W., Niu, Y., Ju, L., Deng, J., Zhao, T., Lian, J., Baruch, K., Fang, D., Liu, X., Ruan, Y-L., Rahman, M-U., Han, J., Wang, K., Wang, Q., Wu, H., Mei, G., Zang, Y., Han, Z., Xu, C., Shen, W., Yang, D., Si, Z., Dai, F., Zou, L., Huang, F., Bai, Y., Zhang, Y., Brodt, A., Ben-Hamo, H., Zhu, X., Zhou, B., Guan, X., Zhu, S., Chen, X., & Zhang, T. Z. (2019). *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton. *Nature Genetics*, 51, 739–748. doi: 10.1038/s41588-019-0371-5.
19. Huang, Z. K. (2007). Cotton Varieties and Their Genealogy in China. China Agric Sci Press, Beijing.
20. Huang, G. W., & Shi, X. Z. (1988). Chuanzha 4, a cotton hybrid by genic male sterile line. *China Cottons*, 15(3), 19.
21. Jia, Z. C. (1990). Selection of a male-sterile line 104–7A of cotton and its complete set of three lines. *China Cottons*, 6, 11.
22. Jiang, H., Lu, Q., Qiu, S., Yu, H., Wang, Z., Yu, Z., Lu, Y., Wang, L., Xia, F., Wu, Y., Li, F., Zhang, Q., Liu, G., Song, D., Ma, C., Ding, Q., Zhang, X., Zhang, L., Zhang, X., Li, X., Zhang, J., Xiao, J., Li, X., Wang, N., Ouyang, Y., Zhou, F., & Zhang, Q. (2022). Fujian cytoplasmic male sterility and the fertility restorer gene *OsRf19* provide a promising breeding system for hybrid rice. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 119(34), e2208759119.
23. Jing, B., Heng, S., Tong, D., Wan, Z., Fu, T., Tu, J., Ma, C., Yi, B., Wen, J., & Shen, J. (2012). A male sterility-associated cytotoxic protein ORF288 in Brassica juncea causes aborted pollen development. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1285–1295. doi: 10.1093/jxb/err355.
24. Jing, S. R., Liu, S. L., Yuan, Y. L., & Xing, C. Z. (1994). Studies of utilization of genetic double recessive male sterile *G. hirsutum* L. *Acta Gossypii Sinica*, 6, 28–30.
25. Justus, N., & Leinweber, L. (1960). A heritable partially male-sterile character in cotton. *Journal of Heredity*, 51, 192–192. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106987.
26. Khan, A., Kong, X., Liao, X., Zheng, J., You, J., Li, M., Hussain, R. M., Raza, H., & Zhou, R. (2022). Mitochondrial gene expression analysis reveals aberrant transcription of *cox3* in *Gossypium barbadense* CMS line H276A. *Development Genes and Evolution*, 232, 15–23. DOI: 10.1007/s00427-022-00687-2.
27. Kim, Y. J., & Zhang, D. (2018). Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding. *Trends in Plant Science*, 23, 53–65. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.10.001.
28. Kime, P. H., & Tilley, R. H. (1947). Hybrid vigor in Upland cotton-effect on yield and quality. *Journal of American Society of Agronomy*, 39, 308–317.
29. Kohel, R. J., & Lewis, C. F. (1984). Cotton. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
30. Li, S., Chen, Z., Zhao, N., Wang, Y., Nie, H., & Hua, J. (2018). The comparison of four mitochondrial genomes reveals cytoplasmic male sterility candidate genes in cotton. *BMC Genomics*, 19(1), 1–15. doi: 10.1186/s12864-018-5122-y.
31. Li, M., Chen, L., Khan, A., Kong, X., Khan, M. R., Rao, M. J., Wang, J., Wang, L., & Zhou, R. (2021). Transcriptome and MiRNA omics analyses identify genes associated with cytoplasmic male sterility in cotton (*Gossypium hirsutum* L). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4684. doi: 10.3390/ijms22094684.
32. Liu, L. W., Guo, W. Z., Zhu, X. F., & Zhang, T. Z. (2003). Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 461–469. doi: 10.1007/s00122-002-1084-0.

33. Liu, R. Z., Wang, B. H., Guo, W. Z., Qin, Y. S., Wang, L. G., Zhang, Y. M., & Zhang, T. Z. (2012). Quantitative trait loci mapping for yield and its components by using two immortalized populations of a heterotic hybrid in *Gossypium hirsutum* L. *Molecular Breeding*, 29, 297–311. DOI: 10.1007/s11032-011-9547-0
34. Liu, J., Pang, C., Wei, H., Song, M., Meng, Y., Fan, S., & Yu, S. (2014). Proteomic analysis of anthers from wild-type and photosensitive genetic male sterile mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*, 14, 390. https://doi.org/10.1186/s12870-014-0390-4.
35. Luo, D., Xu, H., Liu, Z., Guo, J., Li, H., Chen, L., Fang, C., Zhang, Q., Bai, M., Yao, N., Wu, H., Wu, H., Ji, C., Zheng, H., Chen, Y., Ye, S., Li, X., Zhao, X., Li, R., & Liu, Y. G. (2013). A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. *Nature Genetics*, 45, 573–577. doi: 10.1038/ng.2570.
36. Ma, X., Xing, C., Guo, L., Gong, Y., Wang, H., Zhao, Y., & Wu, J. (2007). Analysis of differentially expressed genes in genic male sterility cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using cDNA-AFLP. *Journal of Genetics and Genomics*, 34, 536–543. https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60059-9.
37. Ma, H., Wu, Y., Lv, R., Chi, H., Zhao, Y., Li, Y., Liu, H., Ma, Y., Zhu, L., Guo, X., Kong, J., Wu, J., Xing, C., Zhang, X., & Min, L. (2022). Cytochrome P450 mono-oxygenase CYP703A2 plays a central role in sporopollenin formation and *ms5ms6* fertility in cotton. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64, 2009–2025. doi: 10.1111/jipb.13340.
38. Mao, Y., Dai, F., Si, Z. F., Fang, L., & Zhang, T. Z. (2022). Duplicate mutations of *GhCYP450* lead to the production of ms5m6 male sterile line in cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 136(1), 2. doi: 10.1007/s00122-023-04296-z. DOI: 10.1007/s00122-023-04296-z.
39. Melonek, J., Duarte, J., Martin, J., Beuf, L., Murigneux, A., Varenne, P., Comadran, J., Specel, S., Levadoux, S., Bernath-Levin, K., Torney, F., Pichon, J. P., Perez, P., & Small, I. (2021). The genetic basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in wheat. *Nature Communications*, 12, 1036. doi: 10.1038/s41467-021-21225-0.
40. Meyer, V. G. (1975). Male-sterility from *Gossypium-harknessii*. *Journal of Heredity*, 66, 23–27. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108566.
41. Meyer, V. G., & Meyer, J. R. (1965). Cytoplasmically controlled male sterility in cotton. *Crop Science*, 5, 444–448.
42. Munir, S., Hussain, S. B., Manzoor, H., Quereshi, M. K., Zubair, M., Nouman, W., Shehzad, A. N., Rasul, S., & Manzoor, S. A. (2016). Heterosis and correlation in interspecific and intraspecific hybrids of cotton. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 15028083. http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15028083.
43. Raja, D., Kumar, M. S., Devi, P. R., Loganathan, S., Ramya, K., Kannan, N., & Subramanian, V. (2018). Identification of molecular markers associated with genic male sterility in tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through bulk segregant analysis using a cotton SNP 63K array. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54, 154–160. DOI: 10.17221/25/2017-CJGPB.
44. Rhyne, C. L. (1991). Male-steriles *ms5ms5ms6ms6* and *ms8ms8ms9ms9*. Proceedings Beltwide Cotton Production Research Conference, USA, pp. 532-533.
45. Schnable, P. S., & Springer, N. M. (2013). Progress toward understanding heterosis in crop plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 71–88. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042110-103827.
46. Stewart, J. M. (1992). A new cytoplasmic male sterile and restorer for cotton. Proceedings Beltwide Cotton Production Research Conference, National Cotton Council, Memphis TN, p. 610.
47. Tian, S. H., Xu, X., Zhu, X. F., Wang, F., Song, X. L., & Zhang, T. Z. (2019). Over-dominance is the major genetic basis of lint yield heterosis in interspecific hybrids between *G. hirsutum* and *G. barbadense*. *Heredity*, 123, 384–394. https://doi.org/10.1038/s41437-019-0211-5.

48. Turcotte, E. L., & Feaster, C. V. (1979). Linkage tests in American Pima cotton. *Crop Science*, 19, 119–120. https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900010030x.
49. Wang, X. D. (2000). Analyses of mitochondrial protein and DNA from cytoplasmic male sterile cotton. *Acta Agronomica Sinica*, 26, 35–39.
50. Wang, X. D., Zhang, T. Z., & Pan, J. J. (1997). Cytoplasmic effects of cytoplasmic male sterile Upland cotton. *Acta Agronomica Sinica*, 23, 393–399.
51. Wang, X. D., Zhang, T. Z., & Pan, J. J. (1998). Cytological observation of microsporogenesis and RAPD analysis of mitochondrial DNAs for cytoplasmic male sterile cotton lines. *Scientia Agricultura Sinica*, 31, 70–75.
52. Wang, X. D., Zhu, Y. G., Zhao, P. O., & Ni, X. Y. (2003). Relationship between glutathione S-transferase activity of restorer anthers and pollen fertility of F1 hybrid in Upland cotton. *Acta Agronomica Sinica*, 29, 693–696.
53. Wang, B. H., Wu, Y. T., Guo, W. Z., Zhu, X. F., Huang, N. T., & Zhang, T. Z. (2007a). QTL analysis and epistasis effects dissection of fiber qualities in an elite cotton hybrid grown in second generation. *Crop Science*, 47, 1384–1392. https://doi.org/10.2135/cropsci2006.10.0647.
54. Wang, F., Stewart, J. M., & Zhang, J. (2007b). Molecular markers linked to the Rf2 fertility restorer gene in cotton. *Genome*, 50, 818–824. doi: 10.1139/g07-061.
55. Wang, F., Feng, C., O'Connell, M. A., Stewart, J. M., & Zhang, J. F. (2009a). RFLP analysis of mitochondrial DNA in two cytoplasmic male sterility systems (CMS-D2 and CMS-D8) of cotton. *Euphytica*, 172, 93–99. https://doi.org/10.1007/s10681-009-0055-9.
56. Wang, F., Yue, B., Hu, J., Stewart. J. M., & Zhang, J. F. (2009b). A target region amplified polymorphism marker for fertility restorer gene Rf1 and chromosomal localization of Rf1 and Rf2 in cotton. *Crop Science*, 49, 1602–1608. https://doi.org/10.2135/cropsci2008.09.0531.
57. Wei, M., Song, M., Fan, S., & Yu, S. (2013). Transcriptomic analysis of differentially expressed genes during anther development in genetic male sterile and wild type cotton by digital gene expression profiling. *BMC Genomics*, 14, 97. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-97.
58. Wu, Y. T., Yin, J. M., Guo, W. Z., Zhu, X. F., & Zhang, T. Z. (2004). Heterosis performance of yield and fiber quality in F1 and F2 hybrids in Upland cotton. *Plant Breeding*, 123(3), 285–289. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2004.00990.x.
59. Wu, J., Cao, X., Guo, L., Qi, T., Wang, H., Tang, H., Zhang, J., & Xing, C. (2014). Development of a candidate gene marker for Rf1 based on a PPR gene in cytoplasmic male sterile CMS-D2 Upland cotton. *Molecular Breeding*, 34, 231–240. https://doi.org/10.1007/s11032-014-0032-4.
60. Wu, Y., Min, L., Wu, Z., Yang, L., Zhu, L., Yang, X., Yuan, D., Guo, X., & Zhang, X. L. (2015). Defective pollen wall contributes to male sterility in the male sterile line 1355A of cotton. *Scientific Reports*, 5, 9608. https://doi.org/10.1038/srep09608.
61. Wu, J., Zhang, M., Zhang, X., Guo, L., Qi, T., Wang, H., Tang, H., Zhang, J., & Xing, C. (2017). Development of InDel markers for the restorer gene Rf1 and assessment of their utility for marker-assisted selection in cotton. *Euphytica*, 213(11), 1–8. https://doi.org/10.1007/s10681-017-2043-9.
62. Wu, Y., Li, X., Li, Y., Ma, H., Chi, H., Ma, Y., Yang, J., Xie, S., Zhang, R., Liu, L., Su, X., Lv, R., Khan, A. H., Kong, J., Guo, X., Lindsey, K., Min, L., & Zhang, X. L. (2022). Degradation of de-esterified pctin/homogalacturonan by the polygalacturonase GhNSP is necessary for pollen exine formation and male fertility in cotton. *Plant Biotechnology Journal*, 20, 1054–1068. doi: 10.1111/pbi.13785.
63. Xing, C. Z., Jing, S. L., Guo, L. P., Yuan, Y. L., Liu, S. L., & Wang, H. L. (1999). Nuclear sterile ms5ms6 of Upland cotton resistant to cotton bollworm-Zhongkang A. *China Cottons*, 26(6), 27.
64. Xing, C. Z., Guo, L. P., Miao, C. D., Wang, H. L., & Lou, B. Q. (2005). Study on effects of producing cotton hybrids by bees pollination. *Cotton Science*, 17, 207–210.

65. Xing, C. Z., Guo, L. P., Li, W., Wu, J. Y., Yang, D. G., Qi, T. T., Ma, X. F., & Zhang, X. X. (2017). Ten-year achievements and future development of cotton heterosis utilization. *Cotton Science*, 29, 28–36.
66. Xuan, L. S., Qi, G. A., Li, X., Yan, S., Cao, Y., Huang, C., He, L., Zhang, T. Z., Shang, H., & Hu, Y. (2022). Comparison of mitochondrial genomes between a cytoplasmic male-sterile line and its restorer line for identifying candidate CMS genes in *Gossypium hirsutum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9198. doi: 10.3390/ijms23169198.
67. Yamagishi, H., Tanaka, Y., Shiiba, S., Hashimoto, A., Fukunaga, A., & Terachi, T. (2019). Mitochondrial orf463 causing male sterility in radish is possessed by cultivars belonging to the 'Niger' group. *Euphytica*, 215(6), 1–8. https://doi.org/10.1007/s10681-019-2437-y.
68. Yang, L. M., Zhu, H. Y., Guo, W. Z., & Zhang, T. Z. (2010). Molecular cloning and characterization of five genes encoding pentatricopeptide repeat proteins from Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Biology Reports*, 37, 801–808. doi: 10.1007/s11033-009-9610-7.
69. Yang, H., Xue, Y., Li, B., Lin, Y., Li, H., Guo, Z., Li, W., Fu, Z., Ding, D., & Tang, J. (2022). The chimeric gene atp6c confers cytoplasmic male sterility in maize by impairing the assembly of the mitochondrial ATP synthase complex. *Molecular Plant*, 15, 872–886. doi: 10.1016/j.molp.2022.03.002.
70. Yin, J. M., Guo, W. Z., Yang, L. M., Liu, L. W., & Zhang, T. Z. (2006). Physical mapping of the *Rf1* fertility-restoring gene to a 100 kb region in cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1318–1325. doi: 10.1007/s00122-006-0234-1.
71. You, J., Li, M., Li, H., Bai, Y., Zhu, X., Kong, X., Chen, X., & Zhou, R. (2022). Integrated methylome and transcriptome analysis widen the knowledge of cytoplasmic male sterility in cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Frontiers in Plant Science*, 13, 770098. doi: 10.3389/fpls.2022.770098.
72. Zaidi, S. S., Naqvi, R. Z., Asif, M., Strickler, S., Shakir, S., Shafiq, M., Khan, A. M., Amin, I., Mishra, B., Mukhtar, M. S., Scheffler, B. E., Scheffler, J. A., Mueller, L. A., & Mansoor, S. (2020). Molecular insight into cotton leaf curl geminivirus disease resistance in cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Biotechnology Journal*, 18, 691–706. doi: 10.1111/pbi.13236.
73. Zhang, T. Z. (1995). A discussion on the inheritance of Dong-A male sterility and its fertility-maintaining line(Mb) in Upland cotton. *Hereditas (Beijing)*, 17(6), 30–33.
74. Zhang, T. Z., & Jing, S. L. (1997). Theory and Practice of Hybrid Cotton Development Via Male Sterile Lines in Cotton. China Agricultural Press, Beijing.
75. Zhang, T. Z., & Pan, J. J. (1990). A genetic male sterile line with virescent marker character in Upland cotton. *Euphytica*, 48, 233–237.
76. Zhang, J. F. & Stewart, J. M. (2001). Inheritance and genetic relationships of the D8 and D2–2 restorer genes for cotton cytoplasmic male sterility. *Crop Science*, 41, 289–294. https://doi.org/10.2135/cropsci2001.412289x.
77. Zhang, J., & Stewart, J. M. (2004). Identification of molecular markers linked to the fertility restorer genes for CMS-D8 in cotton. *Crop Science*, 44, 1209–1217. https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1209
78. Zhang, T. Z., & Zhu, X. F. (2004). Breeding and cultivation technology of Nannong6 (NAU6). *China Cottons*, 31(8), 18–19.
79. Zhang, T. Z., & Zhu, X. F. (2005). Breeding and cultivation technology of Nannong9 (NAU9). *China Cottons* 32(8), 19.
80. Zhang, T., Xuan, L., Mao, Y., & Hu, Y. (2023). Heterosis and hybrid cultivar development. *Theoretical and Applied Genetics*, 136, 89. https://doi.org/10.1007/s00122-023-04334-w.
81. Zhang, B., Zhang, X., Guo, L., Qi, T., Wang, H., Tang, H., Qiao, X., Shahzad, K., Xing, C., & Wu, J. (2018). Genome-wide analysis of Rf-PPR-like (RFL) genes and a new InDel marker development for Rf1 gene in cytoplasmic male sterile CMS-D2 Upland cotton. *Journal of Cotton Research*, 1(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s42397-018-0013-y.

82. Zhang, M., Liu, J., Ma, Q., Qin, Y., Wang, H., Chen, P., Ma, L., Fu, X., Zhu, L., Wei, H., & Yu, S. (2020). Deficiencies in the formation and regulation of anther cuticle and tryphine contribute to male sterility in cotton PGMS line. *BMC Genomics*, 21, 825. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07250-1.
83. Zhang, Y., Han, Y., Zhang, M., Zhang, X., Guo, L., Qi, T., Li, Y., Feng, J., Wang, H., Tang, H., Qiao, X., Chen, L., Song, X., Xing. C., & Wu, J. (2022). The cotton mitochondrial chimeric gene orf610a causes male sterility by disturbing the dynamic balance of ATP synthesis and ROS burst. *The Crop Journal*, 10, 1683–1694. https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.02.008.
84. Zhang, T. Z., & Pan, J. J. (1999). Hybrid seed production in cotton. *In:* Basra R.S. (Ed.) Hybrid Seed Production in Crops. Food Production Press, New York, USA. pp. 149–184.
85. Zhou, H., Liu, Q., Li, J., Jiang, D., Zhou, L., Wu, P., Lu, S., Li, F., Zhu, L., Liu, Z., Chen, L., Liu, Y-G., & Zhuang, C. (2012). Photoperiod- and thermosensitive genic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA. *Cell Research*, 22, 649–660. https://doi.org/10.1038/cr.2012.28.
86. Zhu, X. F., Wang, X. D., Sun, J., Zhang, T. Z., & Pan, J. J. (1998). Assessment of cytoplasmic effects of cytoplasmic male-sterile lines in upland cotton. *Plant Breeding*, 117, 549–552. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1998.tb02205.x
87. Zhu, S. J., Tong, X. H., Hong, C. X., Ji, D. F., Wu, W., & Wang, R. H. (2006). A new combination of three-line hybrid cotton “Zheza 2.” *China Cottons*, 5, 12–13.
88. Zhu, C. S., Wu, J. T., Zhou, D. G., Li, Y., Peng, F. J., Gong, Y. C., & Zhou, S. X. (2013). Breeding and utilization of cotton cytoplasmic sterile line “Xiangyuan A.” China Cotton Association, Beijing, pp. 192–194.