

ارزیابی لاین‌های موتانت برنج از نظر صفات مورفولوژیک و نشانگرهای همبسته با ژن برگرداننده باروری

حمیده مهدیخانی^۱، قربانعلی نعمت‌زاده^{۲*}، نادعلی باقری^۳، عمار افخمی‌قادی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گرایش ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پست الکترونیکی: Mahdi.yasna16.4.1993@gmail.com
۲. استاد گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پست الکترونیکی: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir
۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پست الکترونیکی: n.bagheri@sanru.ac.ir
۴. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ده)، پست الکترونیکی: a.afkhani@sanru.ac.ir

چکیده

از مهمترین کارکردهای انرژی هسته‌ای در کشاورزی، ایجاد تنوع در ارقام گیاهی است. پژوهش حاضر با بررسی ۱۳ لاین موتانت برنج به همراه ۴ لاین برگرداننده باروری و دو لاین نگهدارنده عقیمی با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. صفات زراعی نظیر تعداد روز تا رسیدگی، ارتفاع بوته، طول خوشه، تعداد دانه پر و کل در خوشه، درصد باروری خوشه و عملکرد شلتوک بررسی شد. از سه نشانگر SSR شامل RM171، RM490 و RM3148 برای شناسایی دو ژن اصلی برگرداننده باروری Rf3 و Rf4 استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس حاکی از اختلاف بسیار معنی‌داری در همه صفات بود که بیانگر تنوع فراوان بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. نتایج مقایسات میانگین نشان داد که به طور متوسط طول خوشه لاین‌های موتانت بیشتر از لاین‌های خارجی بوده است. بیشترین میزان عملکرد ژنوتیپ‌ها (بالای ۷۰۰ گرم در متر مربع) مربوط به ندا، IR 86403-5-5-2-1-1-1-1-1R و چهار لاین موتانت P15-6، P12-5-3-3-2-2-1، P12-5-3-3-2-1-1 و P8-7-2-1-4-2-1-1 بوده که به دلیل داشتن باروری خوشه بالا بوده است. در مجموع الگوی باندی سه نشانگر نشان داد ژنوتیپ‌های IR 68078-15-2-1-2-2-R، IR 65622-151-1-2-2-2-R و NSIC RC 434 دارای ژن برگرداننده باروری بودند.

کلیدواژه‌ها: برنج هیبرید، تنوع ژنتیکی، صفات مورفولوژیک، ژن‌های برگرداننده باروری، موتاسیون

Evaluation of rice mutant lines via morphological traits and markers correlated with Rf gene

Abstract

create new diversity in plant cultivars is one of the most important functions of nuclear energy in agriculture. The present study was performed to investigate the genetic diversity of 13 rice mutant lines with 4 restorer and two sterility maintenance lines using morphological traits and SSR molecular markers. These genotypes were planted in a randomized complete block design with three replications and the studied agronomic traits such as number of days to maturity, plant height, panicle length, number of full and total seeds per panicle, panicle fertility percentage and paddy yield were studied. Three SSR markers including RM171, RM490 and RM3148 were used to identify the two main genes restorer *Rf3* and *Rf4*. The results of analysis of variance showed a significant difference of the studied genotypes of all studied traits, that indicates a great variety between the evaluated genotypes. On average, the length of the panicle of mutant lines was longer than the foreign lines. The highest yield of genotypes (above 700 g / m²) is related to Neda, IR 86403-5-5-2-1-1-1-1-1R and four mutant lines P15-6, P12-5-3-3- 2-2-1, P12-5-3-3-2-1-1 and P8-7-2-1-4-2-1-1, which was due to high panicle fertility. In total, the band pattern of the three markers showed that the genotypes IR 68078-15-2-1-2-2-R, IR 65622-151-1-2-2-2-R and NSIC RC 434 had fertility restorer genes.

Keywords: Hybrid rice, mutation and fertility restorer gene

۱. مقدمه

برنج یکی از سه محصول مهم غذایی جهان است و ۲۰ درصد از کالری مصرفی جهان را تأمین می‌کند [۱۴]. به همین جهت، برای بهبود راندمان عملکرد و بهره‌وری در تولید آن، تنوع ژنتیکی و انتخاب والدین برتر دارای اهمیت شایانی است [۱۳]. به نظر می‌رسد فناوری برنج هیبرید، کمک مهمی به تداوم امنیت غذایی در جهان کرده است [۱۵ و ۱۷]. برنج هیبرید در بیش از ۴۰ کشور جهان توسعه یافته است و یکی از اهداف این کشورها برای رسیدن به امنیت غذایی، افزایش عملکرد برنج از طریق تولید برنج هیبرید می‌باشد [۷]. مهمترین چالش برای اصلاحگران هیبرید بویژه در ایران، انتخاب ژنوتیپ‌های والدینی است که دارای ژن برگرداننده باروری بوده و نهایتاً منجر به هتروزیس شود [۱۲]. ارقام بومی و اصلاح‌شده کشور، از نظر ژن‌های برگرداننده باروری بسیار محدود بوده و تعدادی از ارقام نیز که دارای ژن برگرداننده باروری هستند از نظر خصوصیات زراعی همچون ارتفاع بوته و زمان گلدهی، مناسب برنامه‌های اصلاح هیبریدی نمی‌باشند [۲]. بنابراین ایجاد موتاسیون از طریق جهش‌زاهای فیزیکی همچون اشعه گاما می‌تواند نقش بسزایی در تنوع ارقام والدینی داشته باشد [۱۱]. تعداد زیادی از لاین‌های برنج نیمه پاکوتاه و زودرس از طریق تابش اشعه گاما تولید شده‌اند. لاین برگرداننده باروری T24 از طریق پرتوتابی با اشعه گاما با منبع کبالت ۶۰ با دز ۲۹۰ گری از رقم نرعییم II-32A اصلاح شد [۱۶]. فتح‌تبار و همکاران (۱۳۹۸) با استفاده از نشانگرهای SSR همچون RM171 و RM490 ژنوتیپ‌های برگرداننده باروری را از نگهدارنده عقیمی تفکیک نمودند. با شناسایی لاین‌های نگهدارنده نرعییمی و برگرداننده باروری از برخی ارقام بومی و اصلاح‌شده برنج گزارش گردید که رقم پرمحصول شیرودی دارای ژن مغلوب و ارقام خارجی IR50 و IR67924R دارای ژن غالب برگرداننده باروری است و می‌توان از آن برای تولید برنج هیبرید بهره برد [۲]. وجدان (۱۳۹۴) با بررسی ژن‌های برگرداننده باروری در تعدادی از لاین‌های امیدبخش موتانت برنج (نسل ششم) از طریق صفات کمی و دو نشانگر RM1 و RM228، تعداد ۷ لاین را بعنوان لاین برگرداننده بالقوه گزارش دادند [۹]. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های موتانت برنج با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای SSR همبسته با ژن برگرداننده باروری جهت استفاده در برنامه اصلاح برنج هیبرید بود.

۲. روش کار

در این پژوهش از ۱۹ ژنوتیپ والدینی برنج شامل ۱۳ لاین موتانت نسل دهم به همراه چهار ژنوتیپ برگرداننده باروری دریافت شده از مرکز بین‌المللی تحقیقات برنج ۱ و دو رقم نگهدارنده نرعییمی ندا و جلودار استفاده شده است (جدول ۱). لاین‌های موتانت، از طریق پرتودهی با دز ۲۰۰ گری اشعه گاما از منبع کبالت ۶۰ در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران ایجاد شده بودند و سپس در مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان وابسته به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بعد از ۱۰ نسل خودگشنی، ابتدا با روش بالک تک‌بذر و در ادامه با روش شجره‌ای بر اساس خصوصیات مطلوب مورفولوژیک و زراعی گزینش شده بودند. ژنوتیپ‌های ندا A و جلودار A طی کارهای تحقیقاتی با توجه به وضعیت سیتوپلاسمی و ژن‌های نگهدارنده، بعد از چندین تلاقی برگشتی با لاین‌های نرعییمی بین‌المللی دارای ژن‌های نرعییمی بوده و در این پژوهش از دو رقم نگهدارنده به عنوان ارقام والدینی به کار گرفته شده است [۸ و ۶]. عملیات بذریاشی ژنوتیپ‌های والدینی مورد مطالعه در فروردین ۱۳۹۹ در مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و نشاءکاری در خرداد به صورت تک بوته انجام شد. ژنوتیپ‌های مورد نظر در کرت‌هایی با ۵ ردیف با فاصله بوته ۲۰ سانتی‌متر روی ردیف‌ها و بین ردیف‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار کشت شد و کلیه عملیات زراعی از قبیل مبارزه با علف‌های هرز و آفات و بیماری‌ها، آبیاری طبق عرف منطقه صورت گرفت. در پایان فصل رشد، صفات کمی شامل تعداد روز تا ۵۰ درصد، تعداد روز تا رسیدگی، ارتفاع بوته، طول خوشه، تعداد دانه پر و عملکرد شلتوک ارزیابی شد. تجزیه واریانس و مقایسات میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد و تجزیه خوشه‌ای به روش Ward با ضریب متوسط فاصله اقلیدسی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS محاسبه شد. استخراج DNA با روش CTAP با کمی تغییر از نمونه‌های برگگی که در زمان حداکثر پنجه‌دهی از بوته‌ها برداشته شده بود انجام گردید. از سه نشانگر SSR همبسته با ژن RF شامل RM490، RM171 و RM3148 برای شناسایی ژن‌های برگرداننده باروری در برنج استفاده شد.

جدول ۱. ژنوتیپ‌های برنج مورد مطالعه به همراه شجره آن‌ها

کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	توضیحات	کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	توضیحات
۱	P10-88-37	موتانت نعمت	۱۱	P14-1	موتانت دشت
۲	P8-7-2-1-7-3-1-1	موتانت دمسیاه	۱۲	P15-6	موتانت پژوهش
۳	P8-7-2-1-4-2-1-1	موتانت دمسیاه	۱۳	P15-2	موتانت پژوهش
۴	P8-3-2-1-1-1-1	موتانت دمسیاه	۱۴	IR 68078-15-2-1-2-2-R	لاین برگرداننده باروری خارجی
۵	P9-7-6-3-1-3-1	موتانت فجر	۱۵	IR 65622-151-1-2-2-2-R	لاین برگرداننده باروری خارجی
۶	P9-8-1-1-1	موتانت فجر	۱۶	IR 86403-5-5-2-1-1-1-1-1R	لاین برگرداننده باروری خارجی
۷	P9-7-1-1-1-1	موتانت فجر	۱۷	NSIC RC 434	لاین برگرداننده باروری خارجی
۸	P11-6-2-1-1-1-1	موتانت سپیدرود	۱۸	جلودار	طارم دیلمانی/سنگ طارم
۹	P12-5-3-3-2-2-1	موتانت آمل ۳	۱۹	ندا	حسن سرایی/سنگ طارم/آمل ۳
۱۰	P12-5-3-3-2-1-1	موتانت آمل ۳			

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

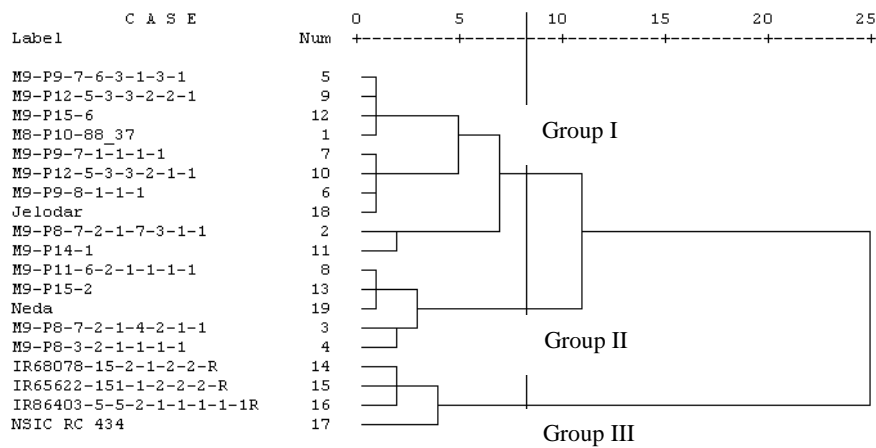
منابع تغییرات	DF	تعداد روز تا رسیدگی	ارتفاع بوته طول خوشه	تعداد دانه در خوشه	تعداد کل دانه در خوشه	درصد باروری	عملکرد شلتوک
ژنوتیپ	۱۸	۳۱۸/۶۷ ^{**}	۵۳۳/۶۰ ^{**}	۱۷/۰۲ ^{**}	۹۰۲/۵۵ [*]	۳۷۴۳/۶۳ ^{**}	۷۸۷۶۹/۶۳ ^{**}
تکرار	۲	۰/۲۸ ^{n.s}	۶/۹۶ ^{n.s}	۰/۴۳ ^{n.s}	۱۷۳/۰۱ ^{n.s}	۳۵۹/۱۰ ^{n.s}	۳۲۰۳۱/۵۳ ^{n.s}
خطا	۳۶	۱/۲۰	۳/۶۱	۲/۲۰	۳۷۷/۱۴	۴۳۵/۰۰	۱۳۳۷۶/۰۱
CV	-	۰/۸۳	۱/۵۸	۵/۲۸	۶	۱۲/۹۹	۲۰/۲۳

^{**} و ^{*} به ترتیب معنی‌دار در احتمال پنج و یک درصد

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

ژنوتیپ	تعداد روز تا رسیدگی	ارتفاع بوته	طول خوشه	تعداد دانه در خوشه	تعداد کل دانه در خوشه	درصد باروری	عملکرد شلتوک
1	۱۲۸/۰۰ ^{de}	۹۶/۶۷ ^k	۲۶/۳۵ ^{gj}	۱۳۳/۸۹ ^{abc}	۱۶۱/۴۵ ^{cde}	۸۳/۰۰ ^{ad}	۵۷۹/۷۵ ^{b-f}
2	۱۲۵/۶۷ ^{fgh}	۱۴۱/۱۷ ^a	۳۲/۵۸ ^a	۱۵۲/۰۰ ^a	۱۹۳/۰۰ ^{abc}	۷۸/۶۷ ^{cde}	۴۵۶/۱۳ ^{def}
3	۱۲۵/۰۰ ⁱ	۱۳۷/۰۰ ^b	۲۴/۲۹ ^j	۹۰/۲۲ ^d	۹۷/۵۶ ^g	۹۲/۶۷ ^a	۷۰۴/۷۷ ^{abc}
4	۱۲۶/۰۰ ^{efg}	۱۳۸/۳۳ ^{a b}	۲۶/۴۷ ^{gj}	۱۱۴/۶۷ ^{ad}	۱۴۱/۸۹ ^{def}	۸۱/۰۰ ^{bc}	۵۱۳/۷۹ ^{c-f}
5	۱۲۸/۰۰ ^{de}	۱۱۰/۶۷ ^{ghi}	۲۸/۳۸ ^{efg}	۱۲۴/۳۳ ^{ad}	۱۳۵/۱۱ ^{def}	۹۱/۶۷ ^a	۶۲۶/۲۵ ^{a-e}
6	۱۲۴/۰۰ ^h	۱۳۱/۳۳ ^c	۲۹/۸۸ ^{bf}	۱۰۷/۵۵ ^{bcd}	۱۳۷/۲۲ ^{def}	۷۸/۳۳ ^{c d e}	۴۰۷/۰۳ ^{fg}
7	۱۲۵/۰۰ ^{gh}	۱۲۶/۵۰ ^d	۲۹/۵۲ ^{cf}	۱۱۷/۵۶ ^{ad}	۱۵۲/۲۲ ^{def}	۷۷/۰۰ ^{de}	۶۹۷/۳۶ ^{abc}
8	۱۳۱/۶۷ ^c	۱۳۳/۵۰ ^c	۲۶/۴۹ ^{gi}	۱۰۵/۵۵ ^{cd}	۱۱۶/۸۹ ^{efg}	۹۰/۰۰ ^{ab}	۶۸۶/۵۷ ^{abc}
9	۱۲۹/۰۰ ^d	۱۱۲/۳۳ ^{fgh}	۲۸/۵۶ ^{dg}	۱۲۵/۱۱ ^{ad}	۱۴۲/۸۹ ^{def}	۸۷/۶۷ ^{abc}	۷۲۶/۰۰ ^{abc}
10	۱۲۸/۰۰ ^{de}	۱۲۰/۵۰ ^e	۳۱/۲۱ ^{bcd}	۱۴۱/۶۷ ^{abc}	۱۴۷/۱۱ ^{bcd}	۸۱/۳۳ ^{bcd}	۷۱۱/۵۴ ^{abc}
11	۱۲۷/۳۳ ^{def}	۱۱۵/۶۷ ^f	۳۱/۷۷ ^{ab}	۱۴۹/۵۶ ^a	۲۱۵/۷۸ ^a	۶۹/۳۳ ^{ef}	۲۲۴/۴۸ ^e
12	۱۱۸/۳۳ ^j	۱۰۸/۳۳ ⁱ	۲۷/۶۳ ^{fi}	۱۳۳/۵۵ ^{abc}	۱۵۶/۶۷ ^{cf}	۸۴/۶۷ ^{ad}	۷۹۷/۶۷ ^{ab}
13	۱۲۸/۰۰ ^{de}	۱۰۱/۵۰ ^j	۲۶/۳۵ ^{gj}	۱۰۷/۵۶ ^{bcd}	۱۲۲/۳۳ ^{efg}	۸۷/۶۷ ^{abc}	۶۸۷/۵۴ ^{abc}
14	۱۵۰/۰۰ ^a	۱۱۳/۱۷ ^{fg}	۲۵/۳۲ ^{hj}	۱۳۳/۵۶ ^{abc}	۲۰۲/۴۵ ^{ab}	۶۶/۰۰ ^f	۶۷۱/۶۵ ^{a-d}
15	۱۵۰/۰۰ ^a	۱۰۹/۶۷ ^{hi}	۳۰/۵۲ ^{bc}	۱۴۵/۷۸ ^{ab}	۲۲۰/۲۲ ^a	۶۵/۳۳ ^f	۵۹۳/۹۸ ^{a-f}

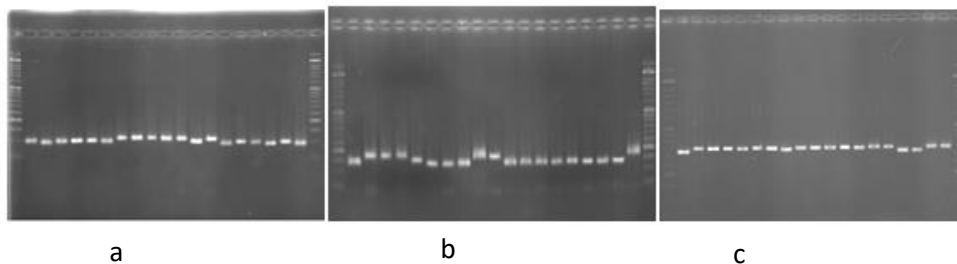
۸۱۳/۳۷ ^a	۵۴/۶۷ ^g	۲۱۸/۲۲ ^a	۱۲۰/۰۰ ^{ad}	۲۴/۸۷ ^{ij}	۱۱۴/۶۷ ^f	۱۵۰/۰۰ ^a	16
۳۹۲/۶۴ ^{alef}	۶۷/۳۳ ^f	۱۵۵/۲۳ ^{cf}	۱۰۳/۸۹ ^{cd}	۲۸/۰۸	۱۱۵/۱۷ ^f	۱۵۰/۰۰ ^a	17
۴۵۰/۵۲ ^{ef}	۸۷/۳۳ ^{a b c}	۱۶۱/۳۳ ^{cde}	۱۳۹/۷۸ ^{abc}	۲۸/۸۱ ^{dg}	۱۳۸/۳۳ ^{ab}	۱۳۱/۳۳ ^c	18
۸۱۷/۳۷ ^a	۷۸/۳۳ ^{cde}	۱۴۵/۳۳ ^{def}	۱۱۴/۴۵ ^{ad}	۲۶/۴۱ ^{gi}	۱۱۳/۱۷ ^{fg}	۱۳۵/۰۰ ^b	19
۶۰۸/۳۸	۷۹/۰۵	۱۶۰/۵۲	۱۲۴/۲۵	۲۸/۰۸	۱۱۹/۸۸	۱۳۱/۸۶	total



شکل ۱. دندوگرام مربوط به خوشه‌بندی لاین‌های والدینی برنج به روش WARD و ضریب فاصله اقلیدسی

جدول ۴. میانگین صفات هر گروه از تجزیه کلاستر

گروه‌ها	زمان رسیدگی	ارتفاع بوته	طول خوشه	میانگین دانه پر	تعداد کل دانه	درصد باروری خوشه	عملکرد متر مربع
1	۱۲۶/۴۷	۱۲۰/۱۵	۲۹/۴۷	۱۳۲/۵۰	۱۶۲/۹۸	۸۱/۹۰	۵۶۷/۷۴
2	۱۲۸/۲۰	۱۲۴/۷۰	۲۶/۰۰	۱۰۶/۴۹	۱۲۴/۸۰	۸۵/۹۳	۶۸۲/۰۱
3	۱۵۰/۰۰	۱۱۳/۱۷	۲۷/۲۰	۱۲۵/۸۱	۱۹۹/۰۳	۶۳/۳۳	۶۱۷/۹۱



شکل ۲. الگوی باندهای نشانگرهای شامل a: RM490، b: RM3148 و c: RM171 برای ارقام والدینی برنج (ژنوتیپ‌ها از چپ به راست ندا، جلودار، P14- P11-6، P9-8-1-1-1، P9-7-6-3-1-3-1، P9-7-1-1-1-1، P8-7-2-1-7-3-1-1، P8-7-2-1-4-2-1-1، P8-3-2-1-1-1-1، P10-88-37، P15-6، P15-2، 1-2-1-1-1-1، P12-5-3-3-2-2-1، IR 86403-5-5-2-1-1-1-1R، IR 65622-151-1-2-2-2-R، IR 68078-15-2-1-2-2-R، IR 86403-5-5-2-1-1-1-1R، NSIC (RC 434)

References

- [^۱] A. Afkhami Ghadi, N.A. Jelodar Babaeian, N. A. Bagheri, Evaluation of improved rice CMS lines according sterility, fertility and allogamy characteristics (*Oryza sativa* L.) 7(4) (2012). (In Persian)
- [^۲] A. Afkhami Ghadi, R. Khdemian, G.A. Nematzadeh, N.A. Jelodar Babaeian, N.A. Bagheri, Identification of male sterile maintainer and fertility restorer lines from Iranian landraces and improved cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Seed and Plant Improvement Journal*. 35(2): 121 (2019).
- [^۳] A.K. Singh, P. Revathi, M. Pavani, R.M. Sundaram, P. Senguttuvel, K.B. Kemparaju, A.S. Hari Prasad, C.N. Neeraja, N. Sravan Raju, P. Kotewara Rao, P.J. Suryendra, K. Jayaramulu, B.C. Viraktamath, Molecular screening for fertility restorer genes Rf3 and Rf4 of WA-CMS and evaluation of F1 hybrids in rice (*O. sativa* L.). *Journal of Rice Research*. 7 (1&2): 25(2014).
- [^۴] G. Kiani, Diversity assessment among some restorer lines using agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Biharean Biologist*. 6 (1):1-4(2012).
- [^۵] G.A. Nematzadeh ,A. Valizadeh, Hybrid rice breeding, Mazandaran University Press,208(1382) (In Persian)
- [^۶] G.A. Nematzadeh, A.A. Juhar, M. Sattari, A. Valizadeh, E. Alinejad, M.Z. Nouri, Relation between different allogamic associated trait characteristics of the five newly developed cytoplasmic male sterile (CMS) lines in rice. *Journal of Central European Agriculture*. 7 (1): 49 (2006).
- [^۷] H. Zhou, M. He, J. Li, L. Chen, Z. Huang, S. Zheng, L. Zhu, E. Ni, D. Jiang, B. Zhao, C. Zhuang, Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Scientific reports*. 6(1): 112(2016).
- [^۸] N. Babaeian Jelodar, N. Bagheri, E. Nattaj, Development of new Iranian male sterile and restorer lines for developing three-line rice hybrid and quality of hybrid rice. 5th International Rice Genetics Symposium and 3rd International Rice Functional Genetics Symposium, 19-23 November. Manila, Philippines. 67 pp(2005).
- [^۹] R. vejdan, N.Ghorbanali, G. Kiani, study of fertility restorer genes in matuant promising lines through quantitative and molecular traits(SSR)(2016) (In Persian)
- [^{۱۰}] S. H. Hashemi, S. A. M. Mirmohammadi-Maibody, G. A. Nematzadeh, A. Arzani, Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 8(10) (2009).
- [^{۱۱}] S. Ibrahim, El-Degwy, Mutation in induced genetic variability in rice. *International journal of agriculture and crop sciences*. 5(23): 2789-2794(2013).
- [^{۱۲}] S.S. Virmani, G. S. Khush, P.L., Pingali, L. Yuan, Hybrid rice for tropics: Potentials, research.
- [^{۱۳}] Shi. J. Zhijuan, Y.Zeng, Q. Qian, Ch.Yang, Application of a simplified marker-assisted backcross technique for hybrid breeding in rice. *Biologia* 69(4): 463 (2014).
- [^{۱۴}] U. Ngangkham, S. Dash, M. Parida, S. Samantaray, D. Nongthombam, M.K. Yadav, A. Kumar, L.G. Katara B.C. Patra, P. Chidambaranatham, L.K. Bose, The potentiality of rice microsatellite markers in assessment of cross-species transferability and genetic diversity of rice and its wild relatives. 9(6): 217 (2019).
- [^{۱۵}] W.A. N. G. Yingheng , C.A.I. Qiu Hua, X.I.E. Hongguang, W.U. Fangxi, L.I.A.N. Ling, H.E. Wei, Ch. Liping, X. Huan, Z.H.A.N.G. Janus, Determination of heterotic groups and heterosis analysis of yield performance in indica rice. *Rice Science*. 25(5): 261 (2018).
- [^{۱۶}] Y. Shen, Q. Cai, M. Gao, X. Wang, Isolation and genetic characterization of a fertility-restoring revertant induced from cytoplasmic male-sterile rice. *Euphytica*. 90:17 (1996).
- [^{۱۷}] L. Yuan, Development of hybrid rice to ensure food security. *Rice Science*. 21(1): 1 (2014).