

خصوصیات آلوگامی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی برنج و استفاده از نشانگرهای STS برای شناسایی آن‌ها

Allogamic Characteristics of Rice Cytoplasmic Male Sterile Lines and Using STS Markers for Distinguishing Them

ربابه نبوی واسوکلایی^۱، نادعلی بابائیان جلودار^۲، نادعلی باقری^۳ و
اسماعیل حسن نتاج^۴

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲، ۳ و ۴- به ترتیب استاد، استادیار و کارشناس، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۳

چکیده

نبوی واسوکلایی، ر.، بابائیان جلودار، ن.، باقری، ن.، و حسن نتاج، ا. ۱۳۸۹. خصوصیات آلوگامی لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی برنج و استفاده از نشانگرهای STS برای شناسایی آن‌ها. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۶: ۵۰۰-۴۸۵.

به منظور تولید لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی در ارقام ندا، طارم، شصتک محمدی، نعمت، اوندآ، حسنی، حسنی ریشک قرمز، آمل-۳، دشت، خزر و سپیدرود در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری شش نسل تلاقی برگشتی انجام شد. برای شناسایی لاین‌های حاوی ژن‌های نرعقیم سیتوپلاسمی از دو نشانگر مولکولی STS به نام‌های BF-STs-401 و BF-STs-402 استفاده شد. نتایج نشان داد که لاین‌های نرعقیم تولید شده دارای دو نوار در حدود ۴۶۴ bp و ۳۳۵ bp بودند در حالی که لاین‌های نگهدارنده تنها نوازی با طول حدود ۳۳۵ bp را داشتند. نتایج بررسی آلوگامی نشان داد که در لاین‌های نرعقیم ارقام ایرانی سپیدرود، طارم، آمل-۳، دشت، گرده، حسنی ریشک قرمز و ندا گلچه‌ها نسبت به والدین خود با تاخیر بسته می‌شوند. لاین‌های نرعقیم حاصل از تلاقی رقم طارم با لاین‌های نرعقیم IR68280A و خزر A نسبت به سایر لاین‌های نرعقیم زودرس‌تر بودند. مدت زمان باز ماندن گلوم همبستگی مثبت معنی‌داری با طول میله پرچم (۰/۷۲۰) و طول کلاله (۰/۸۸۹) داشت. با توجه به بالا بودن دامنه زمانی بازماندن حداکثری دهانه گلچه‌ها، به نظر می‌رسد لاین‌های نرعقیم ایرانی ندا، طارم و سپیدرود برای تولید بذر هیبرید تجاری برنج در ایران مناسب‌تر باشند.

واژه‌های کلیدی: برنج، بذر هیبرید، لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی، خصوصیات آلوگامی، نشانگر مولکولی STS.

مقدمه

برنج غذای اصلی و منبع کربوهیدرات برای بیش از ۵۰ درصد (نصف) جمعیت جهان است. بیش از ۹۰ درصد برنج جهان در کشورهای آسیائی کشت و مصرف می‌شود که ۶۰ درصد جمعیت جهان را در برمی‌گیرند و پیش‌بینی می‌شود که جمعیت مصرف‌کننده برنج در این کشورها تا سال ۲۰۲۵ دو برابر شود (Yashitola et al., 2004).

اصلاح و معرفی ذرت هیبرید در اوائل ۱۹۳۰ یکی از مهم‌ترین دستاوردهای اصلاح نباتات بود. تولید ذرت هیبرید باعث شد که به‌نژادگران تشویق به بهره‌گیری از پدیده هتروزیس یا رشد عالی هیبرید در سایر گیاهان از جمله سورگوم، ارزن، پنبه، آفتابگردان، گوجه‌فرنگی، بادنجان، پیاز، چغندر قند، برنج و غیره شوند. توسعه تکنولوژی بذر هیبرید در دهه ۱۹۷۰ در کشور چین اهمیت استفاده از این تکنولوژی و نقش آن را در تظاهر پدیده هتروزیس در برنج و افزایش عملکرد از ۱۵ تا ۲۰ درصد نسبت به ارقام پر محصول اصلاح شده نشان داد (Ikehashi and Wan, 1998). تولید لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (WA) از برنج وحشی در چین، امکان بهره‌برداری از سیستم هیبرید سه لاینی [لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی (A لاین)، لاین‌های نگهدارنده (B لاین) و لاین‌های اعاده‌کننده باروری (R لاین)] را فراهم کرده است (Yashitola et al., 2004). اصلاح و تولید برنج هیبرید در چین باعث شد که مؤسسه

بین‌المللی تحقیقات برنج و سایر مراکز تحقیقاتی در اوایل دهه ۱۹۸۰، فعالیت خود را در زمینه اصلاح و استفاده از تکنولوژی تولید بذر هیبرید آغاز کنند (Virmani et al., 1982). در این ارتباط سابقه شروع فعالیت تحقیقاتی برنج هیبرید در ایران به سال ۱۳۶۹ برمی‌گردد. یکی از مشکلاتی که برای تولید بذر هیبرید وجود دارد، اختلاط مکانیکی لاین‌های نرعقیم با لاین‌های نگهدارنده آن‌ها است که می‌تواند طی مراحل مختلف جابجائی لاین‌های نرعقیم مثل برداشت و خرمن‌کوبی اتفاق افتد (Rajendran et al., 2007). تخمین زده شده است که هر یک درصد ناخالصی در بذر لاین مادری، باعث کاهش یکصد کیلوگرم در هکتار در عملکرد بذر هیبرید خواهد شد (Mao et al., 1998).

تشخیص دو لاین نرعقیم و نگهدارنده باروری قبل از زمان گلدهی غیر ممکن است زیرا این دو لاین از نظر ژنتیکی کاملاً مشابه هم هستند و تنها از نظر سیتوپلاسم تفاوت دارند. دسترسی به نشانگرهای DNA مناسب، غربالگری بذر لاین‌های نرعقیم را از نر بارور به میزان زیادی تسریع کرده است. اخیراً، تلاش شده است که از اختلاط بین لاین‌های نگهدارنده و نرعقیم برنج از نظر نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR مثل چند شکلی قطعات تکثیری تصادفی یا RAPD (Jene and Pandey, 1999)؛ یا (Sane et al., 1997)، تفاوت طول قطعات

تعیین درصد عقیمی لاین‌های نر عقیم از روش ویرمانی (Virmani, 1994) استفاده شد. گروه‌بندی عقیمی یا باروری دانه‌های گرده به صورت نر عقیم کامل (صفر درصد باروری)، عقیمی نسبی (۱ الی ۳۰ درصد باروری)، باروری نسبی (۳۰ الی ۶۰ درصد باروری) و باروری کامل (بیش از ۶۰ درصد باروری) انجام شد (Govindaraj and Virmani, 2000).

برای شناسایی و تفکیک لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی، نمونه‌های برگ‌ی در مرحله حداکثر پنجه‌دهی جمع‌آوری شد. استخراج DNA به روش CTAB و با تغییراتی انجام شد (Murray and Thompson, 1980). برای شناسایی لاین‌های CMS و تفکیک آن‌ها از لاین‌های نگهدارنده از دو جفت نشانگر STS به نام‌های BF-STs-401 و BF-STs-402 استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با یک میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰/۴ میلی‌مول دی‌اکسید نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، یک واحد DNA پلیمرز و ۰/۲۵ پیکومول از هر آغازگر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و ۳۴ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵/۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

تکثیری یا AFLP (Guanghua *et al.*, 2003) و نشانگرهای مبتنی بر نقاط نشانمند از ردیف STS (Yashitola *et al.*, 2004)؛ (Komari and Nittam, 2004) استفاده شود. افزون بر این، برای تولید برنج هیبرید، لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی مناسب از نظر سازگاری با محیط و برخوردار از ویژگی‌های مورد نظر مربوط به گل و صفات مهم وابسته به دگرگشتی مورد نیاز است، به همین دلیل بررسی خصوصیات آلوگامی گلچه‌های برنج نیز حائز اهمیت است.

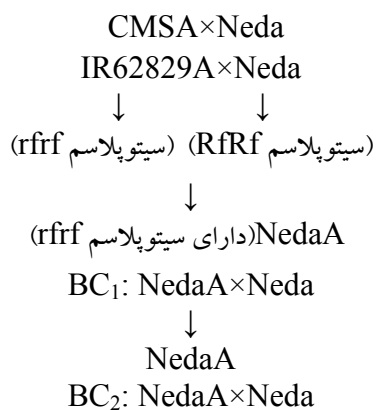
هدف این پژوهش تشخیص گیاهان نر عقیم و نگهدارنده در برنج با استفاده از نشانگرهای STS و بررسی صفات مختلف آلوگامی لاین‌های نر عقیم، جهت تولید برنج هیبرید برای ارقام ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی مورد استفاده شامل نه لاین نر عقیم سیتوپلاسمی (A لاین) و نگهدارنده آن‌ها (B لاین) از مرکز تحقیقات برنج فیلیپین و همچنین ۳۰ لاین نر عقیم ایرانی، اصلاح شده در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی بود (Babaeian Jelodar *et al.*, 2008)؛ (Babaeian Jelodar *et al.*, 2005). این لاین‌ها به فاصله ۲۵ × ۲۵ سانتی‌متری و به صورت تک بوته در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۸۶ نشا کاری شدند. برای مطالعه باروری دانه گرده برای

از غلاف، درصد خروج پرچم از گلچه‌ها، درصد باروری گلچه‌ها در مرحله گلدهی، تعداد روز تا ۵۰٪ خوشه‌دهی، ارتفاع بوته در مرحله خوشه‌دهی (متوسط ده بوته به سانتی‌متر)، طول کلاله (متوسط طول پنج کلاله به میلی‌متر)، رنگ کلاله (نمره ۱: سفید؛ ۲: سبز روشن؛ ۳: زرد؛ ۴: ارغوانی روشن؛ ۵: ارغوانی)، طول بساک (متوسط طول پنج بساک به میلی‌متر)، رنگ بساک (نمره ۱: سفید؛ ۲: زرد روشن؛ ۳: زرد)، زاویه بین لَمّا و پالئا بر حسب درجه، طول میله پرچم (متوسط طول پنج میله بساک به میلی‌متر) و طول مادگی در مرحله گلدهی و توسط دستگاه بینو کولر اندازه‌گیری شد (متوسط طول خامه و تخمدان پنج نمونه به میلی‌متر) بودند. همه اندازه‌گیری‌ها مطابق با سیستم ارزیابی استاندارد بین‌المللی توسعه یافته و در مرکز تحقیقات بین‌المللی برنج فیلیپین، انجام شد (Anonymous, 1996; Virmani., 1994). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد.

شمای اصلاحی (شش نسل تلاقی برگشتی) مربوط به لاین‌های نرعقیم به شرح زیر بود:



مدت ۷ دقیقه انجام شد. الگوی نواریابی ایجاد شده توسط نشانگرها برای تشخیص لاین‌های نرعقیم (لاین A) از نگهدارنده (لاین B) در برنج مورد استفاده قرار گرفت.

نشانگر BF-STs-401 با آغازگر همسو
 5'-TGCCACTATTCCACAATGCATG-3'
 و آغازگر معکوس
 3'-CCCTTTCCTGCTTCCCTTTTTTA-5'
 تولید باند ۴۶۴bp در لاین‌های نرعقیم می‌کند (Rajendran *et al.*, 2007). نشانگر BF-STs-402 با آغازگر همسو
 5'-TAGGGCCATGACGGTTTTG-3'
 و آغازگر معکوس
 3'-CGCGTCCTTCCCAATT-5'

طراحی شده از زیر واحد *atp9* میتوکندریایی برنج، تولید نوار حدود ۳۳۵ bp در همه لاین‌های نرعقیم و نگهدارنده می‌کند (Rajendran *et al.*, 2007). از نشانگر BF-STs-402 می‌توان به عنوان کنترل مثبت جهت جلوگیری از خطا در تجزیه PCR استفاده کرد. ترکیب نشانگرهای BF-STs-401 و BF-STs-402، نوار ۴۶۴bp را در لاین‌های نرعقیم و نوار تک شکلی ۳۳۵bp را در هر دو لاین نرعقیم و نگهدارنده تولید می‌کند.

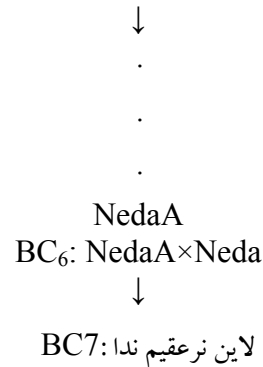
صفات آلوگامی مورد بررسی شامل تعداد روز تا به خوشه رفتن، زمان باز شدن گلچه‌ها، دامنه زمانی باز ماندن حداکثری گلچه‌ها، ۵۰٪ گلدهی گلچه‌ها، زمان بسته شدن گلچه‌ها، زمان باز شدن حداکثری گلچه‌ها، میزان خروج خوشه

نعمت/IR68899A، نعمت/IR68888A،
 نعمت/ طارم، نعمت/ خزر ۱A، ندا/IR58025A،
 ندا/IR68899A، ندا/ خزر ۱A،
 آمل-۳/IR68888A، اوند/IR68899A،
 گرده/ خزر ۱A، شصتک محمدی/ خزر ۲A،
 حسنی ریشک قرمز/ خزر ۲A،
 سپیدرود/IR62829A و سپیدرود/IR68897A
 نشان دهنده نوار هایی با اندازه حدود ۴۶۴ bp و

۳۳۵ bp بود که همانند الگوی نر عقیم مادری بود. این امر نشان‌دهنده صحت انتقال نر عقیمی از لاین‌های خارجی به ارقام نر عقیم ایرانی بود، در حالی که ارقام ایرانی که به عنوان والد پدری در تلاقی مورد استفاده قرار گرفتند نواری مشابه لاین‌های نگهدارنده خود با اندازه حدود ۳۳۵ bp را نشان دادند که با لاین‌های نر عقیم حاصل، تفاوت بارزی داشت.

پس از شناسایی لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی و اطمینان از انتقال ژن نر عقیمی سیتوپلاسمی از لاین‌های خارجی به ارقام ایرانی، به بررسی خصوصیات آلوگامی لاین‌های نر عقیم برنج ایرانی جهت تولید برنج هیبرید پرداخته شد.

نتایج بررسی خصوصیات آلوگامی در جدول ۲ نشان داده شده است. ارقام سپیدرود، طارم، ندا، گرده، اوند، شصتک محمدی، نعمت، خزر، آمل-۳، دشت و حسنی ریشک قرمز به ترتیب به طور متوسط بعد از ۹۱/۵، ۷۸/۶، ۱۰۴، ۸۳/۳، ۷۸/۶، ۹۷/۳، ۹۸، ۶۷/۵، ۹۸/۶، ۹۶/۶ روز به خوشه رفتند، در



نتایج و بحث

لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسم برنج مورد استفاده در این بررسی در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

ترکیب دو نشانگر STS، BF-STS-401 و BF-STS-402 سبب تولید دو نوار در لاین‌های نر عقیم و یک نوار در لاین‌های نگهدارنده کرد. از نشانگرهای STS مورد استفاده در این مقاله می‌توان به طور موثری در تشخیص لاین‌های نر عقیم از نگهدارنده و یا سایر ژنوتیپ‌های خود بارور بهره برد (Rajendran *et al.*, 2007). همچنین با ترکیب دو نشانگر STS فوق با نشانگر مولکولی برگرفته از ژنوم هسته‌ای می‌توان برای آزمون خلوص ژنتیکی لاین‌های نر عقیم یا بذر هیبرید استفاده کرد (Nandakumar *et al.*, 2004).

الگوی نواری حاصل از دو نشانگر STS در لاین‌های نر عقیم ایرانی مثل: ندا/ IR58025A، سپیدرود/ IR58025A، ندا/ خزر ۱A، آمل-۳/ خزر ۱A، سپیدرود/ خزر ۱A، گرده/ خزر ۱A، نعمت/ خزر ۱A، نعمت/IR62829A، نعمت/ IR68897A

جدول ۱- لاین های نر عقیم سیتوپلاسمی برنج ایرانی و خارجی مورد استفاده در آزمایش
 Table 1. Iranian and foreign cytoplasmic male sterile rice lines used in the experiment

لاین های نر عقیم خارجی Foreign male sterile lines	لاین های نر عقیم ایرانی Iranian male sterile lines					
IR68897A	(IR68897A×Gerdeh)	A گرده	(IR68897A×Sepidrod)	A سپیدرود	(IR62829A)×Neda	A ندا
IR68888A	(IR68280A×Sangtarom)	A سنگ طارم	(IR58025A×Sepidrod)	A سپیدرود	(KhazarA1 × Neda)	A ندا
IR68280A	(KhazarA1×Sangtarom)	A سنگ طارم	(IR25A×Hassani R. G.)	A حسنی رشک قرمز	(IR68897A ×Neda)	A ندا
IR69224A	(KhazarA2×Sangtarom)	A سنگ طارم	(Khazar A2×Hassani R. G.)	A حسنی رشک قرمز	(IR68899A × Neda)	A ندا
IR58025A	(IR68899A×Dasht)	A دشت	(IR68899A×Nemat)	A نعمت	(IR58025A × Neda)	A ندا
IR62829A	(IR68888A×Dasht)	A دشت	(IR62829A×Nemat)	A نعمت	(IR68888A × Neda)	A ندا
IR67684A	(IR68888A×Amol 3)	A آمل ۳	(IR68888A×Nemat)	A نعمت	(IR68280A × Neda)	A ندا
IR68899A	(IR69224A×Amol 3)	A آمل ۳	(IR68897A×Nemat)	A نعمت	(IR62829A × Sepidrod)	A سپیدرود
IR68897A	(IR68899A×Onda)	A اوندا	(KhazarA1×Gerdeh)	A گرده	(IR68897A× Sepidrod)	A سپیدرود
	Khazar A1	A خزر A1	(KhazarA2×Gerdeh)	A گرده	(IR58025A× Sepidrod)	A سپیدرود
	(Khazar A2×Shastak Mohamadi)	A شصتک محمدی				

IR68897A، سپیدرود / IR58025A و
 سپیدرود / IR69229A به ترتیب در ساعات
 ۹:۱۰، ۹:۰۰ و ۸:۴۰ صبح و لاین‌های نر عقیم
 نندا / IR68888A، نندا / IR67684A،
 نندا / IR68899A، نندا / IR68280A،
 نندا / IR69624A، نندا / IR58025A و
 نندا / خزر ۱A به ترتیب در ساعات ۸:۴۵، ۸:۴۰
 ۸:۴۰، ۸:۵۰، ۸:۵۵، ۸:۵۵ و ۸:۵۵ صبح دیرتر از
 والد پدری خود (به ترتیب ۸:۳۰ و ۸:۴۰) باز
 شدند در حالی که گلچه‌های لاین‌های نر عقیم
 طارم / IR68280A و طارم / خزر ۱A در ساعت
 ۸:۳۵ و ۸:۳۰ صبح، زودتر از گلچه‌های پایه
 پدری شان (۹:۴۵ صبح) باز شدند. بهترین زمان
 گلدهی ارقام برنج *Indica* در مناطق گرمسیری،
 بین ۱۰ تا ۱۰:۳۰ صبح بدون در نظر گرفتن
 شکل گلچه است (Parmar *et al.*, 1979).
 محققین در مرکز تحقیقات بین‌المللی برنج
 فیلیپین (IRRI)، بهترین زمان گلدهی را برای
 لاین‌های نر عقیم ژاپونیکا بین ساعت ۱۰ تا ۱۱
 تعیین کرده بودند (Virmani., 1994)، اما در
 این بررسی همه A لاین‌هایی که از IR58025A
 منشا گرفته بودند، گلدهی آن‌ها بین ۹ تا ۱۰
 صبح تعیین شد. گلدهی اغلب ارقام برنج موجود
 در شمال شرق هند بین ساعت ۱۰ تا ۱۱ است
 (Parmar *et al.*, 1979).

نتایج این بررسی در جدول ۲ نشان داد که
 گلچه‌های لاین‌های نر عقیم ارقام نعمت، گرده،
 سپیدرود، طارم، آمل-۳، دشت، خزر ۱A،
 حسنی ریشک قرمز و ندا نسبت به ارقام پدری با

حالی که لاین‌های نر عقیم حاصل از تلاقی اکثر
 این ارقام با لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی منابع
 خارجی، به ترتیب با مدت زمان متوسط ۹۲/۳،
 ۸۹، ۱۰۸ (سه لاین نر عقیم ندا)، ۹۲، ۱۰۲/۳، ۶۸،
 ۹۷/۳، ۹۷/۳، ۱۰۱، ۱۰۰/۶ و ۹۰/۵ روز به خوشه
 رفتند و دیررس تر شدند. البته بعضی از
 لاین‌های نر عقیم که والد پدری آن‌ها ندا بود
 مثل (ندا / IR68888A)، (ندا / IR67684A) و
 (ندا / IR68899A) به ترتیب با مدت زمان
 ۹۶/۶، ۱۰۱/۳ و ۹۹ روز به خوشه رفتند و
 زودرس تر بودند. به نظر می‌رسد لاین‌های
 نر عقیم تحت تاثیر اثر متقابل ژن‌های هسته‌ای و
 سیتوپلاسم قرار دارند (جدول ۲).

صفت خروج خوشه از غلاف، در کلیه
 لاین‌های نر عقیم ایرانی حاصل از تلاقی با
 لاین‌های نر عقیم پدری کامل بود (جدول ۲). اما
 صفت میزان خروج پرچم از گلچه، به جز در
 لاین‌های نر عقیم شصتک محمدی، نعمت /
 IR62829A، گرده / خزر ۲A، گرده / خزر ۱A،
 گرده / IR68888A، آمل-۳ / IR69224A،
 آمل-۳ / IR68888A، نندا / IR67684A،
 نندا / IR68899A و حسنی ریشک قرمز /
 خزر ۲A، در سایر موارد صد درصد بود. صفات
 خروج کامل خوشه از غلاف و خروج پرچم‌ها
 از گلچه، به عنوان دو عامل مهمی که می‌توانند
 فضای مناسبی را برای دریافت گرده خارجی
 توسط کلاله از طریق افزایش دگرگشتی ایجاد
 نمایند، حائز اهمیت است.

گلچه‌های لاین‌های نر عقیم سپیدرود /

جدول ۲- صفات آلوگامی لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی برنج ایرانی همواره با لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی پدری آن‌ها

Table 2. Allogamic traits of Iranian CMS lines with their father cytoplasmic male steriles

Cultivares	GOT	GCT	DGO	AC	AL	FL	PIL	SL	SC
Sepidrod	8:20	12:15	62.5±10.10	2	2±0	6.7±1.25	2.15±0.01	1.10	1
IR68897A/ Sepidrod	9:10	12:20	65±10.6*	2	2.1±0.4	6.87±1.4	2.22±0.02	1.25	1
IR58025A/ Sepidrod	9:00	12:00	69.5±12.9**	1	2.2±0.1**	6.87±1.4	2.05±0.02	1.22	1
IR69229A/ Sepidrod	8:40	12:20	64.17±6.12	2	2.1±0.4*	6.67±0.61	2.14±0.04	1.19	1
Tarom	9:45	12:15	47.67±1.6	2	2.5±0.05	5.6±0.05	2.1±0.05	1.10	1
IR68280A/ Tarom	8:25	11:20	92.2±1.6**	2	2.4±0.05	2.02±0.03**	2.02±0.02	1.02	1
Khazar A1 / Tarom	8:20	12:00	22.22±1.6*	2	2.2±0.02	5.02±0.02**	2.02±0.02	1.02	1
Neda	8:40	11:25	50±2.8	1	2.1±0.05	10.5±0.02	2.56±0.06	1.4	1
IR68888A/ Neda	8:45	12:50	26.6±1.6**	1	2.1±0.05	7.1±0.05**	2.22±0.14	1.52	4
IR68280A/ Neda	8:50	11:40	100±2.89**	2	2.1±0.08	5.01±0.08**	2.16±0.02*	1.50	1
IR69624A/ Neda	8:55	12:15	21.67±1.6**	2	2.1±0.08	5.1±0.05**	2.1±0.05**	1.40	1
IR58025A/ Neda	8:50	12:40	21.6±1.6**	1	2.1±0.05	4.16±0.08**	2.16±0.08*	1.02	1
IR67684A/ Neda	8:45	11:25	41.6±9.2	2	2.1±0.05	4.76±0.28**	2.1±0.05*	1.12	4
IR68899A/ Neda	8:40	12:15	70±7.5**	2	2.2±0.01	5.76±0.28**	2.06±0.06**	1.06	4
Khazar A1 / Neda	8:55	12:20	48.2±5.24	1	2.2±0.01	5.95±0.04**	2.17±0.02*	1.22	1
Shastak Mohamadi	10:10	12:40	22.5±7.5	2	2.0±0.5	6.12±1.27	2.62±0.12	1.50	1
Khazar A2 / Shastak Mohamadi	8:25	11:20	27.5±7.5**	1	2.0±0.4	6.1±1.4	2.7±0.01	1.55	1
Nemat	8:40	11:20	46.67±1.67	2	2.1±0.05	7.02±0.02	2.16±0.03	1.12	1
IR62829A / Nemat	8:40	12:20	50.0±2.89	1	1.75±0.02*	5.06±0.02**	2.02±0.02	1.10	1
IR68888A / Nemat	9:00	12:00	21.67±1.67**	1	2.1±0.05**	5.1±0.05**	2.06±0.02	1.16	1
IR68899A/ Nemat	8:40	12:20	85.0±2.89**	1	2.12±0.06	4.1±0.05**	2.46±0.03*	1.46	1
Gerdeh	10:15	11:40	45.0±2.89	2	2.06±0.06	7.1±0.05	2.02±0.02	1.06	1
Khazar A2 / Gerdeh	9:10	12:00	26.67±1.67**	1	2.06±0.06	5.1±0.05**	2.02±0.02	1.00	1
Khazar A1 / Gerdeh	9:05	12:15	55.0±2.89**	1	2.52±0.02**	5.06±0.02**	2.66±0.03*	1.10	1
IR68888A / Gerdeh	9:05	12:10	90.0±2.89**	2	2.1±0.05	4.1±0.05*	2.1±0.05	1.02	1
Amol ₂	8:40	11:10	50.0±2.89	1	2.1±0.05	8.1±0.05	2.16±0.02	1.02	1
IR69624A / Amol ₂	9:05	12:15	25.0±2.89**	2	2.5±0.05**	5.02±0.02**	2.02±0.03*	1.50	1
IR68888A / Amol ₂	9:00	12:40	21.67±1.67**	1	2.1±0.05	5.1±0.05**	2.22±0.03	1.22	1
Dasht	8:45	11:25	55.0±2.89	2	2.1±0.05	5.02±0.02	2.2±0.05	1.2	1
IR68888A / Dasht	8:45	12:45	16.67±1.67**	1	2.02±0.02	5.1±0.05	2.1±0.05	1.02	1
IR68899A / Dasht	8:40	12:50	46.67±1.67*	2	2.1±0.05	6.02±0.02**	4.1±0.05**	2.12	1
Khazar A1	8:55	12:40	60.0±2.89	1	2.1±0.02	5.1±0.05	2.12±0.02	1.46	1
Neda/ Khazar A1	9:00	11:50	21.67±1.67**	1	2.02±0.02	5.1±0.05	2.1±0.05	1.02	5
Onda	9:20	10:55	18.22±1.67	2	2.22±0.02	6.06±0.06	2.1±0.05	1.02	1
IR68899A / Onda	8:55	12:00	40.0±2.89**	1	2.1±0.05	5.05±0.02**	2.02±0.02	1.12	2
Hassani Rishak Ghermez	10:15	11:45	42.22±1.67	2	2.54±0.05	10.10±0.05	2.1±0.05	1.06	1
Hassani Rishak Ghermez	8:40	12:20	116.67±1.67**	2	1.52±0.02*	5.1±0.05**	2.1±0.05	1.22	1
IR58025A/									
Khazar A ₂ / Hassani Rishak Gh.	8:45	12:20	65.0±2.89**	1	2.1±0.02	6.1±0.05*	2.02±0.02	1.22	4
Table t 0.05 level			2.776		2.776	2.776	2.776	2.776	
Table t 0.01 level			4.604		4.604	4.604	4.604	4.604	

GOT: Glume Opening Time (AM); GCT: Glume Closing Time (AM); DGO: Duration of Glume Opening (minutes); AC: Anther Colour (1 to 2); AL: Anther Length (mm); FL: Filament Length (mm); PIL: Pistil Length (mm); SL: Stigma Length (mm); SC: Stigma Colour (1 to 4)

Table 2. Continued

ادامه جدول ۲

Cultivars	EP	ESS	F	ALP	DP	DFP	PL
Sepidrod	100	100	40±14.49	26.71±2.66	91.5±1.4	99.5±2.07	99.85±1.24
IR68897A/ Sepidrod	100	100	19±1.94**	29.5±2.6	92.25±1.4	100±2.87	101.2±1.2
IR58025A/ Sepidrod	100	100	30.75±2.5*	27.75±2.5	92±2.12	100±2.61	99.87±1.22
IR69229A/ Sepidrod	100	100	41.25±8.7	28±1.4	92.25±0.86	100±1.5	100.22±0.67
Tarom	100	100	92±1.52	22.22±1.33	78.67±0.22	90.22±0.22	140.22±1.8
IR68280A Tarom	100	100	22.22±1.67**	30±1	90.22±0.22**	101.67±0.22*	140.77±1.12
Khazar A1 Tarom	100	100	22.22±1.67**	30±1	88.22±0.22	97.87±1.87	129.5±0.87*
Neda	100	100	90±1.67	26±1	104±0.58	107.22±0.88	114±0.58
IR68888A/ Neda	100	100	0±0**	22.67±1.45*	96.67±0.22**	112.22±0.28*	97±0.58**
IR68280A/ Neda	100	100	0±0**	32±0.58**	112.67±0.22**	124±0.58**	95.27±0.41**
IR69624A/ Neda	100	100	0±0**	22.67±1.4*	102.22±0.22	111.6±0.28*	95±0.58**
IR58025A/ Neda	100	100	0±0**	31.67±1.45**	105.67±0.22	106.67±0.22	100±0.82**
IR67684A/ Neda	100	50	0±0**	22.67±1.45*	101.22±2.1*	110.67±0.88*	94.67±0.88**
IR68899A/ Neda	100	49	0±0**	28.32±2.67**	99±2.52**	112.67±0.22*	92.67±1.2**
Khazar A1 Neda	100	100	0±0**	26.15±0.86	102.5±1	111.62±1.1	96.9±1.6**
Shastac Mohamadi	100	100	60.5±2.5	26.5±1.5	67.5±1.5	80.0±2.0	122.6±2.0
Khazar A2 Shastac Mohamadi	100	49	0±0**	24.0±0.4*	68.0±1.0	81.0±2.0	122.5±2.5**
Nemat	100	100	92.22±1.67	27.22±0.67	98.0±0.0	105.0±0.58	116.22±0.33
IR62829A / Nemat	100	49	1.22±1.22**	30.22±0.67	97.22±0.22	104.67±0.22	96.0±0.29**
IR68888A / Nemat	100	100	20.0±2.89**	26.22±0.88	97.22±0.22	109.22±0.33*	107.92±0.22*
IR68899A/ nemat	100	100	1.22±1.22**	27.22±0.67	97.22±0.22	103.33±0.33	96.5±0.29**
Gerdeh	100	100	86.67±1.67	25.22±0.55	82.22±0.22	88.67±0.33	118.82±0.16
Khazar A2 / Gerdeh	100	49	1.22±1.22**	27.22±0.67	92.22±0.22**	98.22±0.33**	112.60±0.22**
Khazar A1 / Gerdeh	100	50	0.0±0.0**	24.22±0.88	92.22±0.22**	98.67±0.33**	121.26±0.27**
IR68888A / Gerdeh	100	30	0.0±0.0**	27.22±0.67	90.22±0.22**	97.22±0.33**	126.12±0.46**
Amol2	100	100	86.67±1.67	30.22±0.67	96.67±0.22	105.0±0.58	112.52±0.29
IR69624A /Amol ₂	100	49	0±0.0**	24.22±0.67**	102.22±0.22**	112.33±0.33**	102.42±0.29**
IR68888A /Amol ₂	100	60	0±0.0**	28.67±0.67	99.67±0.22**	112.33±0.33**	98.60±0.30
Dasht	100	100	90.67±1.67	27.22±0.67	98.67±0.22	104.33±0.33	127.42±0.29
IR68888A / Dasht	100	49	90.67±1.67**	30.22±0.67	101.67±0.22	110.33±0.33**	109.46±0.29**
IR68899A / Dasht	100	100	26.67±1.67**	30.67±0.22*	100.67±0.22	112.33±0.33**	104.0±0.57**
Khazar A1	100	100	90±0.0	30.67±0.22	97.22±0.22	124.33±0.33	128.0±0.57
Neda/ Khazar A1	100	100	0±0.0**	22.22±1.67	97.22±0.22	104.22±0.33**	93.50±0.28**
Onda	100	100	65.0±2.89	27.22±0.67	78.67±0.22	88.22±0.33	118.4±0.30
IR68899A / Onda	100	100	0±0.0**	25.22±0.67*	102.22±0.22**	110.22±0.33**	117.33±0.31
Hassani Rishak Ghermez	100	100	86.67±1.67	25.67±0.33	86.33±0.33	92.33±0.33	151.16±0.44
IR58025A/ Hassani Rishak Ghermez	100	100	1.33±1.33**	27.22±0.33	90.33±0.33	96.67±0.33**	111.20±0.41**
Khazar A2 / Hassani Rishak Ghermez	100	50	1.33±1.33**	27.22±0.67	90.67±0.33	96.33±0.33*	144.86±0.12**
Table t 0.05 level			2.776	2.776	2.776	2.776	2.776
Table t 0.01 level			4.604	4.604	4.604	4.604	4.604

EP: Projection Percentage Panicle from Sheath, ESS: Projection Percentage Flag from Floret, F: Fertility Percentage, ALP: Angle Between Lema and Palea (A), DP: Days to Earing Initiation, DFP: Days to 50% Earing, PL: Plant Height (cm)

کممک کلاله بیشتر می‌توانند گرده‌های آزاد محیط را دریافت کنند، بنابراین تیپ‌های ایده‌آل نرعقیم در این مطالعه شامل لاین‌های نرعقیم ندا IR68280A/، نندا IR68899A/ و طارم IR68280A/ بودند. خروج کامل خوشه از غلاف و خروج پرچم‌ها از گلچه، به عنوان دو عامل مهمی که می‌تواند فضای مناسبی را برای دریافت گرده خارجی توسط کلاله از طریق افزایش دگرگشتی ایجاد کند، حائز اهمیت است.

هرگاه رنگ بساک در مشاهده ظاهری زرد روشن باشد، در مقایسه با حالت‌های سفید و زرد پررنگ دارای دامنه زمانی بازماندن حداکثری دهانه گلچه بیشتری است. در لاین‌های نرعقیم سپیدرود، طارم A، ندا A، گرده IR68888A، حسنی ریشک قرمز IR58025A، یعنی لاین‌های نرعقیم حاصل از ارقام سپیدرود، طارم و ندا، میزان دامنه زمانی بازماندن حداکثری دهانه گلچه، بین ۶۰ تا ۱۰۰ دقیقه و در لاین‌های نرعقیم گرده IR68888A، حسنی ریشک قرمز IR58025A بین ۹۰ تا ۱۱۷ دقیقه بود (جدول ۲)، بنابراین می‌توان از رنگ بساک به عنوان عاملی برای شناسایی لاین‌های نرعقیمی که دارای دامنه زمانی بازماندن حداکثری دهانه گلچه بالاتری هستند، بهره برد.

طول بساک در ارقام سپیدرود، ندا، شصتک محمدی، نعمت، گرده، آمل-۳، دشت، ندا، حسنی ریشک قرمز و لاین‌های نرعقیم آن‌ها همگی مشابه و حدود ۲ میلی‌متر

تاخیر بسته می‌شوند. این امر به افزایش دگرگشتی در لاین‌های نرعقیم کمک می‌کند و یک پدیده مثبت در تولید برنج هیبرید تلقی می‌شود. دامنه زمانی بازماندن حداکثری دهانه گلچه در ارقام نعمت، گرده، حسنی ریشک قرمز به ترتیب ۴۷، ۴۵ و ۴۴ دقیقه بود، در حالی که در لاین‌های نرعقیم نعمت IR68888A، نعمت IR68899A و لاین‌های نرعقیم گرده IR68888A، گرده ۲A و گرده IR68888A به ترتیب ۲۲، ۸۵، ۵۵، ۲۷ و ۹۰ دقیقه بود (اختلافات معنی‌دار بین آن‌ها معنی‌دار بود). در لاین‌های نرعقیم حسنی ریشک قرمز مدت زمان بازماندن حداکثری دهانه بیشتر از پایه پدری آن‌ها بود، در حالی که مدت زمان بازماندن حداکثری دهانه گلچه‌های پایه پدری در ارقام آمل-۳، دشت و خزر نسبت به لاین‌های نرعقیم خود بیشتر بود که یک پدیده منفی در لاین‌های نرعقیم این سه رقم محسوب می‌شود (اختلافات بین آن‌ها معنی‌دار بود).

زاویه بین لَمّا و پالّتا می‌تواند مدت بازماندن گلوم را افزایش دهد (Narhari and Bora, 1963); Govindaraj and Virmani., 2000). رفتار لودیکول، میله پرچم، بساک، تخمدان و کلاله نیز به بازماندن گلوم کمک می‌کند (Parmar et al., 1979). گلچه‌ها با بساک‌های ضخیم، دارای زاویه بازتر در مقایسه با گلچه‌ها با بساک باریک هستند (Parmar et al., 1979). هر چه مدت زمان بازماندن گلوم طولانی‌تر شود لاین‌های نرعقیم به

(جدول ۳). ولی در رقم طارم و لاین نرعقیم طارم / IR68280A بلندتر، یعنی ۲/۵ میلی‌متر بود. طول میله پرچم در ارقام سپیدرود، طارم، شصتک محمدی و نعمت به ترتیب ۷، ۵/۵، ۶ و ۵ میلی‌متر بود، در حالی که در لاین‌های نرعقیم سیدرود / IR69229A، طارم / IR68280A و طارم / خزر ۱A، لاین‌های نرعقیم شصتک محمدی و نعمت طول میله پرچم به ترتیب ۱۰، ۵، ۵ و ۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. طول میله پرچم در ارقام آمل-۳، دشت، حسنی ریشک قرمز و گرده نسبت به لاین‌های نرعقیم آن‌ها

جدول ۳- ضریب همبستگی فنوتیپی صفات مختلف مربوط به گل در لاین‌های نرعقیم برنج
Table 3. Phenotypic correlation coefficient among different flower characteristics in male sterile lines of rice

صفات Traits	زاویه بین لهما و پالنا Angle between lema and palea	مدت زمان باز ماندن گلوم During of opening glum (min)	طول کلاله Stigma length (mm)	طول مادگی Pistil length (mm)	طول میله پرچم Filament length (mm)
طول بساک Anther length	-0.225	0.210	-0.422	-0.257	-0.336
طول میله پرچم Filament length	0.720**	0.165	0.349	0.622*	
طول مادگی Pistil length	0.889**	0.149	0.246		
طول کلاله Sstigma length	0.027	-0.429			
مدت زمان باز ماندن گلوم During of opening glume	0.305				

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

* and **: Significant at 5% and 1% levels of probability, respectively .

لاین‌های نرعقیم سینتوپلاسمی
ندا / IR68280A، ندا / IR67684A،
ندا / IR58025A، ندا / IR68899A،
ندا / IR68888A و ندا / خزر ۱A دارای عقیمی
کامل و دانه گرده لاین‌های نرعقیم
سیدرود / IR58025A و سیدرود / IR68897A
و لاین‌های نرعقیم طارم / IR68280A و
طارم / خزر ۱A دارای عقیمی نسبی بودند
(جدول ۲).

بیشتر بود. از آنجایی که زاویه بین لهما و پالنا
همبستگی مثبت و معنی‌داری با طول میله پرچم
دارد (Parmar *et al.*, 1979)، بنابراین انتظار
می‌رود که لاین‌های نرعقیم دارای طول میله
پرچم بلندتر از تشکیل بذر بالاتری برخوردار
باشند که این ویژگی برای تولید بذر هیبرید
یک صفت بسیار خوب محسوب می‌شود
(جدول ۲).
آزمون دانه گرده نشان داد که دانه‌های گرده

(Suh, 1988). دامنه دگرگشتی از ۱۴/۶ تا ۵۳/۱٪ در آزمایش‌های مختلف در چین گزارش شده است (Xu and Li, 1998). بهبود دگرگشتی طبیعی در لاین‌های نرعقیم برنج با ویژگی‌های مربوط به گرده گل در لاین‌های نرعقیم، والدین و عوامل محیطی در زمان گلدهی همبستگی بالایی دارد.

بعد از ورود ارقام هیبرید و لاین‌های والدینی از کشور چین به هند، بنگلادش، فیلیپین و سریلانکا به واسطه حساسیت این ارقام و لاین‌ها به آفات و بیماری‌ها در این کشورها، در ابتدای کار مشکلاتی را در راه تولید برنج هیبرید ایجاد کرد، بنابراین این کشورها لاین‌های نرعقیم IR58025A و IR62829A را از مرکز تحقیقات بین‌المللی IRRI واقع در کشور فیلیپین، وارد کرده و اقدام به تولید لاین‌های نرعقیم سازگار با منطقه مورد نظر کردند. اغلب هیبریدهای تولید شده در این کشورها بر پایه لاین‌های نرعقیم از لاین‌های IR58025A و IR62829A هستند. با توجه به این موضوع در این بررسی نیز اقدام به تولید لاین‌های نرعقیم سازگار با منطقه از طریق انتقال سیتوپلاسم نرعقیم از لاین‌های IR69229A، IR58025A، IR67684A، IR68280A، IR68897A، IR68899A، IR69624A و IR68888A به ارقام ایرانی طی شش نسل تلاقی شد، ولی برای تولید برنج هیبرید هنوز راه زیادی مانده است که باید پیموده شود (Babaeian Jelodar et al., 2008).

ارقام سپیدرود، طارم و ندا به ترتیب دارای طول مادگی ۳/۱، ۳/۱ و ۳/۵ میلی‌متر بودند در حالی که طول مادگی لاین‌های نرعقیم آن‌ها حدود ۳ میلی‌متر و لاین‌های نرعقیم دشت/IR68899A و گرده/خزر ۱A به ترتیب دارای طول مادگی ۴/۱ و ۲/۶۶ میلی‌متر بودند، سایر ارقام و لاین‌های نرعقیم موجود در این بررسی مادگی متوسط ۳/۱ میلی‌متری داشتند (جدول ۲). از آنجایی که زاویه بین لمانا و پالنا همبستگی مثبت و معنی‌داری با طول مادگی دارد، هر چه طول مادگی کاهش یابد انتظار کم شدن ظرفیت پذیرش گرده خارجی و کاهش تشکیل بذر می‌رود که این پدیده برای تولید برنج هیبرید مناسب نیست (جدول ۳).

رنگ کلاله در لاین‌های نرعقیم ندا/IR68888A، ندا/IR67684A و ندا/IR68899A ارغوانی روشن و در لاین‌های نرعقیم ندا/خزر ۱A، اوند/IR68899A و حسنی ریشک قرمز/خزر ۲A به ترتیب ارغوانی، زرد و ارغوانی روشن بود. سایر ژنوتیپ‌ها رنگ کلاله سفید داشتند. رنگ کلاله می‌تواند یکی از معیارهای شناسایی مورفولوژیک لاین‌های نرعقیم حاصل از تلاقی ندا/IR68888A، ندا/IR67684A و ندا/IR68899A باشد.

انتخاب بر اساس صفات وابسته به گل از جمله طول کلاله و نسبت خروج کلاله از گلچه، باعث افزایش دگرگشتی، در نتیجه سبب بهبود تولید بذر هیبرید می‌شود (Tillebois and Guimaraes, 1988).

ایرانی حاصله پس از شش نسل تلاقی برگشتی با والد تکراری یعنی همان ارقام ایرانی، حاصل شده‌اند در نتیجه همه خصوصیات پایه پدری را دریافت کردند، همچنین لاین‌های نر عقیم ایرانی، نر عقیمی را از والد مادری خود یعنی لاین‌های نر عقیم خارجی (با پایه سیتوپلاسمی مشابه WA) دریافت کردند. پس دلیل اختلاف خصوصیات آلوگامی در لاین‌های نر عقیم حاصل از تلاقی یک رقم ایرانی را فقط می‌توان به دلیل اثر متقابل ژن‌های هسته‌ای پایه پدری و ژن‌های میتوکندریایی پایه مادری دانست که سبب می‌شود یک پایه پدری با برخی از لاین‌های نر عقیم خارجی دگرگشتی بالاتری را نشان دهد. در نتیجه ژن‌های میتوکندریایی لاین‌های نر عقیم خارجی، علاوه بر نر عقیمی روی خصوصیات آلوگامی لاین‌های نر عقیم حاصله نیز موثر هستند.

لاین‌های نر عقیم تولید در این تحقیق، برای کارهای اصلاحی نظیر تولید برنج هیبرید که حداقل با ۲۰٪ افزایش محصول مواجه خواهد بود می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی استان مازندران به خاطر تامین هزینه این پروژه و همچنین از مسئولین دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری و دانشگاه مازندران به خاطر فراهم آوردن امکانات برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

(Babaeian Jelodar *et al.*, 2005).

در مراحل اولیه تکنولوژی برنج هیبرید در هند، تعداد هیبریدهای معرفی شده ناچیز بود زیرا لاین‌های نر عقیم با منطقه سازگار نبودند و در نتیجه هیبریدهای ناخالص تولید می‌شد. برای رفع این مشکل، چند لاین نر عقیم دیگر مثل DRR2A، APMS5A، PMS12A، CR32A و CRMS31A در هند برای اصلاح هیبریدهای جدید استفاده شد (Krishnaiah *et al.*, 2001). از بین لاین‌های نر عقیم موجود از دو لاین نر عقیم IR58025A و IR62829A در سطح وسیعی استفاده می‌شود. هر چند که این دو لاین مقاومت به برخی از آفات و بیماری‌های مهم را ندارند. لاین‌های نر عقیم مطلوب در مطالعه کنونی شامل نندا/ IR85025A، خزر ۱A/ نعمت/ IR68899A، گرده/ IR68888A، آمل-۳/ IR68888A، آمل-۳/ IR69224A، دشت/ IR68888A، اوندا/ IR68899A، خزر ۱A/ ندا و شصتک محمدی/ خزر ۲A بودند.

علت اختلاف خصوصیات آلوگامی لاین‌های نر عقیم حاصل از تلاقی یک رقم ایرانی با لاین‌های نر عقیم IR68888A، IR68280A، IR69624A، IR68899A، IR67684A، IR58025A، IR68897A و IR62829A را می‌توان این گونه توجیه کرد. از آنجایی که لاین‌های نر عقیم

References

- Anonymous. 1996.** Standard Evaluation System. International Rice Research Institute. Manila, Philippines.
- Babaeian Jelodar, N., Bagheri, N. A., and Hasannataj, E. 2005.** Development of new Iranian male sterile and restorer lines for developing three-line rice hybrids and quality of hybrid rice. International Rice Genetic Symposium. Manila, Philippines. page 103.
- Babaeian Jelodar, N., Bagheri, N. A., and Hassannataj, E. 2008.** Towards fully coupled crop-climate impacts assessments. 5th International Crop Science Congress and Exhibition. Jeju, Korea. page 67.
- Govindaraj, K., and Virmani, S. S. 2000.** Allelism Test for Restorer Genes of Promising IR Lines. IRRI, Manila, Philippines.
- Guanghua, H., Lei, H., Yuehua, X., Xiaoying, L., Guoqing, N., Guangwei, Y., and Yun, P. 2003.** A common sequence difference between cytoplasm male sterile lines and their maintaner lines existing in rice (*Oryza sativa* L.) chloroplast tRNA Leu gene region. Euphytica 131: 269-274.
- Ikehashi, H., and Wan, J. 1998.** The wide compatability system: current knowledge of it is genetic and use for enhanced yield hetrosis. pp. 67-77. In: Virmani, S. S., Siddiq, E. A., and Muralidharan, K. (eds.) Advanced in Hybrid Rice Technology. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Jene, K. K., and Pandey, S. K. 1999.** DNA markers for purification of A and B lines for hybrid rice improvement. Hybrid Rice Newsletter 2: 13-14.
- Komari, T., and Nittam, N. 2004.** A simple method to control the seed purity of *Japonica* hybrid rice varieties using PCR- based markers. Plant Breeding 123: 549-553.
- Krishnaiah, K., Virakthamath, B. C., Ilyas Ahmad, M., Vijay Kumar, C. H. M., and Ramesha, M. S. 2001.** Recent developments in hybrid rice research in India. pp. 171-191. In: Peng, S., and Hardy, B. (eds.) Rice Research for Food Security and Poverty Alleviation. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Mao, C. X., Virmani, S. S., and Kumar, I. 1998.** Technological innovation to lower the cost of hybrid seed production. pp. 111-128. In: Virmani, S. S., Siddiq, E. A.,

and Muralidharan, K. (eds.). *Advances in Hybrid Rice Technology*. International Rice Research Institute. Manila, Philippines.

Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuclei Acids Research* 8: 4321-4325.

Nadakumar, N., Singh, A. K., Sharma, R. K., Mohapatra, T., Prabhu, K. V., and Zaman, F. U. 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257-264.

Narhari, P., and Bora, K. C. 1963. Radiation induced spikelet abnormalities and mutations in rice. *Indian Journal of Genetics* 23:7-18.

Parmar, K. S., Siddiq, E. A., and Swaminatan, M. S. 1979. Variation in components of flowering behavior of Indica rice. *Indian Journal of Genetics* 39: 542-550.

Rajendran, N., Gandhimani, R., Singh, S., and Palchamy, K. 2007. Development of a DNA marker for distinguishing CMS lines from fertile lines in rice (*Oryza sativa* L.). Research and Training Center, Barwal Foundation, Hyderabad, Andhera Pradesh, India.

Sane, A. P., Seth, P., Ranade, S. A., Nath, P., and Sane, P. V. 1997. RAPD analysis of isolated mitochondrial DNA reveals heterogeneity in elite wild abortive (WA) cytoplasm in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1098-1103.

Suh, H. S. 1988. Multiple pistillate male sterile rice for hybrid seed production. pp. 181-187 In: *Proceedings of the International Symposium on Hybrid Rice*. 6-11 October 1986, Changsha, Hunaa, China.

Tillebois, J., and Guimaraes, E. P. 1988. Improving out crossing rate in rice (*Oryza sativa* L.). pp. 175-180. In: *Proceedings of the International Symposium on Hybrid Rice*. 6-11 October 1986, Changsha, Hunaa, China.

Virmani, S. S. 1994. *Heterosis and Hybrid Rice Breeding*, Monographs on Theoretical and Applied Genetics. 22, Springer- Verlag, Berlin.

Virmani, S. S., Aquino, R. C., and Khush, G. S. 1982. Heterosis breeding in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 63: 373-380.

Xu, S., and Li, B. 1998. Managing hybrid rice seed production. pp. 157-163. In: *Proceedings of the International Symposium on Hybrid Rice*. 6-11 October 1986, Changsha, Hunaa, China.

Yashitola, J., Sundaram, R. M., Biradar, S. K., Thirumurugan, T., Vishnupriya, M. R., Rajeshwari, R., Viraktamath, B. C., Sharma, N. P., and Sonti, R. V. 2004. A sequence specific PCR marker for distinguishing rice lines on the basis of wild abortive cytoplasm from their cognate maintaner lines. *Crop Science* 44: 920-924.