شناسائی ارقام برگرداننده و نگهدارنده باروری در برنج با استفاده از نشانگر SSR

غفار کیانی*

***نویسنده مسئول:** استادیار، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (ghkiani@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۹

چکیده

در اصلاح نباتات کلاسیک به‌نژادگران ارقام برگرداننده‌کننده باروری را از طریق تست کراس ارقام موجود با لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی (CMS) و ارزیابی نتاج F_1 از نظر باروری دانه گرده و خوشه مورد شناسائی قرار می‌دهند. لاین‌هایی که نتاج آن‌ها باروری خوشه و دانه گرده بیش از ۸۰ درصد را نشان دهند به‌عنوان لاین‌های برگرداننده در نظر گرفته می‌شوند. در این مطالعه ۱۵ رقم برنج در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت و از انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS) برای تشخیص دو ژن برگرداننده باروری بر روی کروموزم‌های ۱ و ۱۰ در برنج استفاده گردید. نتایج ارزیابی‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره RM171، RM258 و RM3148 همبسته با ژن‌های برگرداننده باروری نشان داد که ارقام برنج به نام‌های هاشمی و دیلمانی دارای هر دو ژن برگرداننده باروری در ژنوم خود هستند. در حالی‌که ارقام برنج به نام‌های شیرودی، تابش، فجر و شفق به‌عنوان ارقام نگهدارنده شناسائی شدند. از این ارقام می‌توان در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی برنج هیبرید در کشور استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: برنج، ارقام برگرداننده باروری، نگهدارنده، نشانگر SSR.

مقدمه

یکی از راه‌های افزایش عملکرد در واحد سطح تکنیک تولید برنج هیبرید است. هیبرید برنج نسبت به ارقام معمولی در شرایط مشابه به میزان ۳۰–۲۰ درصد افزایش عملکرد دارند (Yuan, 1998). نر عقیمی سیتوپلاسمی در تلفیق با سیستم برگرداننده باروری کاراترین ابزار ژنتیکی برای بهره‌برداری از هتروزیس در برنج می‌باشد (Lin and Yuan, 1980؛ Virmani and Wan, 1988). در برنج سه نوع سیتوپلاسم نر عقیم به نام‌های WA[1]، BT[2] و HL[3] شناسائی شده‌اند که از بین آن‌ها از سیتوپلاسم WA به‌طور گسترده ای در سطح جهان استفاده می‌شود (Sattari *et al.*, 2008).

نر عقیمی سیتوپلاسمی صفتی است با وراثت مادری که بر اثر اختلال یا بازآرایی ژنوم میتوکندریایی و در نتیجه ناتوانی در تولید دانه‌های گرده بارور و فعال ایجاد می‌شود (Schnable and Wise, 1998). اما، به کمک ژن‌های برگرداننده باروری (ژن‌های *Rf*) می‌توان باروری را به لاین‌های نر عقیم سیتوپلاسمی (CMS) بازگرداند. از این‌رو، سیستم‌های CMS/*Rf* مدل‌های مناسبی برای بهره برداری از هتروزیس در سیستم سه لاین در تولید بذر هیبرید در برنج می‌باشد. بنابراین، این نوع نر عقیمی سیتوپلاسمی کاربرد وسیعی در برنامه‌های اصلاحی برنج هیبرید دارد (Komori *et al.*, 2003؛ Zhang *et al.*, 2002).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه نشانگرهای مولکولی و مطالعات در زمینه مکان‌یابی ژن‌های برگرداننده باروری نشان داده است که دو ژن Rf_3 و Rf_4 مسئول

1- Wild abortive
2- Boro II
3- Honglian

برگرداننده باروری در سیتوپلاسم نر عقیم WA می‌باشند. Yao و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از نشانگرهای RFLP محل کروموزمی یکی از این دو ژن (Rf_3) را روی کروموزوم شماره ۱ بین نشانگرهای RG140 و RG532 در فاصله ۱/۹ سانتی مورگان از هر کدام مشخص نمودند. Yao و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از نشانگرهای RAPD و RFLP مکان ژنی Rf_3 را روی کروموزوم شماره ۱ تأیید نمودند و نقشه دومین ژن برگرداننده باروری (Rf_4) را روی کروموزوم شماره ۱۰ با فاصله ۳/۳ سانتی مورگان از نشانگر G4003 مکان یابی نمودند.Jing و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از نشانگرهای SSLP ژن $Rf4$ را روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۰ نقشه یابی نمودند.

Sattari و همکاران (۲۰۰۸) از انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی برای دو ژن Rf_3 و Rf_4 در سیستم نر عقیمی WA استفاده کردند. ایشان چندشکلی بین لاین‌های برگرداننده و غیر برگرداننده باروری را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RG140/*Pvu*II برای ژن Rf_3 روی کروموزوم شماره ۱ وS10019/*Bst*UI برای ژن Rf_4 روی کروموزوم شماره ۱۰ مشاهده نمودند. استفاده همزمان از این دو نشانگر همبسته با این دو مکان ژنی، کارایی غربال مولکولی لاین‌های برگرداننده باروری را در ژرم پلاسم به ۱۰۰ درصد افزایش داد.

Ahmadikhah و همکاران (۲۰۰۷) در شناسائی ارقام برگرداننده، ۳۸ لاین برنج را با لاین CMS تلاقی دادند و F_1های آن‌ها را از نظر باروری دانه گرده و خوشه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که لاین‌های IR28، آمل ۱ و آمل ۲ دارای ژن Rf_4 بوده و با نشانگر RM171 بر روی کروموزوم ۱۰ همبستگی داشتند. لاین‌های IR36 و IR60966 دارای ژن Rf_3 بوده و با نشانگر RM1 بر روی کروموزوم ۱ همبسته بودند.

Bazrkar و همکاران (۲۰۰۸) در نشانمند کردن ژن (های) برگرداننده باروری برای سیتوپلاسم WA با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشان دادند که ۴ ژن برگرداننده باروری بر روی کروموزم‌های ۱، ۷، ۱۰، ۱۲ کنترل‌کننده باروری می‌باشند. آنان ژن جدیدی با نام Rf_7 را بر روی کروموزم ۱۲ مشخص نمودند که با نشانگر RM7003 در فاصله ژنتیکی ۱۳/۳ سانتی مورگان همبستگی دارد. هم‌چنین آنان نشان دادند که نشانگر RM6344 بر روی کروموزم ۷ با ژن Rf_4 همبسته است. نشانگرهای RM443 و RM315 با ژن Rf_3 به‌ترتیب با فاصله‌های ۴/۴ و ۲۰/۷ سانتی مورگان بر روی کروموزم ۱ همبسته هستند. ژن Rf_6 با نشانگرهای RM258 و RM591 در فواصل ژنتیکی ۴/۴ و ۲۳/۳ سانتی مورگان بر روی کروموزم ۱۰ همبسته می‌باشد.

یکی از موارد مهم در سیستم سه لاینی تولید برنج هیبرید (سیستمCMS) پیداکردن و یا تهیه لاین‌های R مناسب با قدرت ترکیب‌پذیری بالا می‌باشد. پیداکردن این لاین‌های Rبه دو طریق امکان‌پذیراست. یکی این‌که لاین‌هایR موجود را با A لاین‌های موجود تلاقی داده، بهترین هیبرید حاصله را انتخاب نمود. راه دوم استفاده از انتخاب به کمک نشانگر است که در آن هزینه کار خیلی کمتر شده و سریع‌تر به لاین R می‌توان دست یافت. هم‌چنین با تشخیص در مراحل اولیه رشدی می‌توان بوته‌های حاوی ژن Rf را تشخیص داده و بقیه را حذف کرد. در این تحقیق تلاش می‌شود با استفاده از استراتژی انتخاب به کمک نشانگر با استفاده از نشانگرهای همبسته با ژن Rf، ارقام برگرداننده و غیر برگرداننده را شناسائی کرده تا در برنامه‌های اصلاحی برنج هیبرید از آن‌ها استفاده شود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۵ لاین برنج به نام‌های ندا، نعمت، دشت، چمپا، سپیدرود، پژوهش، پویا،هاشمی، شیرودی، تابش، شصتک، فجر، خزر، شفق و طارم دیلمانی استفاده گردید. بذور ارقام یادشده در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت شدند. DNA ژنومی از برگ‌های گیاهچه‌های ۲۱ روزه با استفاده از

روش پیشنهادی Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد. با استفاده از اطلاعات مربوط به ناحیه ژن برگرداننده باروری روی کروموزم ۱۰ نشانگر مبتنی بر PCR شامل RM171، RM258 و RM3148 انتخاب شدند (جدول ۱). نشانگر RM3148 روی کروموزم ۱ قرار داشته و در ارقام برگرداننده باندی به طول ۱۶۶ جفت باز تولید می‌کند (Nematzadeh and Kiani, 2012). نشانگرهای RM171 و RM258 روی کروموزم ۱۰ قرار داشته و در ارقام برگرداننده به‌ترتیب باندهائی به طول ۳۲۸ و ۱۴۸ جفت باز تولید می‌کنند.

واکنش PCR با استفاده از ۱ میکرولیتر DNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۱۳/۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱ میکرولیتر dNTPs (هر کدام ۱ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (هر کدام ۵ میکرو مولار) و ۰/۲ میکرولیتر *Taq* پلی مراز (۱ واحد) انجام شد. چرخه حرارتی PCR برای نشانگرها به‌صورت ۹۴ درجه به‌مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه از ۹۴ درجه به‌مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه به‌مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و درنهایت ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. فرآورده‌های PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد تفکیک شدند.

نتایج و بحث

از انتخاب به کمک نشانگر برای تعیین ژنوتیپ ارقام برنج استفاده گردید. ژن اصلی برگرداننده باروری (*Rf4*) با استفاده از نشانگرهای RM171 و RM258 مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از نشانگر RM258 ارقام برگرداننده باروری باندی به طول ۱۴۸ جفت باز و برای بقیه ارقام باندی به طول ۱۷۰ جفت باز را نشان دادند (شکل ۱). هم‌چنین با استفاده از نشانگر RM171 ارقام برگرداننده با توجه به حضور باند مورد انتظار ۳۲۸ جفت باز مورد شناسائی قرار گرفتند. این نتایج نشان می‌دهد که ارقام پویا، هاشمی، خزر و دیلمانی ژن *Rf4* را در ژنوم خود دارا بودند (جدول ۲).

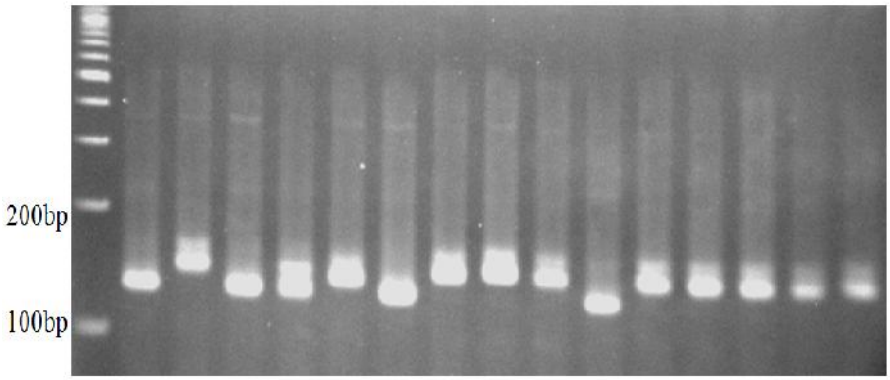
آنالیز مولکولی ارقام از نظر ژن دوم برگرداننده باروری روی کروموزم ۱ (*Rf3*) با استفاده از نشانگر RM3148 نشان داد که ارقام هاشمی، شصتک و دیلمانی واجد ژن Rf_3 در ژنوم خود بودند (جدول ۲). بنابراین، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ارقام هاشمی و دیلمانی واجد هر دو ژن برگرداننده باروری می‌باشند و به‌عنوان ارقام بالقوه از نظر برگرداننده باروری شناسائی شدند. بنابراین تلاقی این ارقام با لاین‌های CMS و ارزیابی باروری نتاج حاصل توصیه می‌گردد.

با توجه به جدول (۲) رقم پویا دارای یک ژن برگرداننده در ژنوم خود می‌باشد که در تایید نتایج Bagheri و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد. آنان وجود یک ژن برگرداننده باروری را با استفاده از جمعیت‌های F_2 و BC_1 برای رقم پویا گزارش کرده بودند.

جدول ۱- نشانگرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. SSR markers used in this study

نشانگر Marker	موقعیت کروموزمی Chromosomal location	دمای اتصال Annealing temperature (°C)	توالی تکرار شونده Motif sequence	توالی رفت Forward sequence (3' to 5')	توالی برگشت Backward sequence (3' to 5')	باند مورد انتظار در ارقام برگرداننده Expected band in restorer varieties (bp)
RM171	10	55	$(GATG)_5$	aac gcg agg aca cgt act tac	acg aga tac gta cgc ctt tg	328
RM258	10	55	$(GA)_{21}(GGA)_3$	tgc tgt atg tag ctc gca cc	tgg cct tta aag ctg tcg c	148
RM3148	1	55	$(CA)_{20}$	gac tat tgc tcg aac act ttg	ttg tct tgc ttt ggt att tgc	166



شکل ۱- نمونه ای از تجزیه مولکولی با استفاده از نشانگر RM258 برای ژن *Rf* روی کروموزم ۱۰ برنج. ستون ۱ مارکر وزنی ۱۰۰ جفت باز ستون‌های ۲ الی ۱۶ به‌ترتیب ارقام پژوهش، سپیدرود، پویا، هاشمی، شصتک، دیلمانی، شیرودی، تابش، فجر، خزر، شفق، ندا، نعمت، دشت و چمپا

Figure 1. Sample of molecular analysis using RM258 for *Rf* gene on chromosome 10 of rice. Lane 1 weight marker 100 bp and 2 to 16 are Pajouhesh, Sepidroud, Pouya, Hashemi, Shastak, Deylamani, Shiroudi, Tabesh, Fajr, Khazar, Shafagh, Neda, Nemat, Dasht and Champa, respectively

جدول ۲- ارزیابی مولکولی ارقام برنج از نظر ژن‌های *Rf* با استفاده از نشانگرهای SSR

Table 2. Molecular evaluation of rice varieties for *Rf* genes using SSR markers

کروموزم ۱ Chromosome 1	کروموزم ۱۰ Chromosome 10		رقم Variety	ردیف Entry no.
RM3148	RM171	RM258		
−	−	−	Neda	1
−	−	−	Nemat	2
+	−	−	Dasht	3
−	−	−	Champa	4
+	+	−	Sepidroud	5
+	+	+	Pajouhesh	6
−	−	+	Pouya	7
+	−	+	Hashemi	8
−	−	−	Shiroudi	9
−	−	−	Tabesh	10
+	−	−	Shastak	11
−	−	−	Fajr	12
−	−	+	Khazar	13
−	−	−	Shafagh	14
+	−	+	Deylamani	15

+ دارای باند برگرداننده باروری، − فاقد باند برگرداننده باروری.

+ Have fertility restorering band, - Have not fertility restorering band.

آنالیز مولکولی نشان داد که ارقام شیرودی، تابش، فجر و شفق فاقد ژن‌های برگرداننده باروری بودند و به‌عنوان ارقام نگهدارنده شناسائی شدند (جدول ۲). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که رقم فجر فاقد

ژن برگرداننده در ژنوم خود می‌باشد که در تأیید نتایج Nematzadeh and Sattari (۲۰۰۳) می‌باشد. آنان در بررسی ژنوم هسته ای ماهیت نگهدارنده را علاوه بر رقم فجر برای ارقام ندا، تعمت، چمپا و آمل۳ گزارش کرده بودند. بنابراین می‌توان برای انتقال سیتوپلاسم نر عقیم به ارقام شیرودی، تابش، فجر و شفق از روش تلاقی برگشتی استفاده نمود.

در اصلاح نباتات کلاسیک به‌نژادگران ارقام برگرداننده باروری را از طریق تست کراس ارقام موجود با لاین‌های CMS و ارزیابی نتاج F_1 از نظر باروری دانه گرده و خوشه مورد شناسائی قرار می‌دهند. لاین‌هایی که نتاج آن‌ها باروری خوشه و دانه گرده بیش از ۸۰ درصد را نشان دهند به‌عنوان لاین‌های برگرداننده درنظر گرفته می‌شوند. این روش‌ها وقت گیر و پرهزینه می‌باشد. از انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای شناسائی بوته‌های برگرداننده باروری استفاده نمود تا حجم مواد اصلاحی به شدت کاهش یابد. در ادامه می‌توان ارقام بالقوه برگرداننده باروری را در مطالعات ترکیب پذیری و هتروزیس مورد ارزیابی‌های بیشتر قرار داد. محققین مختلفی از انتخاب به کمک نشانگر برای تشخیص ارقام برگرداننده باروری استفاده نموده‌اند (Wang *et al.*, 2012؛ Ichikawa *et al.*, 1997).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که ارقام هاشمی و طارم دیلمانی دارای هر دو ژن برگرداننده باروری در ژنوم خود هستند. در حالی‌که ارقام شیرودی، تابش، فجر و شفق به‌عنوان ارقام نگهدارنده شناسائی شدند. از این ارقام می‌توان در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی برنج هیبرید استفاده نمود.

References

Ahmadikhah, A., Karlov, G.I. Nematzadeh, Gh., and Ghasemi Bezdi, K. (2007). Inheritance of the fertility restoration and genotyping of rice lines at the restoring fertility (*Rf*) loci using molecular markers. International Journal of Plant Production, 1: 13-21.

Bagheri, N. and Babaeian-Jelodar, N. (2011). Genetics and combining ability of fertility restoration of 'wild abortive' cytoplasmic male sterility in rice. African Journal of Biotechnology, 10: 9314-9321.

Bazrkar, L., Ali, A.J., Babaeian, N.A., Ebadi, A.A., Allahgholipour, M., Kazemitabar, K., Nematzadeh, G. (2008). Tagging of four fertility restorer loci for wild abortive-cytoplasmic male sterility system in rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite markers. Euphytica, 164(3): 669-677.

Dellaporta, R.P., Wood, J., and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA mini-preparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.

Ichikawa, N., Kishimoto, N., Inagaki, A., Nakamura, A., Koshino, Y., Yokozeki, Y., Oka, M., Samoto, S., Akagi, H., Higo, K., Shinjyo, C., Fujimura, T., and Shimada, H. (1997). A rapid PCR-aided selection of a rice line containing the Rf-1 gene which is involved in restoration of the cytoplasmic male sterility. Molecular Breeding, 3: 195-202.

Jing, R., Li, X., Yi, P., and Zhu, Y. (2001). Mapping fertility restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 42: 167-171.

Komori, T., Yamamoto, T., Takemori, N., Kashihara, M., Matsushima, H., and Nitta N. (2003). Fine genetic mapping of the nuclear gene, *Rf_1*, that restores the BT-type cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.) by PCR-based markers. Euphytica, 129: 241-247.

Lin, S.C. and Yuan, L.P. (1980). Hybrid rice breeding in China. In: Innovative approaches to rice breeding. Pp. 35-51. IRRI, Philippines.

Nematzadeh, G.A. and Kiani, G. (2012). Tagging of fertility-restoring genes in Iranian restorer rice promising line DN-33-18. Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 94: 95-103. [In Farsi]

Nematzadeh, G.A. and Sattari, M. (2003). A study of nucleus genome of some high yielding rice (*Oryza sativa* L.) varieties for application in hybrid rice technology. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 34(1): 213-219. [In Farsi]

Sattari, M., Kathiresan, A., Gregorio, G.B., and Virmani, S.S. (2008). Comparative genetic analysis and molecular mapping of fertility restoration genes for WA, Dissi, and Gambiaca cytoplasmic male sterility systems in rice. Euphytica, 160: 305-315.

Schnable, P.S. and Wise, R.P. (1998). The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends in Plant Science, 3(5): 175-180.

Virmani S.S. and Wan, B.H. (1988). Development of CMS lines in hybrid rice breeding. In: Hybrid rice. International Rice Research Institute. P.O. Box 933, Manila, Philippines. pp: 103-114.

Wang, X., Tan, X., Shao, G., Ma, H., Chen, Y., Zhang, C., and Shang, W. (2012). Marker-assisted selection of Japonica restorers used for Yinshui CMS system. Rice Genome Genetics, 3: 19-24.

Yao, F.Y., Xu, C.G., Yu, S.B., Li, J.X., Gao, Y.J., Li, X.H., and Zhang, Q.F. (1997). Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica, 98: 183-187.

Yuan, L.P. (1998). Hybrid rice breeding in China. In: Virmani S.S., Siddiq E.A., Muralidharan K (eds), Advances in hybrid rice technology. Proceedings of the 3rd international symposium on hybrid rice, 14-16 November 1996, Hyderabad, India. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp: 27-33.

Zhang, Q.Y., Liu, Y.G., Zhang, G.Q., and Mei, M.T. (2002). Molecular mapping of the fertility restorer gene Rf_4 for WA cytoplasmic male sterility in rice. Acta Genetica Sinica, 29: 1001-1004.

Identification of Restoring Fertility and Maintainer Rice Varieties Using SSR Marker

G. Kiani*

*Corresponding Author: Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran (ghkiani@gmail.com)

Received: 20 June, 2015 Accepted: 29 June, 2016

Abstract

Background and Objectives

In classical plant breeding, restorers are identified by the cross test, of existing varieties with cytoplasmic male sterilty (CMS) lines and evaluating F_1 progenies in terms of fertility of pollen and spikelete. Lines showing more than 80 percent fertility of pollen and spikelete are considered as restorer lines. This study aimed at applying marker assisted selection (MAS) using linked SSR markers to restoring fertility (*Rf*) genes for identification of restorer and maintainer lines in hybrid seed production in rice.

Materials and Methods

In this study, 15 rice varieties wer planted at the research farm of Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources and marker assisted selection (MAS) was used for identification of two *Rf* genes located on chromosomes 1 and 10 of rice using SSR markers RM171, RM258 and RM3148. The PCR reaction was performed at 94 °C for 5 min; then for 35 cycles of 94 °C for 1 min; 55°C for 1 min; 72 °C for 2 min followed by 72 °C for 5 min. PCR products were resolved by electrophoresis in agarose gel stained with ethidium bromide and then photographed.

Results

Results of molecular analyses using microsatellite markers RM171, RM258 and RM3148 linked with *Rf* genes showed that rice varieties namely Hashemi and Deylamani had both *Rf* genes in their genomes and were considered as putative restorers and were suggested to be test crossed with male sterile lines to assess their F_1 generations. Rice varieties namely Shiroudi, Tabesh, Fajr and Shafagh were identified as maintainers. Thus backcross breeding method is suitable for transferring sterile cytoplasm to them for development of new CMS lines.

Discussions

Identifying restorer lines by means of molecular marker technology is more cost effective and reliable than phenotypic assays especially in hybrid rice production. Restorer and maintainer lines identified in this study could be used for promotion of hybrid rice technology in the country.

Keywords: Rice, Restorer varieties, Maintainer varieties, SSR marker.