

## การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของ เรณูเนื่องจากอุณหภูมิสูงในข้าว (*Oryza sativa* L.)

### Fine mapping of DNA markers linked to the high temperature-sensitive genic male sterility gene in rice (*Oryza sativa* L.)

ขนิษฐา แสงสว่าง<sup>1</sup> สุรินทร์ ปะโยชนากุล<sup>1</sup> จีรรัตน์ มงคลศิริวัฒนา<sup>2</sup> และ อมรทิพย์  
เมืองพรหม<sup>3\*</sup>

Kanidta Sangsawang<sup>1</sup>, Surin Peyachoknagul<sup>1</sup>, Chareerat Mongkolsiriwatana<sup>2</sup> and  
Amorntip Muangprom<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

<sup>2</sup>สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน  
นครปฐม 73140

<sup>3</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
คลองหลวง ปทุมธานี 12120

<sup>1</sup>Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>2</sup>Division of Genetics, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng  
Campus, Nakompathom 73140, Thailand

<sup>3</sup>BIOTEC, National Science and Technology Development Agency, Khlong Luang, Pathum Thani  
12120, Thailand

\*Corresponding author: amorntip.mua@biotec.or.th

---

#### บทคัดย่อ

การผลิตข้าวลูกผสมแบบ 2 ทาง ใช้พันธุ์ที่มี  
เรณูเป็นหมันที่เกิดจากการแสดงออกของยีนใน  
นิวเคลียส ซึ่งควบคุมโดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น  
ช่วงแสง (photoperiod sensitive genic male  
sterility, PGMS) หรืออุณหภูมิ (thermo-sensitive  
genic male sterility, TGMS) ปัจจุบันยังไม่ทราบ  
กลไกการทำงานของยีนที่ทำให้เรณูเป็นหมันอย่าง  
ชัดเจน ในการวิจัยครั้งนี้ได้หาตำแหน่งของยีนเรณู  
เป็นหมัน โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกิดจากการ

แทรกเพิ่มหรือขาดหาย (Indel marker) โดยใช้  
ประชากร F<sub>2</sub> เฉพาะต้นที่มีเรณูเป็นหมัน 121 ต้น  
จากประชากร F<sub>2</sub> ทั้งหมดจำนวน 527 ต้น ซึ่ง  
ประชากร F<sub>2</sub> นี้ได้จากข้าวสายพันธุ์ TGMS B8  
(IR75589) ผสมกับข้าวพันธุ์ปกติ Azucena ผลจาก  
การวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์พบว่ายีน *tgms* อยู่  
ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2gAP003974 (มี  
ระยะห่าง 0.4 cM) และ 2gAP005756 (มีระยะห่าง  
2.4 cM) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูลข้าว Gramene  
ระบุว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ ทั้ง 2 อยู่ที่โครโมโซมที่

2 โดยมีตำแหน่งอยู่ที่ 5.9 และ 7.26 Mb ตามลำดับ การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

## ABSTRACT

Two-line hybrid rice can be produced using male sterile line in which male sterility is controlled by nuclear gene expression, influenced by environmental factors such as photoperiod (photoperiod sensitive genic male sterility, PGMS) or temperature (thermo-sensitive genic male sterility, TGMS). At present, the function of male sterility gene is still unclear. To locate the position of male sterility gene, Indel markers were generated from 121 male sterile individuals out of 527 total  $F_2$  population obtained from a cross between TGMS B8 (IR75589) and the wild-type Azucena. The gene *tgms* was mapped to the interval between 2gAP003974 (0.4 cM) and 2gAP005756 (2.4 cM) markers. Information obtained from Gramene rice database indicated that these two markers are on chromosome 2 at 5.9 and 7.26 Mb, respectively. Development of these DNA markers will be beneficial for rice genetic improvement.

**คำสำคัญ:** เครื่องหมายดีเอ็นเอ การเป็นหมันของเรณู ข้าวที่มีเรณูเป็นหมันโดยอุณหภูมิ

**Keywords:** DNA markers, male sterility, TGMS rice

## บทนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญกับประชากรมากกว่าครึ่งของโลก เนื่องจากประชากร

ส่วนมากบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก เทคโนโลยีการผลิตข้าวลูกผสมเป็นเทคนิคการเพิ่มผลผลิตให้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่มากกว่า 20% (Chen *et al.*, 2010) ในประเทศจีนนั้นมีการผลิตข้าวลูกผสมในเชิงพาณิชย์มากมาย ซึ่งสามารถแบ่งข้าวลูกผสมเป็น 2 ประเภท คือ ลูกผสมแบบสามทาง ใช้พันธุ์แม่ที่มีเรณูเป็นหมันควบคุมโดยยีนในไซโทพลาสซึม (cytoplasmic male sterility; CMS) และลูกผสมแบบสองทาง พันธุ์แม่มีเรณูเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส (genic male sterility; GMS) ซึ่งอาจเป็น photoperiod sensitive genic male sterility (PGMS) หรือ thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) (Liu *et al.*, 2010) สายพันธุ์ PGMS และ TGMS เรณูจะเป็นหมัน ภายใต้สภาพวันยาว หรืออุณหภูมิสูง และสามารถติดเมล็ดได้ในสภาพวันสั้น หรืออุณหภูมิต่ำ ตามลำดับ ข้อดีของการผลิตข้าวลูกผสมแบบสองทาง คือ สะดวก รวดเร็ว มีพ่อแม่พันธุ์ที่หลากหลาย ไม่จำเป็นต้องใช้พันธุ์ maintainer และใช้ต้นทุนราคาถูกกว่าลูกผสมแบบสามทาง ข้าว TGMS เป็นข้าว อินดิกา (*indica*) ซึ่งมีรายงานการค้นพบในประเทศจีน ญี่ปุ่น และสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งลักษณะการเป็นหมันนี้ควบคุมด้วยแอลลีลเดี่ยว (Singh *et al.*, 2011) เครื่องหมาย ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพื้นฐานที่ใช้ในการทำงานวิจัย เช่น การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) การโคลนยีนที่ทราบตำแหน่งของยีนบนโครโมโซม (map-base cloning of gene) และใช้ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ (marker-assisted breeding) สามารถนำไปใช้ตรวจสอบคัดเลือกการถ่ายยีน *tgms* ไปยังข้าวสายพันธุ์ต่างๆ (Ying *et al.*, 2004) โดยที่ไม่ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม สามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระยะต้นอ่อน และมีประสิทธิภาพสูง

งานวิจัยนี้ได้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS ซึ่งเป็นข้าวอินดิ ก้า และพันธุ์ข้าวจาปอนิกา (*japonica*) ปกติ วิเคราะห์ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ หา ตำแหน่งของยีน *tgms* ซึ่งสามารถนำไปใช้ ประโยชน์ในการผลิตข้าวลูกผสมแบบสองทางต่อไป ในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ข้าวสายพันธุ์ TGMS B8 (IR75589) ได้รับความอนุเคราะห์พันธุ์ข้าวจาก สถาบันวิจัยข้าว นานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์ เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มี ลักษณะเรณูเป็นหมันอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ มากกว่า 28 องศาเซลเซียส ผสมกับข้าวที่มีลักษณะ เรณูปกติ คือ Azucena ได้ประชากร  $F_1$  ปลอຍให้ ผสมตัวเองจนได้ประชากร  $F_2$  จำนวน 527 ต้น คัดเลือกเฉพาะต้นที่เรณูเป็นหมัน จำนวน 121 ต้น มาใช้ในการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อศึกษา ตำแหน่งของยีน *tgms*

### การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวสายพันธุ์ พ่อแม่ และประชากร  $F_2$  เฉพาะต้นที่เรณูเป็นหมัน โดยวิธี CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Murray and Thompson 1980).

### การศึกษาเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเรณูที่สมบูรณ์ของข้าวพันธุ์ B8 (IR75589), Azucena และประชากร  $F_2$  แช่ใน สารละลาย 0.7%  $I_2-KI$  แล้วนำมาตรวจดูภายใต้ กล้องจุลทรรศน์

### การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เนื่องจากข้าวมีการหาลำดับเบสในจีโนม ทั้งชุดเรียบร้อยแล้ว จึงอาศัยข้อมูลพื้นฐานนี้ ประกอบกับงานวิจัยที่ผ่านมา ออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่งของยีน โดยพัฒนา เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดที่เกิดจากการแทรกเพิ่ม และการขาดหาย (Indel marker) อย่างน้อย 30 คู่ จากงานวิจัยของ Ying และคณะ (2004) โดยใช้ ฐานข้อมูลลำดับเบสในจีโนมของข้าว (Gramene Organization, 2000) ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ โปรแกรม Primer 3 (<http://workbench.sdsc.edu>)

### การวิเคราะห์พอลิเมอร์เฟซิม

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจาง แล้วนำไป เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น โดยใช้ปฏิกิริยาคือ รอบที่ 1, 95 องศาเซลเซียส 5 นาที; รอบที่ 2-35, 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที, อุณหภูมิที่เหมาะสม 53-60 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 7 นาที แล้วนำผลผลิตที่ได้มา ตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส 3 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ ความแตกต่าง ระหว่างข้าวที่มีลักษณะเรณูเป็นหมัน กับข้าวที่มีลักษณะเรณูปกติ เพื่อนำไปวิเคราะห์หา ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีนควบคุม เรณูเป็นหมัน

### การวิเคราะห์จีโนไทป์ของประชากร $F_2$ และการ คำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ปลูกข้าวในแปลงทดสอบเพื่อใช้ในการ ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอและตรวจสอบฟีโนไทป์ โดยจะปลูกในช่วงฤดูร้อนที่มีอุณหภูมิไม่ต่ำ

กว่า 28 องศาเซลเซียส เพราะข้าวจะเป็นหมันเมื่ออยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส เมื่อดอกข้าวเริ่มบาน ตรวจสอบฟีนไทป์ แยกต้นที่เรณูเป็นหมันและไม่เป็นหมันออกจากกัน โดยดูจากลักษณะของเรณู ตรวจสอบฟีนไทป์ของข้าวทั้งประชากร จากนั้นเก็บตัวอย่างใบข้าวในประชากร F<sub>2</sub> เฉพาะต้นที่เรณูเป็นหมัน เพื่อวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้พอลิมอร์ฟิซึม คำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (Genetic distance, cM) (Peng *et al.*, 2010)

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### การเปรียบเทียบลักษณะของเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่ใกล้ชิดกับยีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูข้าวสายพันธุ์ TGMS B8 (IR75589) ซึ่งเรณูเป็นหมันภายใต้อุณหภูมิสูง สามารถติดเมล็ดได้ในสภาพอุณหภูมิต่ำ จากการเปรียบเทียบเรณูของข้าวพันธุ์ปกติ โดยการย้อมด้วย ไอโอดีน-โพแทสเซียม ไอโอไดด์ เรณูจะติดสีดำเข้ม ในขณะที่ ข้าว TGMS ย้อมไม่ติดสีหรือติดสีน้อยมาก (Figure 1) เนื่องจากไม่มีเรณูในอับเรณู (Wang *et al.*, 2010)



**Figure 1** Pollen staining of wild-type and TGMS mutant lines. Left: mature anther of wild-type was squashed in 0.7% I<sub>2</sub>-KI solution, in which pollens were round and darkly stained. Right: mature anther of TGMS mutant was squashed in the same solution.

#### การวิเคราะห์ตำแหน่งยีน *tgms*

จากการผสมข้าว TGMS B8 (IR75589) กับพันธุ์ปกติ Azucena ได้ประชากร F<sub>1</sub> ปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้ประชากร F<sub>2</sub> ปลุกประชากร F<sub>2</sub> ช่วงเดือนธันวาคม 2554 ในจังหวัดปทุมธานี จากการวิเคราะห์ด้วยไคสแควร์ พบว่าอัตราส่วนของต้นปกติต่อต้นที่เรณูเป็นหมันคือ 3:1 ( $\chi^2 = 1.16 < \chi^2_{0.05} = 3.84$ ) (Table 1) แสดงให้เห็นว่าลักษณะเรณูหมันในข้าว TGMS B8 (IR75589) ควบคุมด้วยแอลลีลด้อยของยีน 1 ตำแหน่ง

**Table 1** Fertility of the F<sub>2</sub> derived from the cross between B8 (IR75589) and Azucena.

| Population lines                       | Total | No. of Fertile plants | No. of sterile plants | Fertile plants/Sterile plants | $\chi^2$<br>0.05 (3:1)<br>= 3.84 |
|----------------------------------------|-------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| F <sub>2</sub> B8 (IR75589) x Azucena) | 527   | 406                   | 121                   | 3.36                          | $\chi^2=1.1695$                  |

ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูในข้าว

*tgms* ก่อนหน้านี้ สามารถระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมที่ 2 ในช่วงบริเวณ 6.4 Mb

(ชื่นจิตร, 2551) ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดที่เกิดจากการแทรกเพิ่ม และการขาดหายไป (Indel marker) อย่างน้อย 30 คู่เบส ในช่วงบริเวณดังกล่าว จำนวน 41 เครื่องหมายหาอุณหภูมิที่เหมาะสมแล้วทดสอบหาเครื่องหมายที่ให้ ความแตกต่าง ระหว่างข้าวที่มีลักษณะเรณูเป็นหมัน

กับข้าวที่มีลักษณะเรณูปกติ ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่ให้ความแตกต่าง 4 เครื่องหมาย คือ 2gAP004070 7.4 Mb, 2gAP005756 7.26 Mb, 2gAP003974 5.9 Mb และ 2gAP005058 5.8 Mb (Table 2) จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมดมาทดสอบกับประชากร  $F_2$  ที่มีเรณูเป็นหมัน

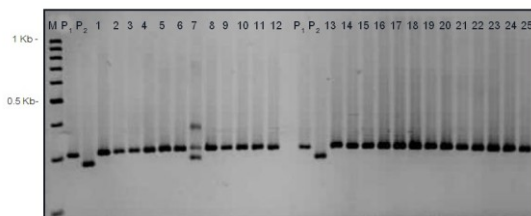
**Table 2** The sequences of primers used for fine mapping of the *tgms* gene of B8 (IR75589).

| Chromosome | DNA marker | Mb<br>(distance on<br>chromosome) | Primer sequence (5'-3')                             |
|------------|------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 2          | 2gAP005058 | 5.8                               | CAAACAACCACTTTTGTTCAGCA<br>ATATATGCTGTGGGCAGGATCAA  |
| 2          | 2gAP003974 | 5.9                               | CAATTCGGAGATTACATTCGGTC<br>ACTATAGACGCAGCTTGTGTGCC  |
| 2          | 2gAP005756 | 7.26                              | AATTCATTGGACGCACACACAT<br>TGCATTGGGAAATTGAAAAGATT   |
| 2          | 2gAP004070 | 7.4                               | ATGGTGCCGGATAACGTATTACA<br>GGCTTGCGGTAAGAATATAGGAGA |

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน *tgms* ของข้าว TGMS จากประชากร  $F_2$  เฉพาะต้นที่เรณูเป็นหมัน พบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนต้นแม่ คือ มีรูปแบบแถบ ดีเอ็นเอแบบฮอโมไซกัส คือตัวอย่างที่ 1-6, 8-25 โดยมีแถบ ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และตัวอย่างที่ 7 เป็นเฮเทอโรไซกัส มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ 280 คู่เบส (Figure 2)

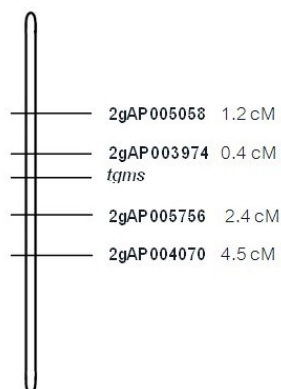
จากการทดสอบประชากร  $F_2$  เฉพาะต้นที่เรณูเป็นหมัน จำนวน 121 ต้น ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น 4 เครื่องหมาย คำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับตำแหน่งของยีน *tgms* พบว่าเครื่องหมาย 2gAP004070, 2gAP005756, 2gAP003974 และ 2gAP005058

พบต้นที่เกิดรีคอมบิเนชัน จำนวน 11, 6, 1 และ 3 ต้น มีระยะห่างจากยีน 4.5, 2.4, 0.4 และ 1.2 cM ตามลำดับ (Figure 3) โดยตำแหน่งของยีน *tgms*



**Figure 2** Agarose gel eletrophoresis of PCR products amplified by 2gAP003974 primer of TGMS B8 (IR75589) ( $P_1$ ), Azucena ( $P_2$ ) and  $F_2$  individuals, M=marker and 1-25= $F_2$  individuals.

อยู่ระหว่างเครื่องหมาย 2gAP005756 มีระยะห่าง 2.4 cM และ 2gAP003974 มีระยะห่าง 0.4 cM เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้กับยีนมากที่สุด สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีฤทธิ์เป็นหมันได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Peng และคณะ ในปี 2010 ได้ระบุเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีน *tmsx* และมีการรายงาน candidate ของยีน *tms5* อยู่ที่ตำแหน่ง 19 กิโลเบส ระหว่างเครื่องหมาย โมเลกุล 4039-1 และ 4039-2 บน BAC clone AP004039 (Yang *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบ candidate ของยีน *ptgms2-1* เกิด SNP ขึ้นในยีน *Loc\_os02g12290* (Xu *et al.*, 2011) ซึ่งการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีน *tgms* ในข้าว TGMS ครั้งนี้จะประโยชน์อย่างยิ่งกับการถ้ายีนเป็นหมันหรือช่วยคัดเลือกในการพัฒนาข้าว ลูกผสมแบบสองทาง



**Figure 3** Map of linked markers flanking the *tgms* locus from TGMS B8 (IR75589) x Azucena.

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวทช.)

### เอกสารอ้างอิง

- ชินจิตร บุญเจริญ. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงก์กับยีนควบคุมเกสรตัวผู้เป็นหมัน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- Chen, L., Zhao, Z., Liu, X., Liu, L., Jiang, L., Liu, S., Zhang, W., Wang, Y., Liu, Y. and Wan, J. 2010. Marker-assisted breeding of a photoperiod-sensitive male sterile *japonica* rice with high cross-compatibility with *indica*. *Mol Breed* 1: 247–258.
- Gramene Organization. 2000. A resource for comparative grass genomics. Available Source: <http://www.gramene.org/about/>, September 25, 2010.
- Liu, X., Li, X., Zhang, X., Wang, S. 2010. Genetic analysis and mapping of a thermosensitive genic male sterility gene, *tms6(t)*, in rice (*Oryza sativa* L.) *Genome* 53: 119–124.
- Murray M.G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8: 4321–4326
- Peng, H.F., Chen, X.H., Lu, Y.P., Peng, Y.F., Wan, B.H., Chen, N.D., Wu, B., Xin, S.P. and Zhang, G.Q. 2010. Fine mapping of a gene for non-pollen type thermosensitive genic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 120: 1013–1020.
- Singh V.K., Upadhyay P., Sinha, P., S., Mall, A.K., Jaiswal, S.K., Singh, A., Ellur, R.K., Biradar, S., Sundaram, R.M., Singh, S., Ahmed, L., Mishra, B., Singh, A.K. and Kole, C. 2011. Determination of genetic

- relationships among elite thermosensitive genic male sterile lines (TGMS) of rice (*Oryza sativa* L.) employing morphological and simple sequence repeat (SSR) markers. *J Genetics* 90: 11–19.
- Wang, Y., Zhong, Z.Z., Zhao, Z.G., Jiang, L., Bian, X.F., Zhang, W.W., Liu, L.L., Ikehashi, H. and Wan, J.M. 2010. Fine mapping of a gene causing hybrid pollen sterility between Yunnan weedy rice and cultivated rice (*Oryza sativa* L.) and phylogenetic analysis of Yunnan weedy rice. *Planta* 231: 559–570.
- Xu, J., Wang, B., Wu, Y., Du, P., Wang, J., Wang, M., Yi, C., Gu, M., Liang G. 2011. Fine mapping and candidate gene analysis of *ptgms2-1*, the photoperiod-thermo-sensitive genic male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 122: 365–372.
- Yang, Q.K., Liang, C.Y., Zhuang, W., Li, J., Deng, H.B., Deng, Q.Y., and Wang, B. 2007. Characterization and identification of the candidate gene of rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* by mapping. *Planta* 225: 321–330.
- Ying, J.S., Hua, J., Jian, P.J., Zai, B.Z., Biao, X., You, Y.H., Guan, W., Chen, W., Lily, Q., Xiang, L., Qing, B.Y., Hui, J.L., De, H.C., Jian, H.G., Hai, H., Tie, L.S. and Zhong, N.Y. 2004. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Genome Analysis* 135: 1198–1205.