ว.วิทย. มข. 45(3) 605-617 (2560) KKU Sci. J. 45(3) 605-617 (2017)

การคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอม ต้านทานโรคไหม้และทนทานน้ำท่วมฉับพลัน

DNA markers screening for developing aromatic glutinous rice lines resistance to blast and tolerance to submergence

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง[1,2] ธีรยุทธ ตู้จินดา[2] และสุรีพร เกตุงาม[1*]

[1]ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จ. อุบลราชธานี 34190

[2]ห้องปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[*]Corresponding Author, E-mail: sureeporn.k@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวให้ทนทานต่อสภาพเครียดหลายลักษณะพร้อมๆ กันสามารถทำได้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก และเครื่องหมายดีเอ็นเอของลักษณะเป้าหมายดังกล่าวต้องแยกความแตกต่างของแอลลีลเป้าหมายระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่เพื่อใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกแอลลีลเป้าหมายในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอมต้านทานโรคไหม้และทนน้ำท่วมฉับพลัน โดยดำเนินการปรับปรุงพันธุ์แบบสืบประวัติ ใช้สายพันธุ์ข้าวเจ้าหอม Jasmine IR57514 ที่มีคุณภาพการหุงต้มและรับประทานคล้ายข้าวขาวดอกมะลิ 105 และทนน้ำท่วมฉับพลันเป็นต้นแม่และใช้สายพันธุ์ข้าวเหนียวปรับปรุง กข6 ที่ได้รับการผนวกยีนต้านทานโรคไหม้ (RD6-blast No.334) เป็นต้นพ่อ ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะเป้าหมาย 5 ลักษณะในแต่ละรุ่นของประชากรที่พัฒนาขึ้นเพื่อรวมลักษณะดีเด่นไว้ในข้าวสายพันธุ์ใหม่ ได้แก่ ลักษณะทนน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*) ความหอม (*badh2*) และอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ (*SSIIa-TT*) จากสายพันธุ์แม่ และลักษณะต้านทานโรคไหม้ (*qBl1* และ *qBl11*) ข้าวเหนียว (*wx*) จากสายพันธุ์พ่อ ดำเนินการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอรวม 16 เครื่องหมาย พบว่า มีเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 8 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พ่อแม่ได้อย่างชัดเจน ประกอบด้วย เครื่องหมาย R10783indel, Aromarker, *Wx*-Glu-23 และ SNP2340-41 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมาย *Sub1* ควบคุมลักษณะทนน้ำท่วมฉับพลัน ยีน *badh2* ควบคุมลักษณะความหอม ยีน *wx* ควบคุมลักษณะข้าวเหนียว และ ยีน *SSIIa-TT* ควบคุมลักษณะอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ ตามลำดับ

และมีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่อยู่ใกล้ชิดกับลักษณะต้านทานโรคไหม้ *qBl1* บนโครโมโซม 1 และ *qBl11* บนโครโมโซม 11 จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RM212/RM319, RM144/RM1233 ซึ่งอยู่ใกล้ชิดขนาบหัวท้ายกับ *qBl1* และ *qBl11* ตามลำดับ จากนั้นนำเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกประชากร F_2 ที่มีลักษณะทางการเกษตรดีจำนวน 105 ต้น พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะเป้าหมายดังกล่าวได้จำนวน 9 ต้น จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร F_3 และคัดเลือกลักษณะเป้าหมายเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอมต้านทานโรคไหม้และทนทานน้ำท่วมฉับพลันต่อไป

ABSTRACT

Developing rice varieties for multi-stress tolerance traits can be accomplished by using marker-assisted selection (MAS). Those DNA markers underlying the target traits have to distinguish polymorphism between parental lines. This research was aimed to screen DNA markers which can distinguish polymorphism between the parental lines in order to use as a tool to select favorable alleles for developing aromatic glutinous rice lines resistance to blast and tolerance to submergence. The breeding work was performed using pedigree method. Jasmine IR57514, the aromatic Jasmine-liked cooking quality and tolerance to submergence rice line, was used as female parent whereas RD6-blast No.334, a glutinous rice line resistance to blast, was used as male parent. DNA markers underlying 5 target traits were used to select progenies carrying the favorable alleles of those traits of interest in each generation which consisted of submergence tolerance (*Sub1*), grain aroma (*badh2*) and low gelatinization temperature (*SSIIa*-TT) from female parent and blast resistance (*qBl1* and *qBl11*) and glutinous (*wx*) traits from male parent. Parental polymorphism screening was carried out using 16 DNA markers. The results showed that 8 DNA markers clearly distinguished the parental lines which consisted of 4 genes specific markers including R10783indel, Aromarker *Wx*-Glu-23, and SNP2340-41 underlying submergence tolerance, grain aroma, glutinous and low gelatinization temperature traits, respectively and 4 rice microsatellite makers, RM212/RM319 and RM144/RM1233, flanking *qBl1* and *qBl11* conferring blast resistance traits on chromosome 1 and 11 respectively. The chosen DNA markers were employed to select good plant type and agronomic characters of 105 F_2 progenies and 9 F_2 progenies were identified carrying the favorable alleles underlying those target traits. The selected F_2 progenies were self-pollinated to produce F_3 progenies. Then, marker-assisted selection will be performed to select the F_3 progenies carrying the homozygous alleles of those traits of interest to develop aromatic glutinous rice lines resistance to blast and tolerance to submergence.

คำสำคัญ: ข้าวเหนียว โรคไหม้ น้ำท่วมฉับพลัน การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก
Keywords: Glutinous rice, Blast disease, Flash flooding, Marker-assisted selection (MAS)

บทนำ

ข้าวเหนียวพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและเป็นอาหารหลักของคนไทยในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พันธุ์ข้าวที่ได้รับความนิยมส่วนใหญ่คือพันธุ์ กข6 ซึ่งมีลักษณะนุ่มเหนียวและมีกลิ่นหอม การปลูกข้าวในพื้นที่อาศัยน้ำฝนดังกล่าวมักประสบปัญหาการกระจายตัวของปริมาณน้ำฝนไม่สม่ำเสมอ บางครั้งทำให้เกิดปัญหาน้ำท่วมฉับพลัน หรือฝนแล้ง และเกิดการแพร่ระบาดของโรคและแมลงอยู่เสมอ โดยเฉพาะโรคไหม้ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของพื้นที่ปลูกข้าวอาศัยน้ำฝนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของไทย และพบว่าข้าวพันธุ์ กข6 แสดงความอ่อนแอต่อสภาวะเครียดดังกล่าว (Toojinda et al., 2005) ดังนั้นแนวทางการลดการสูญเสียของผลผลิตข้าวแบบยั่งยืนคือการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้สามารถทนต่อสภาพเครียดหลายลักษณะ (multi-stress tolerance) ได้แก่ ทนน้ำท่วมฉับพลัน และต้านทานโรคไหม้เป็นต้น และยังคงลักษณะดีเด่นของคุณภาพการหุงต้มและความหอมเอาไว้

การรวมลักษณะทนทานต่อสภาพเครียดหลายๆ ลักษณะไว้ในสายพันธุ์เดียวเป็นการยากที่จะประสบความสำเร็จโดยการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) ซึ่งคัดเลือกประชากรจากลักษณะที่ปรากฏหรือฟีโนไทป์ ซึ่งบางครั้งอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะดังกล่าว การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection: MAS) จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการคัดเลือกลักษณะเป้าหมายหลายๆ ลักษณะพร้อมๆ กัน ซึ่งปัจจุบันมีการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง ย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง ช่วยลดปัญหาการเกิด linkage drag และสามารถคัดเลือกหลายลักษณะพร้อมกัน ซึ่งเป็นไปได้ยากสำหรับการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (สุรีพร, 2557; ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2553; Toojinda et al., 2005; Collard and Mackill, 2008) ในทศวรรษที่ผ่านมามีรายงานความสำเร็จมากมายของการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกทดแทนการคัดเลือกด้วยฟีโนไทป์ (phenotypic selection) ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ตัวอย่างเช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ (Hittamani et al., 2000; Toojinda et al., 2005; Sreewongchai et al., 2010; Wongsaprom et al., 2010; Singh et al., 2012; Manivong et al., 2014; Ruengphayak et al., 2015) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีกลิ่นหอมและมีลักษณะคุณภาพการหุงต้ม และรับประทานดีขึ้น (Yi et al., 2009; Jin et al., 2010; Jantaboon et al., 2011, Kate-ngam et al., 2011; Manivong et al., 2014; Ruengphayak et al., 2015) และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนน้ำท่วมฉับพลัน (ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2555; Toojinda et al., 2005; Jantaboon et al., 2011, Katengam et al., 2011, Manivong et al., 2014; Ruengphayak et al., 2015) เป็นต้น

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอมต้านทานโรคไหม้ทนทานน้ำท่วมฉับพลันสำหรับพื้นที่ปลูกข้าวอาศัยน้ำฝน จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกลักษณะเป้าหมายหลาย ๆ ลักษณะ อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จะใช้คัดเลือกลักษณะเป้าหมายดังกล่าวต้อง

สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแอลลีลเป้าหมายของสายพันธุ์พ่อและแม่ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ในลักษณะเป้าหมาย 5 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคไหม้ ทนน้ำท่วมฉับพลัน ความหอม ลักษณะข้าวเหนียวและอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ และนำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกแอลลีลเป้าหมายในประชากรที่พัฒนาได้ต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการวิจัย

สายพันธุ์แม่ คือ ข้าวสายพันธุ์ Jasmine IR57514 (RGD07334-34-16: BC_3F_3) เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะทนน้ำท่วมฉับพลัน ให้ผลผลิตสูง เมล็ดมีกลิ่นหอม มีลักษณะคุณภาพการหุงต้มและรับประทานคล้ายข้าวขาวดอกมะลิ 105 คือมีปริมาณอะไมโลสต่ำ (AC=17.2%) ความคงตัวของแป้งสุกอ่อน (80 mm.) และอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ (ASV=7) (Katengam et al., 2011) ส่วนข้าวสายพันธุ์พ่อคือ RD6-blast No.334 (RGD334-3-11-1-2-34: BC_3F_2) เป็นข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง กข6 ที่มีการผนวกยีนต้านทานโรคไหม้ เป็นสายพันธุ์ให้ QTLs ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum blast resistance) ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 11 (*qBl1* และ *qBl11*) และลักษณะข้าวเหนียว (Wongsaprom et al., 2010)

สร้างประชากร F_1 จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร F_2 ดำเนินการ ณ หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปลูกประชากร F_2 และดำเนินการคัดเลือกต้น F_2 ที่มีลักษณะทางการเกษตรดี คือ มีลักษณะทรงต้น และการแตกกอดี จากนั้นเก็บใบของประชากร F_2 มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนเป้าหมายต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บใบอ่อนของข้าวสายพันธุ์พ่อแม่และประชากร F_2 ที่ผ่านการคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรดี คือ มีลักษณะทรงต้น และการแตกกอดี มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ DNA Trap Kit (DNA technology laboratory)

การคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่ (Parental polymorphism screening)

คัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับยีน (gene specific markers) หรืออยู่ใกล้ชิดกับ QTLs (QTL linked markers) ที่ควบคุมลักษณะเป้าหมายจำนวน 5 ลักษณะ ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงยีนที่ควบคุมลักษณะข้าวเหนียว (wx), ลักษณะทนทานน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*), ความหอม (*badh2*) และอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ (*SSIIa*-TT) โดยใช้เครื่องหมาย *Wx*-Glu-2, R10783indel, Aromarker และ SNP2340-41 ตามลำดับ และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับ *qBl1* และ *qBl11* ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 1 และ 11 ตามลำดับ ซึ่งมีทั้งหมดรวม 12 เครื่องหมาย (ตารางที่ 1)

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมาตรวจสอบเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ Jasmine IR57514 และ RD6-blast No.334 โดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) และแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยใช้เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (gel electrophoresis)

องค์ประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมาย Aromarker R10783indel RM212 RM319 RM144 RM224 RM456C RM7654 RM3151 RM1233 RM330 RM254 RM4069 และ RM27247 โดยใช้ PCR reaction ปริมาตร 10 µl โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย DNA template 20 ng 1X PCR buffer 1.5 mM $MgCl_2$ 0.2 mM dNTPs 0.2 µM primers (forward และ reverse primers) 0.25 U *Taq* DNA polymerase และ เติม deionized water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 µl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reaction) ดังนี้ อุณหภูมิ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ denature 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ long extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำ PCR products มาแยกขนาดดีเอ็นเอใน 4.5 % polyacrylamide gel electrophoresis

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย SNP 2340-41 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย DNA template 20 ng 1X KAPA2G buffer A 0.5 mM $MgCl_2$ 0.2 mM dNTPs 0.05 µM primer P 0.05 µM primer Q 0.025 µM primer TT 0.025 µM primer GC 0.15 U KAPA2G™ Robust HotStart DNA polymerase และเติม deionized water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 20 µl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ อุณหภูมิ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ denature 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 64 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ long extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที นำ PCR products มาแยกขนาดดีเอ็นเอใน 2.5% agarose gel electrophoresis

ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย *Wx*-Glu-23 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 10 µl ประกอบด้วย DNA template 20 ng 1X KAPA2G buffer B 1X KAPA Enhancer 1 0.5 mM $MgCl_2$ 0.2 mM dNTPs 1 µM primers (forward และ reverse) 0.4 U KAPA2G™ Robust HotStart DNA polymerase และเติม deionized water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 µl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ denature 95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที อุณหภูมิ annealing 61 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ long extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที นำ PCR products มาแยกขนาดดีเอ็นเอใน 4.5 % polyacrylamide gel electrophoresis

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก (MAS) ในประชากร F_2

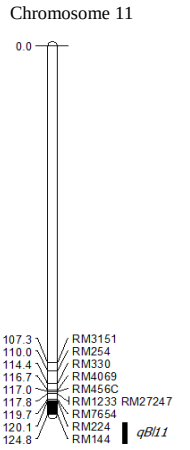
คัดเลือกลักษณะเป้าหมายในประชากร F_2 ที่ผ่านการคัดเลือกลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ ลักษณะทรงต้น และการแตกกอดี นำมาคัดเลือกจีโนไทป์ของลักษณะเป้าหมาย 5 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 11 ลักษณะทนน้ำท่วมฉับพลัน ความหอม ข้าวเหนียว และอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดกรองได้ว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่

ได้ โดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำมาแยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอโดยใช้เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่

จากการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิดกับ QTLs ต้านทานโรคไหม้ *qBl1* และ *qBl11* จำนวน 12 เครื่องหมาย แบ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ขนาบหัวท้าย (flanking markers) กับ QTLs ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 11 (*qBl1* และ *qBl11*) จำนวน 2 และ 10 เครื่องหมาย ตามลำดับ (Wongsaprom et al., 2010; www.gramene.org.) พบว่า มีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ Jasmine IR57514 และข้าวสายพันธุ์ RD6-blast No.334 ได้จำนวน 2 และ 3 เครื่องหมาย ตามลำดับ คือ RM212 RM319 (*qBl1*) และ RM144 RM1233 RM254 (*qBl11*) ตามลำดับ และพบว่าเครื่องหมาย RM224 ที่มีรายงานว่าใกล้กับ QTL ต้านทานโรคไหม้ *qBl11* (Noenplab et al., 2006; Wongsaprom et al., 2010) ซึ่งมีรายงานการนำไปใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ *qBl11* ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ประสบความสำเร็จในหลายคู่ผสม (เชาวเลิศ และคณะ, 2550; ธีระวัช และคณะ, 2552; Sreewongchai et al. 2010; Wongsaprom et al., 2010) นั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ Jasmine IR57514 และ RD6-blast No.334 ได้ แต่พบว่าเครื่องหมาย RM1233 และ RM254 ซึ่งมีระยะห่างจาก *qBl11* ประมาณ 4.7 และ 12.5 cM ตามลำดับ (รูปที่ 1) สามารถแยกความแตกต่างในข้าวสายพันธุ์พ่อแม่ได้ ซึ่งเครื่องหมาย RM1233 มีตำแหน่งใกล้ชิดกับ *qBl11* มากกว่า RM254 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 11 (*qBl11*) สอดคล้องกับ Collard and Mackill (2008) รายงานว่าระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน/QTLs ควบคุมลักษณะที่ต้องการคัดเลือกไม่ควรห่างกันเกิน 5 cM หากเครื่องหมายดีเอ็นเอมีระยะห่างจากยีน/QTLs ควบคุมลักษณะเป้าหมายมากเกินไปจะทำให้ความแม่นยำของการคัดเลือกลดน้อยลงตามไปด้วย ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากการเกิดรีคอมบิเนชั่น (recombination) ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนที่ต้องการคัดเลือก หากนำเครื่องหมาย RM1233 และ RM144 ซึ่งขนาบข้างหัวท้าย (flanking markers) *qBl11* มาใช้ในการคัดเลือก *qBl11* พบว่า จะมีความแม่นยำในการคัดเลือกสูงถึง 99.78 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตร Reliability for selection = 1-2rArB (Collard and Mackill, 2008) ดังนั้น 1 – 2 (0.023 X 0.047) = 0.9978



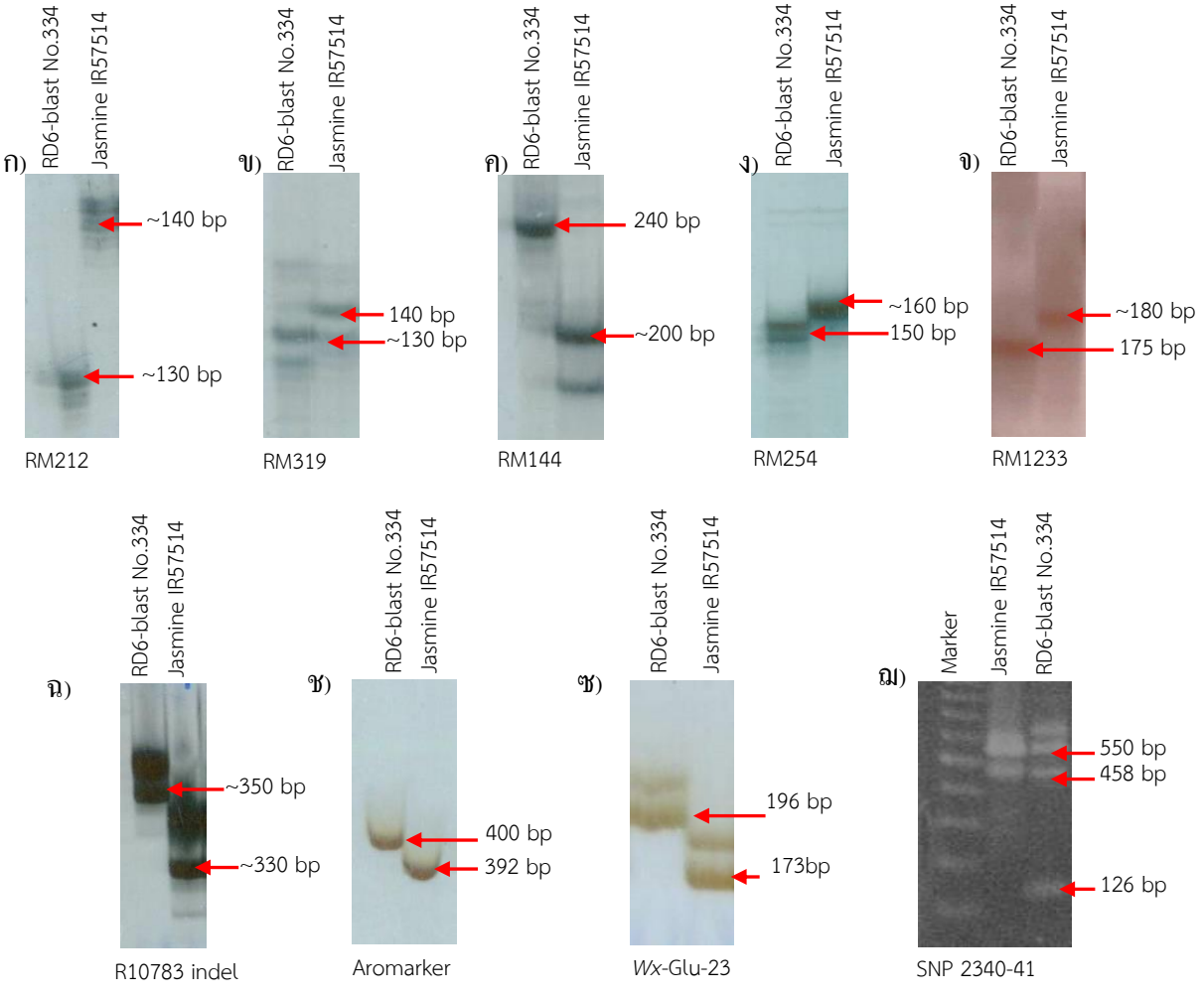
รูปที่ 1 ตำแหน่งและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 11 (*qBl11*)

ตารางที่ 1 ผลการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอของลักษณะเป้าหมาย 5 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคไหม้ ทนน้ำท่วมฉับพลัน ความหอม ข้าวเหนียว และอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ ที่ใช้คัดกรองในข้าวสายพันธุ์พ่อแม่

Traits	Gene/QTLs	Markers	Chromo-some	Distance from gene/ QTLs (cM)	Parental polymor-phism screening [1/]	References
1. Blast resistance	*qBl1*	RM212	1	0.9	√	Wongsaprom et al., 2010
	qBl1	RM319	1	0.9	√	Wongsaprom et al., 2010
	qBl11	RM3151	11	15.2	X	www.gramene.org
	qBl11	RM254	11	12.5	√	www.gramene.org
	qBl11	RM330	11	8.1	X	www.gramene.org
	qBl11	RM4069	11	5.8	X	www.gramene.org
	qBl11	RM456C	11	5.5	X	www.gramene.org
	qBl11	RM1233	11	4.7	√	www.gramene.org
	qBl11	RM27247	11	4.7	X	www.gramene.org
	qBl11	RM7654	11	2.7	X	www.gramene.org
	qBl11	RM224	11	2.4	X	Wongsaprom et al., 2010
	qBl11	RM144	11	2.4	√	Wongsaprom et al., 2010
2. Submergence tolerance	*Sub1*	R10783 indel	9	0	√	Toojinda et al., 2005
3. Fragrance	*badh2*	Aromarker	8	0	√	Jantaboon et al., 2011
4. Glutinous	*wx*	*Wx*-Glu-23	6	0	√	Wanchana et al., 2003
5. Low gelatinization temperature	*SSIIa*-TT	SNP2340-41	6	0	√	Kate-ngam et al., 2008

หมายเหตุ: [1/] √ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ RD6-blast N0.334 และ Jasmine IR57514

X เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ RD6-blast N0.334 และ Jasmine IR57514



รูปที่ 2 เจลอิเล็กโทรฟอริซิสของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ Jasmine IR57514 และ RD6-blast No.334 จำนวน 9 เครื่องหมาย ได้แก่ ก) RM212, ข) RM319 (ลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 1) ค) RM144, ง) RM254, จ) RM1233 (ลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 11), ฉ) R10783 indel (ลักษณะทนน้ำท่วมฉับพลัน), ช) Aromarker (ลักษณะความหอม), ซ) *Wx*-Glu-23 (ลักษณะข้าวเหนียว) และ ฌ) SNP2340-41 (ลักษณะอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ)

ตารางที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการคัดเลือกลักษณะเป้าหมาย ตำแหน่งยีน ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ สายพันธุ์ให้แอลลีลเป้าหมาย และขนาดแอลลีลเป้าหมายที่ใช้ในการคัดเลือก

Traits	Markers	Chromo-some	Type of markers	Parental contributor	Size of target alleles (bp)	
					Favorable alleles	Unfavorable alleles
1. Blast resistance	RM212	1	QTL Linked marker	RD6-blast No.334	~130	140
2. Blast resistance	RM319	1	QTL Linked marker	RD6-blast No.334	~130	140
3. Blast resistance	RM144	11	QTL Linked marker	RD6-blast No.334	240	~200
4. Blast resistance	RM1233	11	QTL Linked marker	RD6-blast No.334	175	180
5. Glutinous	*Wx*-Glu-23	6	Gene specific marker	RD6-blast No.334	196	173
6. Submergence tolerance	R10783 indel	9	Gene specific marker	Jasmine IR57514	330	350
7. Fragrance	Aromarker	8	Gene specific marker	Jasmine IR57514	392	400
8. Low gelatinization temperature	SNP2340-41	6	Gene specific marker	Jasmine IR57514	550, 458	550, 126

จากการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากยีนเป้าหมาย (gene specific markers) จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ R10783indel (*Sub1*: ลักษณะทนน้ำท่วมฉับพลัน, Toojinda et al., 2005) Aromarker (*badh2*: ลักษณะความหอม, Jantaboon et al., 2011) *Wx*-Glu-23 (*wx*: ลักษณะข้าวเหนียว, Wanchana et al., 2003) และ SNP2340-41 (*SSIIa-TT*: ลักษณะอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ Katengam et al., 2008) (ตารางที่ 1) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ Jasmine IR57514 และข้าวสายพันธุ์ RD6-blast No.334 ได้ ทั้งนี้เนื่องจากข้าวสายพันธุ์ RD6-blast No.334 มีลักษณะเมล็ดไม่มีกลิ่นหอม (*Badh2/Badh2*) ไม่ทนน้ำท่วมฉับพลัน (*sub1/sub1*) มีลักษณะข้าวเหนียว (wx/wx) และมีอุณหภูมิแป้งสุกเป็นเฮเทอโรไซกัส (*SSIIa-TT/GC*) ส่วนข้าวสายพันธุ์แม่ Jasmine IR57514 มีลักษณะเมล็ดมีกลิ่นหอม (*badh2/badh2*) ทนน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1/Sub1*) มีลักษณะข้าวเจ้าปริมาณอะไมโลสต่ำ (Wx^b/Wx^b) และมีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ (*SSIIa-TT/TT*) จึงทำให้แสดงความแตกต่างในลักษณะดังกล่าวได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 2)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (MAS) ในประชากร F_2

จากการผสมระหว่างข้าวสายพันธุ์ Jasmine IR57514 และข้าวสายพันธุ์ RD6-blast No.334

สามารถสร้างประชากร F_1 ได้จำนวน 11 ต้น จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร F_2 ได้จำนวน 300 ต้น ทำการคัดเลือกลักษณะลักษณะทางการเกษตรที่เหมาะสม ได้แก่ ทรงต้นแข็งแรง และการแตกกอดี ได้จำนวน 105 ต้น และทำการคัดเลือกลักษณะจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง/ใกล้ชิดกับลักษณะเป้าหมายที่ผ่านการคัดกรองว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่ได้ จำนวน 8 เครื่องหมาย (ตารางที่ 2) พบว่า สามารถคัดเลือกประชากร F_2 ที่มี QTLs ต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 11 ยีนควบคุมลักษณะทนทานน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*) ข้าวเหนียว (*wx*) ความหอม (*badh2*) และอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ (*SSIIa-TT*) ได้จำนวน 9 ต้น (ตารางที่ 3) ซึ่งต้นข้าว F_2 ที่ผ่านการคัดเลือกเหล่านี้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป้าหมายเป็นสายพันธุ์ผสม (heterozygous) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากขนาดประชากรที่ใช้ในการคัดเลือกในครั้งนี้มีขนาดเล็ก จึงทำให้ประชากรที่คัดเลือกได้มีลักษณะจีโนไทป์ของยีนเป้าหมายเป็นสายพันธุ์ผสม หากต้องการคัดเลือกลักษณะเป้าหมายให้ได้สายพันธุ์แท้ทุกตำแหน่ง ขนาดประชากรที่เหมาะสมคือ 4^8 = 65,536 ต้น (Sreewongchai et al., 2010) แต่ด้วยข้อจำกัดทางด้านงบประมาณและสถานที่จึงไม่สามารถทำการคัดเลือกโดยใช้ประชากรขนาดดังกล่าวได้ ประชากรที่ผ่านการคัดเลือกนี้จะถูกปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร F_3 และทำการคัดเลือกลักษณะเป้าหมายให้เป็นสายพันธุ์แท้ต่อไป

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการคัดเลือกลักษณะเป้าหมายต้องสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแอลลีลเป้าหมายของสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ได้ ดังนั้นการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์พ่อแม่ได้จึงเป็นขั้นตอนการดำเนินการที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นการระบุแอลลีลเป้าหมายที่ต้องการคัดเลือก และที่สำคัญเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกประชากรที่มีลักษณะเป้าหมายพร้อมๆ กันหลายลักษณะได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่าย รวมทั้งค่าแรงงานในการดำเนินการคัดเลือกลักษณะดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านั้นควรมีการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดตามยีนเป้าหมาย (markers validation) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสของความสำเร็จในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (สุรีพร, 2557)

การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้ชิดขนาบหัวท้ายกับ QTLs ลักษณะต้านทานโรคไหม้มาใช้ติดตามหรือผนวก QTLs ดังกล่าวเข้าสู่ประชากรข้าวเหนียวหอมนี้จำเป็นต้องมีการคัดกรองว่าเครื่องหมายดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้หรือไม่ และระยะทางระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและ QTLs ไม่ควรห่างกันเกิน 5 cM (Collard and Mackill, 2008) อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก QTLs ดังกล่าวจะประสบความสำเร็จได้นั้น QTLs ที่ใช้จะต้องได้รับการประเมินในต่างประชากร (genetic background) เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป้าหมาย สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับลักษณะต้านทานโรคไหม้ *qBl1* และ *qBl11* นั้นได้มีการทดสอบและนำไปใช้จนประสบความสำเร็จอย่างแพร่หลาย (ธีระวัช และคณะ, 2552; Sreewongchai et al., 2010; Wongsaprom et al., 2010)

ตารางที่ 3 ข้อมูลจีโนไทป์ของประชากร F_2 จำนวน 9 ต้น ที่ผ่านการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดกรองว่าแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่ได้ จำนวน 8 เครื่องหมาย

F_2 Pedigree	DNA Markers [1/]							
	QTLs linked markers				Gene specific markers			
	RM212 (*qBl1*)	RM319 (*qBl1*)	RM144 (*qBl11*)	RM1233 (*qBl11*)	R10783 (*Sub1*)	Aromarker (*badh2*)	Wx-Glu23 (*wx*)	SNP2340-41 (*SSIIa-TT*)
1. RGD07733-4-3	H	H	H	RD	H	H	H	H
2. RGD07733-4-5	H	H	H	H	H	H	H	H
3. RGD07748-2-4	H	H	H	RD	H	JIR	RD	H
4. RGD07748-2-5	H	H	H	H	H	JIR	RD	H
5. RGD07713-1-3	H	RD	H	RD	JIR	H	H	H
6. RGD07713-1-5	RD	H	RD	RD	H	H	H	H
7. RGD07713-1-6	RD	H	RD	H	H	H	H	H
8. RGD07713-1-7	H	RD	H	RD	H	JIR	H	H
9. RGD07713-1-10	H	H	H	RD	H	H	H	H
RD6-blast No.334	RD	RD	RD	RD	RD	RD	RD	H
Jasmine IR57514	JIR	JIR	JIR	JIR	JIR	JIR	JIR	JIR

หมายเหตุ: [1/]RD หมายถึง Homozygous alleles ของข้าวสายพันธุ์พ่อ RD6-blast No.334,
H หมายถึง heterozygous alleles ของข้าวสายพันธุ์พ่อ RD6-blast No.334 และ สายพันธุ์แม่ Jasmine IR57514,
JIR หมายถึง Homozygous alleles ของข้าวสายพันธุ์แม่ Jasmine IR57514

ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะทนทานน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*), ความหอม(*badh2*), ข้าวเหนียว (*wx*), และอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ(*SSIIa-TT*) นั้น เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว ดังนั้นจึงมีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนที่ทำการคัดเลือก ซึ่งพบว่าสามารถคัดเลือกลักษณะดังกล่าวได้อย่างแม่นยำ และมีการรายงานความสำเร็จของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวในประเทศไทยอย่างกว้างขวาง (Wanchana et al., 2003; Katengam et al., 2008; Wongsaprom et al., 2010; Katengam et al., 2011; Jantaboon et al., 2011)

สรุป

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกนั้น 1) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ต้องสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ 2) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ต้องมีความเชื่อมโยงกับลักษณะเป้าหมายที่ทำการคัดเลือก และควรผ่านการประเมินในต่างพันธุกรรมพื้นฐาน และ 3) การคัดเลือกโดยใช้ MAS นั้นต้องดำเนินการควบคู่ไปกับการคัดเลือกลักษณะฟีโนไทป์ ทั้งนี้เพื่อให้สายพันธุ์ข้าวที่พัฒนาปรับปรุงพันธุ์ มีลักษณะเป้าหมายที่ต้องการ มีทรงต้นและผลผลิตเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

เอกสารอ้างอิง

เชาวเลิศ ธีระอำพล, อรรถพล สุวรรณวงศ์ และจีรวัตน์ สนิทชน. (2550). ข้าวเหนียว กข 6 สายพันธุ์ต้านทานโรคไหม้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. ใน สัมมนาวิชาการเกษตร. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. น. 25-28.

ธีระวัช สุวรรณนวล, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, ธีระยุทธ ตู้จินดา, ปัทมา ศิริธัญญา และ จิรวัฒน์ สนิทชน. (2552). การรวมยีนต้านทานโรคไหม้เข้าสู่ข้าวพันธุ์ กข6 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วทท) ครั้งที่ 35 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่ออนาคตที่ดีขึ้น. น. 1-6.

สุรีพร เกตุงาม. (2557) การปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุล. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 308 น.

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุรีพร เกตุงาม. (2553). โรคไหม้และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. Thai Journal of Genetics 3: 106-119.

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง, ธีรยุทธ ตู้จินดา และสุรีพร เกตุงาม. (2555). การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการรวมยีนต้านทานโรคไหม้เข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง IR57514: การประเมินลักษณะทนน้ำท่วมเบื้องต้นของประชากร F3. แก่นเกษตร. 40(ฉบับพิเศษ): 417-423.

Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B 363: 557-572.

Hittalmani, S., Parco, A., Mew, T.V., Zeigler, R.S. and Huang, N. (2000). Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. Theoretical and Applied Genetics 100: 1121-1128

Jantaboon, J., Siangliw, M., Im-mark, S., Jamboonsri, W., Vanavichit, A., and Toojinda, T. (2011). Ideotype breeding for submergence tolerance and cooking quality by marker assisted selection in rice. Field Crops Research 123: 206–213.

Jin, L., Lu, Y., Shao, Y., Zhang, G., Xiao, P., Shen, S., Corke, H., and Bao, J. (2010). Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Cereal Science 51: 159–164.

Katengam, S., Kimchaiyong, W., Wanchana, S., and Toojinda T. (2008). Association analysis and functional marker developmant of soluble starch synthase IIa (*SSIIa*) and gelationization properties in Thai rice. In: Proceeding of the 5th International Crop Science Congress & Exhibition. Jeju: 1–4.

Katengam, S., Riabroy, K., Toojinda, T., and Kotchasatit, U. (2011). Conversion of wide adapted rice cultivar IR57514 into Jasmine-like cooking quality through marker assisted backcrossing. In: BIT's 2nd World DNA and Genome Day-2011, Reopen Bio-Gateway in Green Economy Era, April 25-30, 2011, Dalian World EXPO Center. China. p.286.

Manivong, P., Korinsak, S., Korinsak, S., Siangliw, J.L., Vanavichit, A., Toojinda, T. (2014). Marker-assisted selection to improve submergence tolerance, blast resistance and strong fragrance in glutinous rice. Thai Journal of Genetic 7: 110–122.

Noenplab, A., Vanavichit, A., Toojinda, T., Sirithunya, P., Tragoonrung, S., Sriprakhon, S. and Vongsaprom, C. (2006). QTL mapping for leaf and neck blast resistance in Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin recombinant inbred lines. Science Asia. 32: 133-142.

Ruengphayak, S., Chaichumpoo, E., Phromphan, S., Kamolsukyunyong, W., Sukhaket, W., Phuvanartnarubal, E., Korinsak, S., Korinsak, S., Vanavichit, A. (2015). Pseudo-backcrossing design for rapidly pyramiding multiple traits into a preferential rice variety. Rice 8: 7DOI 10.1186/s12284-014-0035-0

Romyen, P., Hanviriyapant, P., Rajatasereekul, S., Khunthasuvon, S., Fukai, S., Basnayake, J., and Skulkhu, E. (1998). Lowland rice improvement in northern and northeast Thailand: 2. Cultivar differences. Field Crops Research 59: 109-119.

Singh, V.K., Singh, A., Singh, S.P., Ellur, R.K., Choudhary, V., Sarkel, S., Singh, D., Krishnan, S.G., Nagarajan, M., Vinod, K.K., Singh, U.D., Rathore, R., Prashanthi, S.K., Agrawal, P.K., Bhatt, J.C., Mohapatra, T., Prabhu, K.V., Singh, A.K. (2012). Incorporation of blast resistance into “PRR78”, an elite Basmati rice restorer line, through marker assisted backcross breeding. Field Crops Research 128: 8–16.

Sreewongchai, T., Toojinda, T., Thanintorn, N., Kosawang, C., Vanavichit, A., Tharreau, D., and Sirithunya, P. (2010). Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs. Plant Breeding 129: 176-180.

Toojinda, T., Tragoonrung, S., Vanavichit, A., Siangliw, J.L., Pa-tn, N., Jantaboon, J., Siangliw, M., and Fukai, S. (2005). Molecular breeding for rainfed lowland rice in the Mekong region. Plant Production Science 8: 330-333.

Wanchana, S., Toojinda, T., Tragoonrung S., and Vanavichit., A. (2003). Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinuous rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science 165: 1193–1199.

Wongsaprom, C., Sirithunya, P., Vanavichit, A., Pantuwan, G., Jongdee, B., Sidhiwong, N., Siangliw, J.L., and Toojinda, T. (2010). Two introgressed quantitative trait loci confer a broad-spectrum resistance to blast disease in the genetic back ground of the cultivar RD6, a Thai glutinous jasmine rice. Field Crops Research 119: 245-251.

www.gramene.org. Accessed 19 Jan. 2011.

Yi, M., Nwe, K.T., Vanavichit, A., Chai-arree, W., and Toojinda, T. (2009). Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. Field Crops Research 113: 178–186.

❑❑❑❑❑