

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง
(Cassava Mosaic Disease)
Marker-Assisted Selection for Resistance to Cassava Mosaic Disease in
Manihot esculenta Crantz

จิราพร แก่นทรัพย์^{1/*} สุวลักษณ์ อะมะวัลย์^{2/} ประพิศ วงเทียม^{3/} อรุณทัย ชาววา^{1/}
สุภาวดี จ้อเหรียญ^{1/} ดนัย นาคประเสริฐ^{1/} จินณจาร์ หาญเศรษฐสุข^{2/}
Jeeraporn Kansup^{1/} Suwaluk Amawan^{2/} Prapit Wongtiem^{3/} Aroonothai Sawwa^{1/}
Suphawadee Ngorian^{1/} Danai Narkprasert^{1/} Jinnajar Hansethasuk^{2/}

Received 2 Sep 2019/Revised 24 Oct 2019/Accepted 7 Nov 2019

ABSTRACT

Cassava Mosaic Disease (CMD) is a very important disease that causes severe damage to cassava production. The objective of this research was to select cassava varieties resistant to CMD by using molecular markers. Two hundred and fifty varieties from Rayong Field Crops Research Center were collected and examined using molecular markers in the laboratory of Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture from October 2017 to September 2019. In this research, three groups of molecular markers were used in selection for resistance to CMD. Group 1 included 4 Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) and Simple Sequence Repeat markers (SSR), namely RME1, NS158, SSRY28 and NS169 which are flanking nearby the CMD resistance locus called *CMD2*. Group 2 consisted of 2 molecular markers, namely EST-LRR and *NB-ARC domains-containing disease resistance protein* (EST-R protein) and *EST-Protein kinase superfamily protein* (EST-Kinase) which were obtained from the expressed sequence tags of genes in response to cassava mosaic virus, the cause of CMD. Group 3 contained 3 positions of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers in *Peroxidase* gene, namely Ex2-78, Ex2-157 and Ex3-128. In total, 9 molecular markers were used to search for cassava varieties showing DNA band patterns and nucleotide sequences similar to those of the CMD resistant variety named TME3. Results of the experiment revealed that there were 2 varieties that showed the same DNA band patterns and nucleotide sequences as TME3 in all 9 molecular markers, namely MMAL63 and CMR23-149-59. These varieties may be resistant to CMD. However, it is necessary to test their resistance against the actual cassava mosaic virus before using them in the variety development scheme, and propagate for farmers.

Keywords : Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Cassava mosaic disease (CMD), Marker-assisted selection

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

^{2/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร อ.เมืองระยอง จ.ระยอง 21150

^{3/} สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, A.Thanyaburi, Pathumthani, 12110

^{2/} Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture, A.Muang Rayong, Rayong, 21150

^{3/} Expert Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900

* Corresponding author: jkansupthdoa@gmail.com

บทคัดย่อ

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava Mosaic Disease ;CMD) เป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิตมันสำปะหลังเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ทำการทดสอบกับเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวนทั้งสิ้น 250 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่ห้องปฏิบัติการของสำนักงานวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตร ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 3 กลุ่ม ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง กลุ่มที่ 1 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR) และเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat, SSR) ที่ชนาปช้าง อยู่ใกล้กับโลคัสต้านทานโรคใบด่างชื่อ CMD2 จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28 และ NS169 กลุ่มที่ 2 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่คณะผู้วิจัยประยุกต์จากชิ้นส่วนยีนที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคใบด่างจำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ EST-LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein (EST-R protein) และ EST-Protein kinase superfamily protein (EST-Kinase) กลุ่มที่ 3 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ในยีน Peroxidase จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 รวมทั้งสิ้น 9 เครื่องหมายเพื่อค้นหาพันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทานโรคใบด่างพันธุ์ TME3 ผลการทดสอบพบว่า มีพันธุ์มันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ พันธุ์ MMAL63 และ CMR23-149-59 ทั้ง 2 พันธุ์นี้อาจมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง อย่างไรก็ตามมีความจำเป็น

ที่จะต้องนำพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไปทำการทดลองกับเชื้อสาเหตุโรคจริง ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง, โรคใบด่างมันสำปะหลัง, การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยมีพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดประมาณ 8.7 ล้านไร่ ปลูกมากเป็นอันดับที่ 3 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรียและประเทศคองโก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังมูลค่า 98,504 ล้านบาทโดยสินค้าที่ส่งออกมากที่สุด คือ แป้งมันสำปะหลัง มูลค่า 44,590 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2562) ปัญหาการลดลงของผลผลิตมันสำปะหลังสาเหตุหนึ่ง เนื่องจาก โรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อไวรัส Cassava mosaic virus (CMV) โดยมีแมลงหริ่งขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะนำโรค พบการแพร่ระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังในประเทศทางแอฟริกา เช่น ยูกันดา แทนซาเนีย และมาดากัสการ์ (Legg and Thresh, 2000) ส่วนในทวีปเอเชีย พบการระบาดในประเทศอินเดียและประเทศศรีลังกา ปัจจุบันนี้เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ประเทศกัมพูชา และประเทศเวียดนาม รวมถึงประเทศไทยซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ SriLankan (SLCMV) มันสำปะหลังที่เป็นโรคนี้อาจแสดงอาการ ใบด่างจนถึงเหลือง ใบเสียรูปทรง ต้นเตี้ย ลำต้นแคระแกร็น และทำให้ผลผลิตลดลงมากกว่า 80% ซึ่งกรมวิชาการเกษตรกำหนดแนวทางป้องกันแก้ไขและเฝ้าระวังโรคใบด่างมันสำปะหลังอย่างใกล้ชิด (ภูวนาดและคณะ, 2561) การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยใช้เครื่องหมาย

โมเลกุลเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการเกิดปัญหาโรคใบด่างมันสำปะหลังได้

Akano *et al.*, (2002) รายงานว่าตำแหน่งบนโครโมโซมโลคัส *CMD2* เป็นโลคัสเดี่ยวและเป็นตัวหลักลักษณะเด่น (a monogenic, dominant locus) ที่ควบคุมความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าโลคัส *CMD2* มียีนชนิดใดบรรจุอยู่ ซึ่งโลคัส *CMD2* มาจากมันสำปะหลังพันธุ์ TME3 และมีการพบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ และเอสเอสอาร์ที่ขนานข้างอยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28 และ NS169 โดยมีตำแหน่งบนโครโมโซมห่างจากโลคัส *CMD2* เป็นระยะทาง 4, 7, 9 และ 16 เซนติเมอร์แกน ตามลำดับ (Akano *et al.*, 2002; Lokko *et al.*, 2005; Fregene *et al.*, 2006; Okogbenin *et al.*, 2007) มีรายงานความสำเร็จในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง (Ribeiro *et al.*, 2012; Carmo *et al.*, 2015) ขณะที่ Wolfe *et al.*, (2016) รายงานตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ในยีน *Peroxidase* (Cassava4.1__029175) ที่ให้ความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต้านทานกับกลุ่มพันธุ์ที่อ่อนแอกว่า จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78 (Exon2 นิวคลีโอไทด์ที่ 78), Ex2-157 (Exon2 นิวคลีโอไทด์ที่ 157) และ Ex3-128 (Exon3 นิวคลีโอไทด์ที่ 128)

จากฐานข้อมูล NCBI รายงานชิ้นส่วนยีนของมันสำปะหลังที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV ได้แก่ ยีน *LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein* และ ยีน *Protein kinase superfamily protein* ซึ่งยีน *LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein* เมื่อถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะทำหน้าที่ในการรับรู้เชื้อโรค (Recognition) และส่งสัญญาณกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงาน (Van Ooijen *et al.*, 2008) สำหรับยีน *Protein*

kinase superfamily protein เมื่อถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เติมหมู่ฟอสเฟตให้โมเลกุลของโปรตีนต่าง ๆ (Protein phosphorylation) ซึ่งมีรายงานว่า โปรตีนไคเนสเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์หลังจากการรับรู้เชื้อโรคของพืช (Romeis, 2001) งานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว มาใช้ในการคัดเลือกรุ่นมันสำปะหลังพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อค้นหาพันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง ซึ่งพันธุ์ที่คัดเลือกได้จะเป็นพันธุ์ candidate ที่อาจมีความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง

ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่จะนำมาคัดเลือก โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวนทั้งสิ้น 250 พันธุ์ (Table 1) โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์ ใบมันสำปะหลังจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการทดลองนี้ได้ใช้พันธุ์ KU50 เป็น negative control เนื่องจาก พันธุ์ KU50 มีพิโนทบีที่อ่อนแอต่อโรคใบด่างมันสำปะหลังตามรายงานของ Bi *et al.*, (2010) การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อหาพันธุ์ candidate ต้านทานโรคใบด่าง ได้ดำเนินการในบึงบประมาณ 2561 จำนวน 100 พันธุ์ และในบึงบประมาณ 2562 จำนวน 150 พันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากส่วนยอด จากต้นมันสำปะหลังอายุ 12 เดือน มาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB (cetyltri methylammonium bromide) นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Biodrop (UK) จากนั้น นำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ต่อไป

Table 1 List of 250 cassava varieties examined using molecular markers

No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety
1	Kaset Lophuri	33	CMR36-55-166	65	CMR50-41-1	97	MCOL 2306	129	CM681-2	161	CMK23-27-30	193	CMR33-18-101
2	Rayong1	34	CMR37-18-189	66	CMR50-73-6	98	MCOL 2016*	130	CMR25-82-88	162	56/5	194	CMR31-06-104
3	Rayong2	35	CMR37-18-201	67	OMR50-13-26	99	MCOL 1890	131	CMR34-44-40	163	CMR23-126-17	195	CMR36-25-67
4	Rayong3	36	CMR38-125-77	68	CMR51-04-42	100	MBRA18	132	CMK23-67-313	164	CMR23-149-59	196	CMR34-79-152
5	Rayong5	37	CMR41-42-3	69	CMR51-13-14	101	MCOL22	133	CMR23-17-276*	165	CM781-2	197	CMR36-71-27
6	Rayong7	38	CMR41-109-72	70	CMR51-23-14	102	MENTEGA	134	CM3299-22	166	CMR25-32-502Q	198	CMR23-17-51
7	Rayong9	39	CMR41-112-21	71	CMR51-34-6	103	NEP HONGHA	135	CM6125-125	167	CMR23-102-65	199	CM323-375
8	Rayong11	40	CMR42-01-2	72	CMR51-43-69	104	YOLK	136	CM342-55	168	CMR23-149-128	200	Monoton
9	Rayong 86-13	41	CMR42-44-98	73	CMR53-87-20	105	297	137	01-77-1	169	CMR25-33-134Q	201	MCOL 198
10	Rayong60	42	OMR42-16-37	74	CMR53-106-24	106	298	138	CMR28-05-13	170	(V3 x R) 21-16	202	MCOL 32
11	Rayong72	43	CMR43-08-89	75	OMR53-03-6	107	315	139	CMC84	171	CM4777-2 (ciat)	203	MCOL 2360
12	Rayong90	44	CMR44-03-57	76	Manop	108	456	140	CMR23-149-117	172	SC8	204	MBRA 781
13	KU50	45	CMR44-29-12	77	Soidao	109	CM125-22	141	CMH22-77-1	173	CMR23-26-2	205	MPAR 75
14	KU72	46	OMR44-23-34	78	GR 891	110	CM6125-117	142	CMR26-65-13	174	(V1 x R) 21-8	206	MMEX 92
15	KU75	47	OMR45-27-76	79	KATEH	111	CMR30-05-12	143	CMR31-19-14	175	CMR25-104-42	207	MVEN 164
16	HB60	48	CMR46-30-264	80	KM98-1	112	CMR23-117-4	144	CMR32-24-20	176	SR18-127	208	MCUB8
17	HB80	49	CMR46-31-7	81	MBRA12	113	CM407-30	145	SM937-8	177	CMR26-38-7	209	MIND4
18	Pirun1	50	CMR46-47-137	82	MCOL 912B	114	CMR35-26-369	146	CMR25-34-112	178	CMR24-14-183	210	MARG9
19	Pirun2	51	CMR46-55-23	83	MCOL 1098	115	CM3306-3	147	CMR23-20-23Q	179	CMR25-24-384	211	MPAR 51
20	CM3299-15	52	CMR47-02-9	84	MCUB23	116	CMR25-32-429Q	148	Variegated	180	MMEX 59*	212	MPAR 38
21	CR19	53	CMR47-30-8	85	MECU72	117	CMR26-65-192	149	CMR23-126-122	181	CMR30-238-34	213	MBRA 233
22	SM2277-23	54	CMR48-20-17	86	MMAL63	118	CMR23-126-161	150	CMR31-37-105	182	Yellow root	214	MCUB 40
23	CMR26-08-61	55	CMR48-35-1	87	MPER325	119	CMR23-149-118	151	CMR26-08-61	183	V.30	215	MPER 489
24	OMR26-14-9	56	CMR48-53-48	88	MVEN 297A	120	CMR25-38-157Q*	152	(V3 x R) 20-15	184	CMR25-30-194Q	216	MECU 41
25	OMR29-20-118	57	CMR49-22-227	89	NANZHI 199	121	29-77-19	153	(V3 x R) 20-10	185	CMK23-70-3	217	MVEN 174
26	CMR30-71-25	58	CMR49-54-10	90	SC5	122	CMR28-72-131	154	CMR25-55-28*	186	CMR23-84-8	218	CG7-64
27	CMR31-42-20	59	CMR49-54-67	91	SC201	123	SMH22-03-1	155	Sriracha1	187	CMR23-51-10	219	R3S1__1
28	CMR32-94-121	60	CMR49-89-70	92	YOD KHAM	124	CMR23-113-14	156	CMR31-06-103	188	SV25-21-1	220	R5S1__7
29	CMR33-38-48	61	CMR50-20-2	93	MCOL 1752	125	CM4049 UJ	157	CMR25-105-47	189	Variegated (green)	221	MCOL 1684
30	CMR35-21-199	62	CMR50-20-114	94	MPER183	126	CMR23-149-67	158	CMR23-107-4	190	CMC72	222	MCOL 22
31	CMR35-22-348	63	CMR50-30-23	95	HANATEE	127	CMH22-04-1Q	159	CMR24-89-65	191	CMR35-26-303	223	MECU 71
32	CMR35-112-1	64	CMR50-34-80	96	BATHANG	128	29-77-5	160	CM3299-14	192	CMR33-35-69	224	MNGA1

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ และเอสเอสอาร์ จากรายงานวิจัยของ Carmo *et al.*, (2015) สำหรับลำดับเบสไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสที คณะผู้วิจัยประยุกต์ขึ้นจากข้อมูลลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV ซึ่งสืบค้นจากฐานข้อมูล NCBI โดย EST-R protein รหัสในฐานข้อมูล คือ dbESTId 77982922 GenBank Acc JZ167361 และ EST-Kinase รหัสในฐานข้อมูล คือ dbESTId 77982924 GenBank Acc JZ167363 จากนั้น สังเคราะห์ไพรเมอร์ จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ (Table 2)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังพันธุ์ที่นำมาคัดเลือกจำนวน 250 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ต้านทานชื่อ TME3 โดยใช้ Taq DNA Polymerase,

recombinant (Thermo Scientific, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 1X Taq buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 mM สำหรับ dNTP แต่ละชนิด, 0.4 M forward primer, 0.4 M reverse primer, 1.5 mM MgCl_2 , Taq DNA Polymerase 1U ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ จากนั้น นำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรม อุณหภูมิ Pre-denaturation 94°C. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94°C. 40 วินาที, Annealing 55-56°C. 40 วินาที, Extension 72°C. 30-60 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°C. 5 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA)

Table 2 Sequence of primers SCAR, SSR, and EST markers which were used in assisted selection for resistance to Cassava Mosaic Disease (CMD)

Primer name	Marker type	Sequence	Annealing temperature (°C)	Extension time per cycle (sec)	Expected allele size (bp)
RME1	SCAR	F : ATGTTAATGTAATGAAAGAGC R : AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT	56	60	700
NS158	SSR	F : GTGCGAAATGGAAATCAATG R : TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA	55	30	166
SSRY28	SSR	F : TTGACATGAGTGATATTTCTTGAG R : GCTGCGTGCAAACTAAAT	55	30	180
NS169	SSR	F : GTGCGAAATGGAAATCAATG R : GCCTTCTCAGCATATGGAGC	55	30	319
EST-R	EST	F : TGAGAAGGGAAATCGCAGGA R : GAGGACTTCAACCATGCCAT	55	60	500
EST-K	EST	F : ACTTGCTCATGGCCATGCTC R : CAGAGCCTTGTTCTGAAGAAG	55	60	600

3. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

ใช้เทคนิค Pyrosequencing ซึ่งเป็นการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์โดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอและอาศัยการตรวจจับ pyrophosphate ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก nucleotide triphosphate ในระหว่างการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (มณฑล, 2554) ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase 3* ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 จำนวน 7 เส้น (Table 3) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังพันธุ์ candidate ที่อาจจะเป็นพันธุ์ต้านทานโรค CMD จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R protein และ EST-Kinase เรียบร้อยแล้ว เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังพันธุ์ต้านทาน TME3 โดยใช้ชุด PyroMark PCR (Qiagen, Germany) ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1XPyroMark PCR Master Mix, 1X Coral Load Concentrate,

0.2 M forward primer, 0.2 M reverse primer (biotin label) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ จากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation 95°C. 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94°C. 30 วินาที, Annealing 56-62°C. 30 วินาที, Extension 72°C. 30 วินาที จำนวน 45-50 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°C. 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA) จากนั้น นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เหลือไปเข้าเครื่องหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen, Germany) โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป PyroMark Q48 Advance Reagents (Qiagen, Germany) ซึ่งสามารถบอกลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาได้

Table 3 Sequence of the primers of SNP markers which were used in Pyrosequencing assay

SNP point	Primer name	Sequence	Purpose
Exon2 (78/157)	Ex2__78-157FP	GTAGCTGTTTGCAGGGATGTGAC	DNA amplification
	Ex2__78-157RPB : Biotin label	TTGAAACTGCATCTCGAGCTACTA	
Ex2-78	Ex2__78SP	TCCCAAACCAAACCT	Sequencing
Ex2-157	Ex2__157SP	TCTTGCGCTGATACC	Sequencing
Exon3 (128)	Ex3__128FP	CCATCTCCTTTTGCCAACATAA	DNA amplification
	Ex3__128RPB : Biotin label	ACAAGGTCCTTAACATTTAAACCC	
Ex3-128	Ex3__128SP	CTTAAACAAAATTTTGCTG	Sequencing

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ชนิดเอสเอสอาร์ และชนิดอีเอสที

พันธุ์มันสำปะหลัง candidate ที่ต้านทานต่อไวรัสโรคใบด่าง จะต้องแสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ทั้งในเครื่องหมายโมเลกุล RME1 และ NS158 เป็นอย่างน้อย เนื่องจากมีรายงานว่า 2 เครื่องหมายโมเลกุลนี้อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดเป็นลำดับที่ 1 และ 2 โดยมีระยะห่าง 4 และ 7 เซนติเมอร์แกน ตามลำดับ (Carmo *et al.*, 2015) ขณะที่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50) ที่ใช้เป็น negative control มีรายงานว่าแสดงฟีโนไทป์อ่อนแอต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง เมื่อใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในการถ่ายโคลนไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเข้าสู่ใบมันสำปะหลังหรือเรียกว่าวิธี Agro-inoculation (Bi *et al.*, 2010) จากผลการทดลองพบว่า พันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับพันธุ์ต้านทาน TME3 และมีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์ต้านทานรวมทั้งสิ้น 14 พันธุ์ โดยพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปีงบประมาณ 2561 ได้แก่ MMAL63, พิรุณ2, MBRA18, ระยอง11, CMR49-22-227, CMR49-54-10 และ CMR49-54-67 (Figure 1) พันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปีงบประมาณ 2562 ได้แก่ CMR 23-149-59, MNGA 1, CMR 33-35-69, CMR 28-05-13, CM 4574-7, MECU 71 และ 01-77-1 (Figure 2) ซึ่ง CIAT (2007) รายงานว่า พันธุ์ MNGA1 แสดงฟีโนไทป์ต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ Indian (ICMV) พันธุ์ MECU 71 และ CM 4574-7 ได้รับคัดเลือกให้เป็นพันธุ์ candidate เนื่องจาก มีรายงานในต่างประเทศ

ว่าพันธุ์ MECU 71 และ CM 4574-7 แสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรค CMD (unpublished data) โดยทั้ง 2 พันธุ์นี้ แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในเครื่องหมายโมเลกุล RME1 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดด้วย

พันธุ์ 01-77-1 ได้รับคัดเลือกให้เป็นพันธุ์ candidate เนื่องจาก เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R protein จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 530 bp แตกต่างจากพันธุ์อื่น ๆ รวมทั้งแตกต่างจากพันธุ์ต้านทาน TME3 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp (Figure 2, EST-R) ซึ่งวิเคราะห์ได้ว่า พันธุ์ 01-77-1 มีลำดับดีเอ็นเอของยีน *LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein* ทำให้มีความเป็นไปได้ที่พันธุ์ 01-77-1 นี้จะมีลักษณะความต้านทานโรค CMD แตกต่างจากพันธุ์อื่น

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล EST-Kinase เมื่อนำมาทดสอบจีโนไทป์ของมันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ไม่ปรากฏความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลได้เป็น 2 ข้อ ดังนี้ ข้อที่ 1 ความต้านทานโรค CMD อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Protein kinase superfamily protein* ที่ทำการทดสอบ หรือ ข้อที่ 2 ความต้านทานโรค CMD อาจมีความเกี่ยวข้องกับยีน *Protein kinase superfamily protein* ที่ทำการทดสอบแต่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทาน และพันธุ์อ่อนแอในระดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้ด้วยขนาดของแถบดีเอ็นเอ ต้องทำการหาลำดับดีเอ็นเอ จึงจะสามารถเห็นความแตกต่างได้

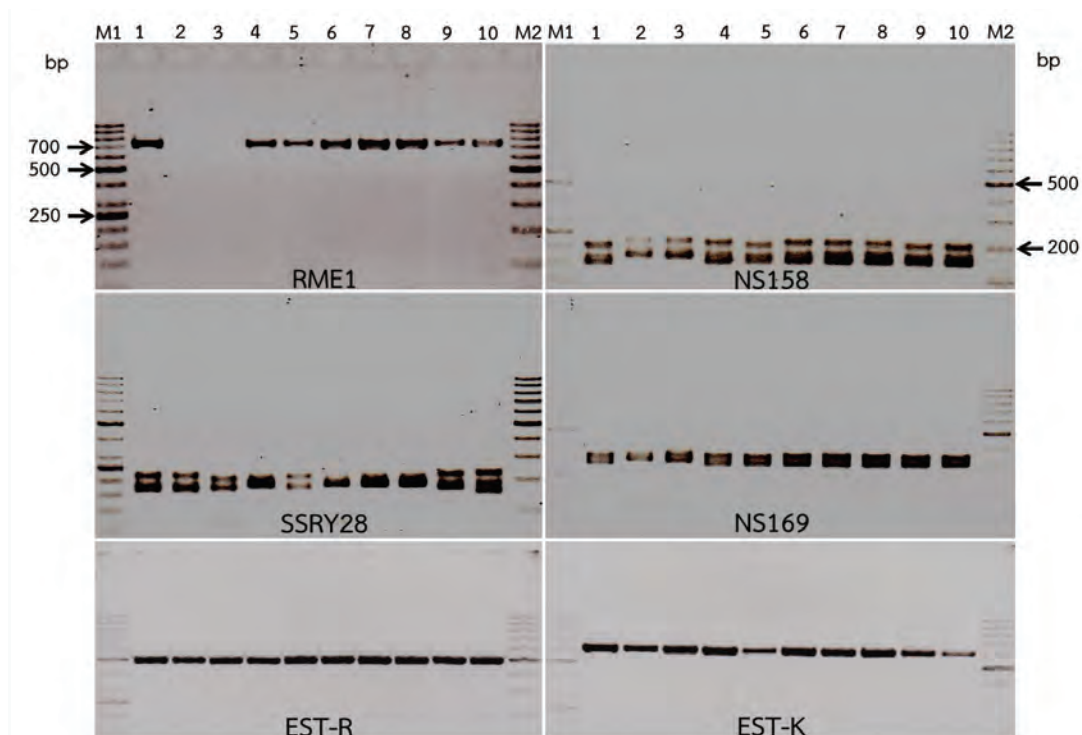


Figure 1 Molecular marker analysis of cassava varieties in 2018 using RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R and EST-K. Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = TME3 (resistant), Lane 2 = KU 50 (susceptible, negative control), Lane 3 = MCUB 23 (negative control), Lane 4 = Rayong 11, Lane 5 = Pirun 2, Lane 6 = CMR 49-22-227, Lane 7 = CMR 49-54-10, Lane 8 = CMR 49-54-67, Lane 9 = MMAL 63, Lane 10 = MBRA 18, Lane M2 = 100 bp DNA Ladder

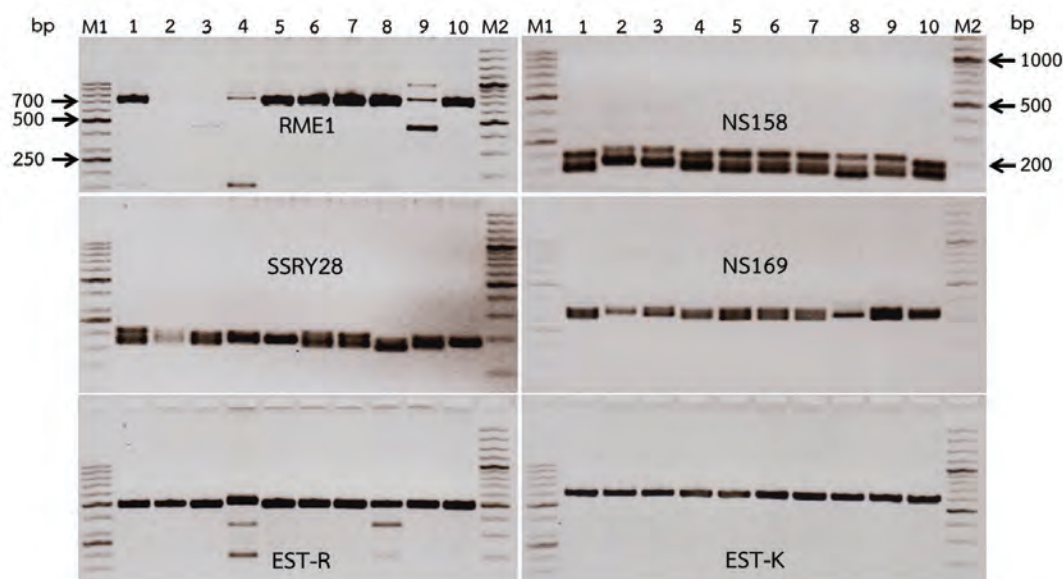


Figure 2 Molecular marker analysis of cassava varieties in 2019 using RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R and EST-K. Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = TME3 (resistant), Lane 2 = KU 50 (susceptible, negative control), Lane 3 = MCUB 23 (negative control), Lane 4 = 01-77-1, Lane 5 = CMR28-05-13, Lane 6 = CMR23-149-59, Lane 7 = CMR33-35-69, Lane 8 = MECU 71, Lane 9 = MNGA 1, Lane 10 = CM 4574-7, Lane M2 = 100 bp DNA Ladder plus

2. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

จากการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ประกอบด้วย Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค CMD (Wolfe *et al.*, 2016) ในพันธุ์ candidate 14 พันธุ์ ที่มีความเป็นไปได้ที่อาจจะเป็นพันธุ์ต้านทานโรค CMD จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R protein และ EST-Kinase

เรียบร้อยแล้ว โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 พบว่า พันธุ์ MMAL63, ระยอง 11, CMR49-22-227, CMR 23-149-59, MNGA 1, CMR 28-05-13 และ MECU 71 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ณ ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปทั้ง 3 ตำแหน่ง โดยตำแหน่ง Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบโฮโมไซกัส GG, TT และ TT ตามลำดับ (Table 4)

Table 4 Genotype of SNP markers in *Peroxidase* gene using Pyrosequencing assay SNP Markers

Cassava variety	SNP Markers		
	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
TME3	GG	TT	TT
KU 50	GG	TT	TT
MCUB 23	GA	TT	CT
MMAL 63	GG	TT	TT
Pirun 2	GA	TT	CT
MBRA 18	GA	TT	CT
Rayong 11	GG	TT	TT
CMR 49-22-227	GG	TT	TT
CMR 49-54-10	GG	TT	CT
CMR 49-54-67	GG	TT	CT
CMR 23-149-59	GG	TT	TT
MNGA 1	GG	TT	TT
CMR 33-35-69	GG	TT	CT
CMR 28-05-13	GG	TT	TT
CM 4574-7	GG	TT	CT
MECU 71	GG	TT	TT
01-77-1	GG	TT	CT

ผลการทดลองโดยรวมของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า พันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ทั้งในเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 1 ซึ่งขนานข้างอยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* และเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 2 ที่ประยุกต์มาจาก Expressed sequence tag (EST) ของชิ้นส่วนยีนที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV รวมทั้งมี

ลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ณ ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นชนิดสนิป รวมทั้งสิ้น 9 เครื่องหมายโมเลกุล (Table 5) มีจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ MMAL 63 และ CMR 23-149-59 อย่างไรก็ตามสำหรับพันธุ์ CMR 23-149-59 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล NS158 ที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* เป็นลำดับที่ 2 ได้แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความ

ใกล้เคียงกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในช่วงขนาดแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับ ความต้านทานโรค ได้แก่ 166 bp (Carmo *et al.*, 2015) แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่น ที่ตำแหน่ง บนสุดปรากฏมาด้วย (Figure 2) และจากการ

ทดลอง พบว่า พันธุ์ MCUB 23 มีจีโนมที่แตกต่าง จากพันธุ์ต้านทาน TME 3 แต่ใกล้เคียงกับพันธุ์ KU 50 (พันธุ์อ่อนแอ) ทั้ง 4 เครื่องหมาย ดังนั้น ในการ ศึกษาคัดเลือกพันธุ์ต้านทานครั้งต่อไปอาจนำเอา พันธุ์ MCUB 23 มาใช้เป็น negative control ได้

Table 5 Summary of genotype of cassava varieties compared with the resistant variety TME3

Variety	SCAR and SSR markers				EST markers		SNP markers		
	RME1	NS158	SSRY28	NS169	EST-R	EST-K	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
TME 3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
KU 50	×	×	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓
MCUB 23	×	×	×	×	✓	✓	×	✓	×
MMAL 63	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Pirun 2	✓	✓	×	✓	✓	✓	×	✓	×
MBRA 18	✓	✓	×	✓	✓	✓	×	✓	×
Rayong 11	✓	✓*	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CMR 49-22-227	✓	✓*	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CMR 49-54-10	✓	✓*	×	✓	✓	✓	✓	✓	×
CMR 49-54-67	✓	✓*	×	✓	✓	✓	✓	✓	×
CMR 23-149-59	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MNGA 1	✓*	✓*	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CMR 33-35-69	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×
CMR 28-05-13	✓	✓*	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CM 4574-7	✓	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	×
MECU 71	✓	×	×	×	✓*	✓	✓	✓	✓
01-77-1	✓*	✓	×	✓	×	✓	✓	✓	×

✓ : showing DNA band patterns or nucleotide sequences similar to those of the resistant variety TME3

✓* : showing the same DNA band patterns as TME3 in the DNA band size reported to be associated with disease resistance, but the other size of DNA band also appeared

×

มันสำปะหลังพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการใช้ เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ ถึงแม้ว่าแสดงแถบ ดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ ต้านทาน TME3 การทดสอบพีโนไทป์ลักษณะ ความต้านทานโรคใบด่าง CMD กับเชื้อโรคจริง เป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญ เนื่องจาก

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสก็อต และเอสเอสอาร์ อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* แต่ไม่ได้อยู่บนยีน ทำให้ เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวแสดงถึงเพียงความ เป็นไปได้ที่อาจมียีนต้านทานโรคอยู่ในพันธุ์นั้น ๆ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำพันธุ์ที่ได้จาก การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแล้วไป

ทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

สรุปผลการทดลอง

เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 9 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSR28, NS169, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างได้ โดยพบพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ และลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับพันธุ์ต้านทาน TME3 จำนวน 14 พันธุ์ ซึ่ง 2 ใน 14 พันธุ์นี้มีแสดงแถบดีเอ็นเอ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ พันธุ์ MMAL63 และ CMR23-149-59 อย่างไรก็ตามการทดสอบความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังของพันธุ์ candidate ในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรคเป็นสิ่งจำเป็น หากตรวจสอบพบว่า พันธุ์ที่คัดเลือกได้แสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังก็จะสามารถแก้ปัญหาการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังและลดการสูญเสียผลผลิตรวมถึงรายได้ของเกษตรกรได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.เฉลิมพล ภูมิไชย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใบมันสำปะหลังพันธุ์ TME3 สำหรับนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบในการคัดเลือกพันธุ์ และขอขอบคุณข้าราชการ พนักงานราชการ พนักงานอัตราจ้างของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ที่กรุณาให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทำให้การทดลองดำเนินไปได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- มณฑล เลิศวรปรีชา. 2554. Pyrosequencing :วิธีการใหม่สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการประยุกต์ในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 หน้า 111 – 118.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2561. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. ISSN 0857 6610. 186 หน้า.
- ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศปี 2561. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISSN 0858 2327. 143 หน้า.
- Akano, A.O., A.G.O. Dixon, C. Mba, E. Barrera and M. Fregene. 2002. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theor. Appl. Genetics*. 105: 521-525.
- Bi, H., M. Aileni and P. Zhang. 2010. Evaluation of cassava varieties for cassava mosaic disease resistance jointly by agro-inoculation screening and molecular markers. *Afr. J. Plant Sci*. 4: 330-338.
- Carmo, C.D., M.S. Silva, G.A.F. Oliveira and E.J. Oliveira. 2015. Molecular-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta* Crantz. *Sci. Agric*. 72(6): 520-527.

- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2007. Cassava Research and Development in Asia: Exploring New Opportunities for an Ancient Crop. Proc. 7th Regional Workshop, held in Bangkok, Thailand. Oct 28- Nov 1, 2002. 668 p.
- Fregene, M., N. Morante, T. Snchez, J. Marin, C. Ospina, E. Barrera, J. Gutierrez, J. Guerrero, A. Bellotti, L. Santos, A. Alzate, S. Moreno and H. Ceballos. 2006. Molecular markers for introgression of useful traits from wild *Manihot* relatives of cassava, marker-assisted selection (MAS) of disease and root quality traits. *J. Root. Crops*. 32: 1-31.
- Lokko, Y., E.Y. Danquah, S.K. Offei, A.G.O. Dixon and M.A. Gedil. 2005. Molecular markers associated with a new source of resistance to the cassava mosaic disease. *Afr. J. Biotechnol.* 4 (9): 873-881.
- Okogbenin, E., M.C.M. Porto, C. Egesi, C. Mba, E. Ospinosa, L.G. Santos, C. Ospina, J. Marin, E. Barera, J. Gutierrez, I. Ekanayake, C. Iglesias and M. Fregene. 2007. Marker aided introgression of CMD resistance in Latin American germplasm for genetic improvement of cassava in Africa. *Crop. Sci.* 47: 1895-1904.
- Ribeiro, P.F., R. Akromah and J. Manu-Aduening. 2012. Using marker assisted selection to hasten screening of cassava cultivars developed through introgression of Cassava Mosaic Disease (CMD) resistance into cassava landraces in Ghana. *J. Agr. Sci. Tech. B* 2: 74-80.
- Romeis, T. 2001. Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4: 407-414.
- Van Ooijen, G., G. Mayr, M.M.A. Kasiem, M. Albrecht, B.J.C. Cornelissen and F.L.W. Takken. 2008. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *J. Exp. Bot* 59(6): 1383-1397.
- Wolfe, M. D., I. Y. Rabbi, C. Egesi, M. Hamblin, R. Kawuki, P. Kulakow, R. Lozano, D. P. D. Carpio, P. Ramu, and J. Jannink. 2016. Genome-Wide Association and Prediction Reveals Genetic Architecture of Cassava Mosaic Disease Resistance and Prospects for Rapid Genetic Improvement. *Plant Genome* 9. doi:10.3835/plantgenome2015.11.0118