

Thiết lập quy trình PCR nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng bệnh khảm lá khoai mì (*Manihot esculenta* Crantz)

Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa, Nguyễn Thị Kim Thoa,
Nguyễn Thị Thanh Thảo và Nguyễn Xuân Dũng*

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bệnh khảm lá khoai mì (*Cassava mosaic disease - CMD*) là một trong những dịch hại gây tổn thất nghiêm trọng đối với sản xuất khoai mì trên thế giới. Các giống khoai mì kháng bệnh hiện đang được chọn lọc dựa trên sự hiện diện của các chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng. Bài báo này trình bày kết quả thiết lập quy trình nhận diện các chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng CMD bằng phương pháp PCR. Trong đó, phản ứng PCR được thiết lập để nhận diện 6 chỉ thị bao gồm SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, NS198 và RME-1. Nhiệt độ bắt cặp mồi của phản ứng PCR được tối ưu hóa cho từng chỉ thị trước khi áp dụng cho việc nhận diện trên các mẫu giống khoai mì thu thập. Kết quả cho thấy trong 25 mẫu giống khoai mì được kiểm tra, có 20 mẫu mang 6 chỉ thị và 5 mẫu mang 5 chỉ thị. Sự khác biệt giữa các mẫu khoai mì thu thập so với mẫu đối chứng (kháng bệnh) thể hiện ở chỉ thị RME-1. Điều này cho thấy RME-1 có thể có vai trò quan trọng đối với việc nhận dạng gen kháng CMD.

Từ khóa: bệnh khảm lá, chỉ thị phân tử, khoai mì, gen kháng bệnh khảm lá

1. MỞ ĐẦU

Bệnh khảm lá khoai mì do các virus thuộc chi Begomovirus, họ Germiniviridae gây ra [1] là một trong những dịch hại gây tổn thất nghiêm trọng đối với ngành sản xuất khoai mì trên thế giới. Bệnh gây hại phổ biến ở các nước châu Phi, Ấn Độ và Sri Lanka [2] trước khi lan truyền đến Campuchia và Việt Nam vào tháng 5 năm 2015 [3].

Hiện có 11 loài virus gây bệnh khảm lá khoai mì đã được mô tả trên thế giới bao gồm: *African cassava mosaic virus - ACMV*, *African cassava mosaic Burkina Faso virus - ACMBFV*, *Cassava mosaic Madagascar virus - CMMGV*, *East African cassava mosaic virus - EACMV*, *East African cassava mosaic Cameroon virus - EACMCV*, *East African cassava mosaic*

Kenya virus - EACMKV, *East African cassava mosaic Malawi virus - EACMMV*, *East African cassava mosaic Zanzibar virus - EACMZV*, *South African cassava mosaic - SACMV*, *Indian cassava mosaic virus - ICMV*, *Sri Lankan cassava mosaic virus - SLCMV* [4] và một chủng (*East African cassava mosaic virus - Uganda*) [5 - 6]. Trong đó, loài *Sri Lankan cassava mosaic virus* hiện đang gây hại trên khoai mì ở Việt Nam [7].

Bệnh khảm lá đã và đang gây hại nghiêm trọng trên nhiều vùng trồng khoai mì ở Việt Nam. Để có thể kiểm soát hiệu quả bệnh này cần phải tạo ra giống khoai mì có khả năng kháng bệnh. Các chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng bệnh khảm lá (CMD) đã được phát hiện bởi nhiều

Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Xuân Dũng
Email: nxdung.snn@tphcm.gov.vn

nhóm nghiên cứu trên thế giới. Đầu tiên, Akano và cộng sự [8] đã xác định được hai chỉ thị liên kết với gen kháng CMD (SSRY28 và GY1) nằm ở khoảng cách 9 và 8 cM tương ứng so với locus gen. Sau đó, nhiều chỉ thị khác liên kết với gen kháng CMD cũng đã được phát hiện và sử dụng như NS158, NS169, RME-1 [9], NS198 [10], SSRY106 [11]; S5214 30911 [12] và S5214 780931 [13]. Trong đó, các chỉ thị SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, NS198 và RME-1 đã được sử dụng cho chọn giống khoai mì kháng CMD [10].

Dựa trên cơ sở các chỉ thị phân tử liên kết

với gen kháng CMD đã được công bố, nghiên cứu này thiết lập quy trình PCR nhận diện để xác định sự hiện diện của các chỉ thị trong một số giống khoai mì, phục vụ cho công tác chọn giống khoai mì kháng CMD ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu lá khoai mì kháng CMD (giống C33) được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc.

Mẫu lá khoai mì thu thập từ vùng trồng khoai mì ở tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu (Bảng 1).

Bảng 1. Thông tin các mẫu khoai mì thu thập từ tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu

STT	Mẫu	Số lượng	Nguồn gốc mẫu	Địa điểm
1	VT 01 - 13	13	Giống sản xuất, thu thập trên đồng ruộng	Xã Láng Dài, huyện Đất Đỏ, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu
2	VT 14 - 21	8	Giống sản xuất, thu thập trên đồng ruộng	Xã Đá Bạc, huyện Châu Đức, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu
3	VT 22- 25	4	Giống sản xuất, thu thập trên đồng ruộng	Xã Long Tân, huyện Đất Đỏ, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu
4	Đối chứng kháng bệnh	1	Giống thử nghiệm do Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc cung cấp	Xã Hưng Thịnh, huyện Trảng Bom, tỉnh Đồng Nai

Trình tự mỗi tương ứng cho các chỉ thị phân tử (tham khảo từ các bài báo công bố trên cây khoai mì) sử dụng trong

nghiên cứu (Bảng 2) được tổng hợp và cung cấp bởi công ty Integrated DNA Technologies (Mỹ).

Bảng 2. Trình tự các mồi ISSR được sử dụng trong nghiên cứu

Tên chỉ thị	Loại chỉ thị	Trình tự	Sản phẩm (bp)	Tham khảo
NS158	SSR	F:GTGCGAAATGGAAATCAATG R:TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA	166	Okogbenin <i>et al.</i> , 2007
NS169	SSR	F:GTGCGAAATGGAAATCAATG R:GCCTTCTCAGCATATGGAGC	319	Okogbenin <i>et al.</i> , 2007

NS198	SSR	F:TGCAGCATATCAGGCATTTC R:TGGAAGCATGCATCAAATGT	196	Okogbenin <i>et al.</i> , 2012
SSRY28	SSR	F:TTGACATGAGTGATATTTCTTGAG R:GCTGCGTGCAAACTAAAAT	180	Akano <i>et al.</i> , 2002
SSRY106	SSR	F:GGAACTGCTTGACAAAGA R:CAGCAAGACCATCACCAGTTT	270	Lokko <i>et al.</i> , 2005
RME-1	SCAR	F:ATGTTAATGTAATGAAAGAGC R:AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT	700, 740	Okogbenin <i>et al.</i> , 2007

2.2. PHƯƠNG PHÁP

Tách chiết DNA tổng số từ lá khoai mì

DNA tổng số được tách chiết từ lá khoai mì bằng phương pháp CTAB theo nghiên cứu của Healey và cộng sự [14]. DNA tách chiết sẽ được kiểm tra chất lượng thông qua điện di trên gel agarose và đo nồng độ DNA bằng máy quang phổ (Nano Drop). DNA tổng số có nồng độ và độ tinh sạch thích hợp sẽ được pha loãng về nồng độ 25-50 ng/μL để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thiết lập phản ứng PCR nhận diện gen kháng

Phản ứng PCR được thiết lập trên khuôn DNA tách chiết từ lá của mẫu khoai mì kháng CMD (được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc) với 6 mẫu tương ứng của 6 chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng (Bảng 2). Thành phần phản ứng (25 μL) bao gồm: 10.5 μL H₂O; 12.5 μL PCR master mix (DreamTaq DNA polymerase, 2X DreamTaq Green buffer, 0.1 mM mỗi loại dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 4 mM MgCl₂); 1 μL mỗi (10 μmol/μL) và 1 μL DNA khuôn (50 ng/μL). Chương trình nhiệt được thiết lập với 1 chu kỳ 95°C/10 phút; 35 chu kỳ 95°C/30 giây, Ta/45 giây, 72°C/45 giây; và 1 chu kỳ 72°C/10 phút. Trong đó, Ta là nhiệt độ bắt cặp mồi được xác định theo công thức $T_a = T_m - 3^\circ\text{C}$, với T_m là nhiệt độ nóng chảy của mồi. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1.5%), sau đó nhuộm với ethidium bromide (0.4

μg/mL) và quan sát sự xuất hiện của các băng DNA trên máy chụp gel (Geldoc).

Khảo sát nhiệt độ bắt cặp mồi tối ưu cho phản ứng PCR

Dựa vào nhiệt độ nóng chảy (T_m) của mồi do nhà sản xuất cung cấp, tiến hành tối ưu nhiệt độ bắt cặp mồi (T_a) bằng cách thực hiện phản ứng PCR với T_a thay đổi trong khoảng $\pm 4^\circ\text{C}$ so với T_m (Bảng 3). Nhiệt độ bắt cặp mồi mà tại đó số băng DNA có thể quan sát trên gel đặc hiệu và rõ nhất sẽ được chọn là nhiệt độ tối ưu. Thành phần và chương trình nhiệt của phản ứng PCR được thực hiện tương tự như nội dung thiết lập phản ứng.

Kiểm tra sự hiện diện của gen kháng bệnh khảm lá trên các giống khoai mì thu thập

Sự hiện diện của các chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng trong các mẫu thu thập được kiểm tra bằng cách thực hiện phản ứng PCR với mẫu DNA tổng số tách chiết từ lá. Phân tích sự hiện diện của chỉ thị liên kết với gen kháng dựa trên sự phù hợp về vị trí và kích thước của các băng DNA thu được so với sản phẩm DNA đã được công bố liên quan đến chỉ thị được nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ

Tách chiết DNA tổng số từ lá khoai mì

Kết quả tách chiết DNA từ mẫu lá khoai mì cho thấy DNA tổng số thu được có nồng độ dao động trong khoảng từ 313 đến 1,179.8 ng/μL, với tỷ lệ OD_{260}/OD_{280} của mẫu dao động từ 1.76 đến 1.87 (Bảng 4).

Bảng 3. Nhiệt độ áp dụng cho khảo sát nhiệt độ bắt cặp môi tối ưu

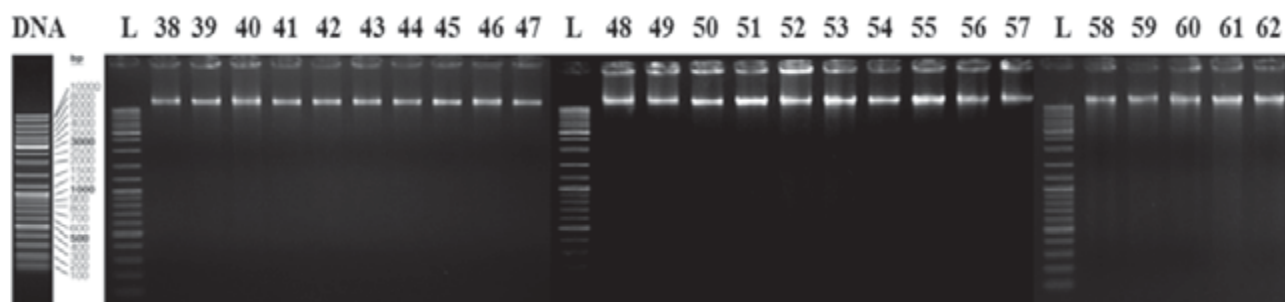
Môi (chỉ thị)	Nhiệt độ Tm (°C)	Nhiệt độ khảo sát (°C)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
NS158	55	52	53.1	53.8	54.8	56	57	57.8	59
NS169	55	52	53.1	53.8	54.8	56	57	57.8	59
NS198	55	52	53.1	53.8	54.8	56	57	57.8	59
SSRY28	55	52	53.1	53.8	54.8	56	57	57.8	59
SSRY106	58	55	56.1	56.8	57.8	59	60	60.8	62
RME-1	50	46	47.1	47.8	48.8	50	51	51.8	53

Bảng 4. Nồng độ và tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ của DNA tách chiết từ lá khoai mì

STT	Ký hiệu	Nồng độ DNA (ng/μL)	OD _{260/280}
1	VT-01	441.3	1.79
2	VT-02	467.0	1.80
3	VT-03	710.4	1.81
4	VT-04	471.7	1.80
5	VT-05	522.9	1.82
6	VT-06	313.1	1.77
7	VT-07	381.4	1.79
8	VT-08	442.4	1.79
9	VT-09	959.5	1.82
10	VT-10	345.0	1.76
11	VT-11	1,020.7	1.79
12	VT-12	980.7	1.80
13	VT-13	403.4	1.82
14	VT-14	937.1	1.84
15	VT-15	556.6	1.81
16	VT-16	456.9	1.78
17	VT-17	598.4	1.82
18	VT-18	484.2	1.87
19	VT-19	1,074.5	1.82
20	VT-20	570.4	1.79
21	VT-21	613.6	1.77
22	VT-22	601.6	1.79
23	VT-23	1,179.8	1.78
24	VT-24	377.6	1.79
25	VT-25	1,074.6	1.78

Kết quả điện di DNA trên gel agarose 1% cũng cho thấy DNA thu được từ mẫu lá không bị đứt gãy và ít lẫn tạp chất (Hình 1). Điều đó cho thấy

DNA tổng số thu được đảm bảo yêu cầu về nồng độ cũng như độ tinh sạch để sử dụng cho phản ứng PCR.

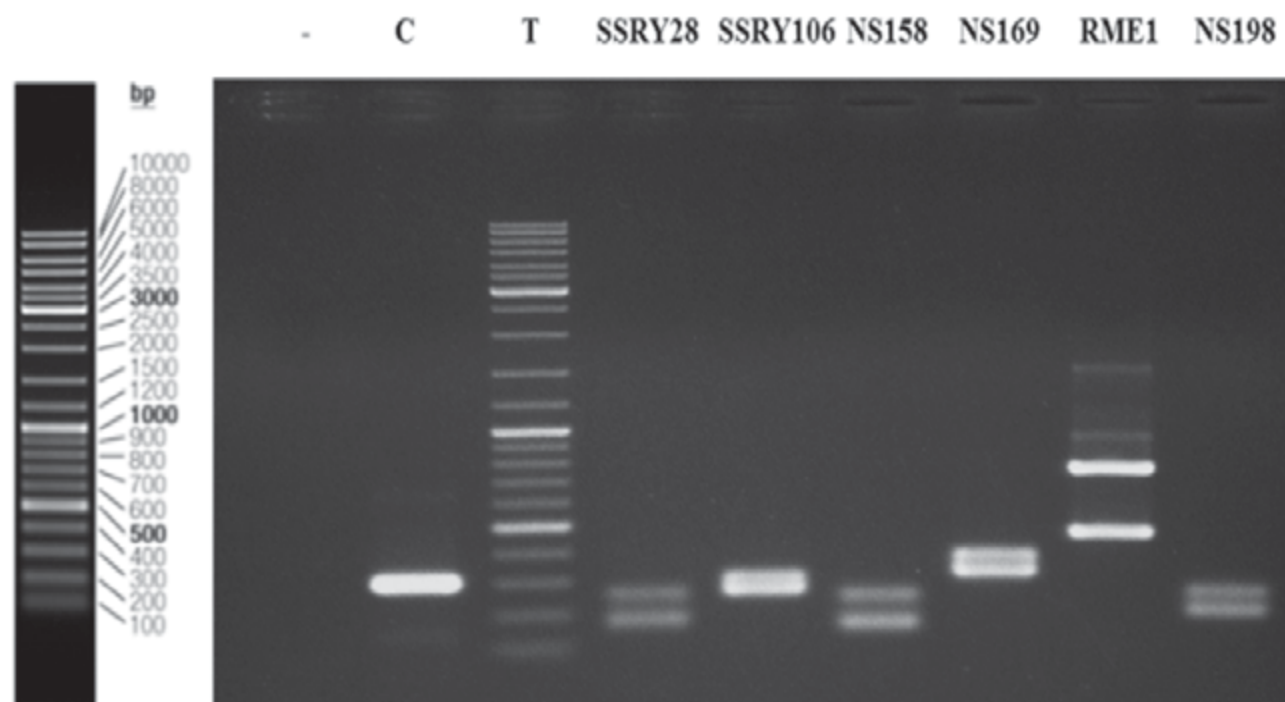


Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số tách chiết từ mẫu khoai mì thu thập tại Vũng Tàu.
L. Thang DNA chuẩn (100 - 10,000 bp)

Thiết lập phản ứng PCR nhận diện gen kháng

Phản ứng PCR được thiết lập giữa mẫu DNA ly trích từ lá của giống khoai mì kháng bệnh với môi trường ứng cho sáu chỉ thị được sử dụng trong nghiên cứu này đều thu được sản phẩm có chứa phân đoạn DNA phù hợp với các kết quả đã được công bố. Cụ thể, sản phẩm phản ứng với các môi NS158, NS169 và RME-1 có chứa các phân đoạn 166 bp, 319 bp và 700 bp,

phù hợp với công bố của Okogbenin và cộng sự (2007) [9]; Sản phẩm phản ứng với các môi NS198, SSRY28, SSRY106 có chứa các phân đoạn 196 bp, 180 bp và 270 bp, phù hợp với công bố của Okogbenin và cộng sự [10], Akano và cộng sự [8] và Lokko và cộng sự [11] (Hình 2). Kết quả này cho thấy phản ứng PCR được thiết lập đã khuếch đại được các chỉ thị phân tử tương ứng ở mẫu khoai mì kháng bệnh.

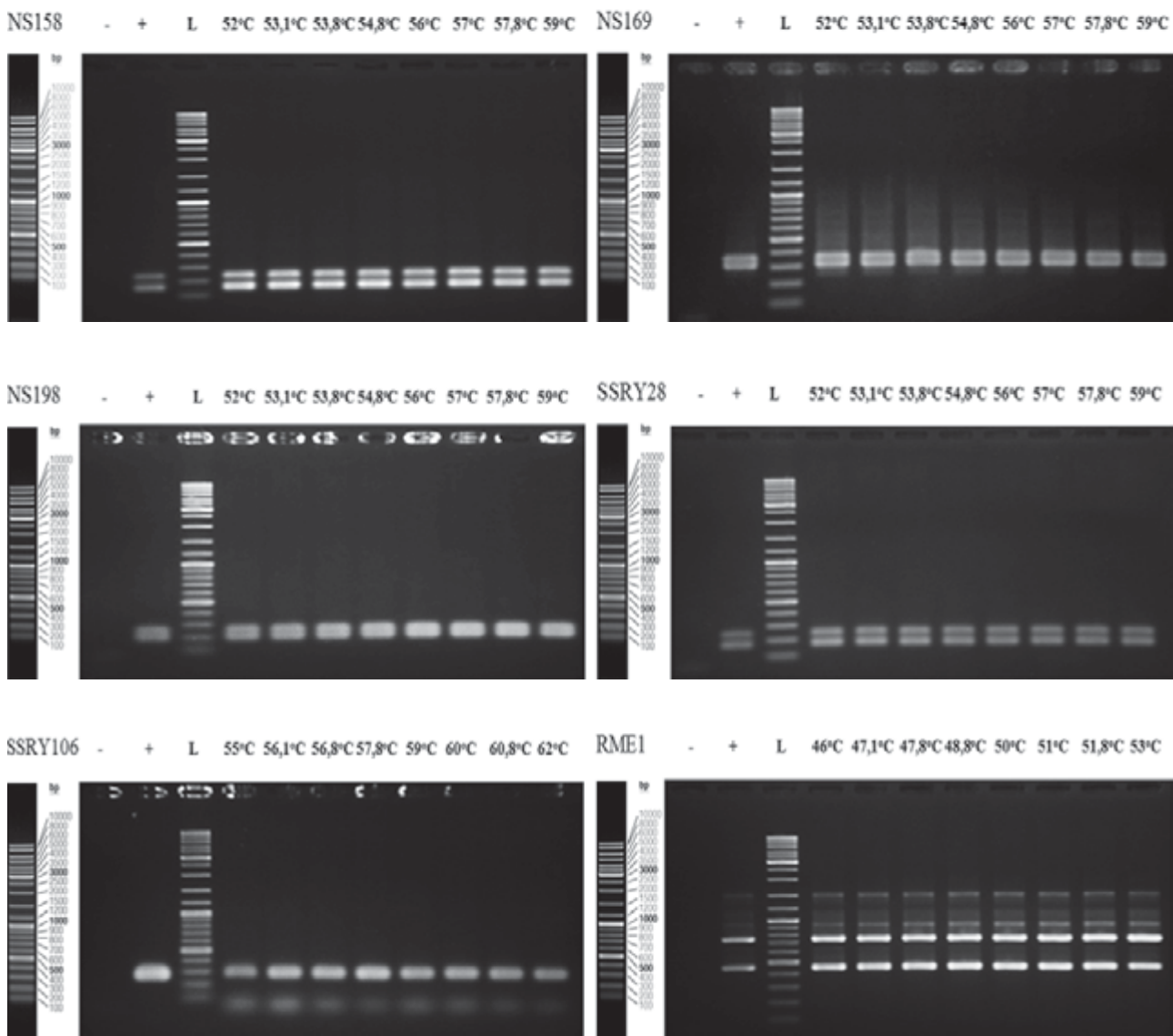


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA ly trích từ lá khoai mì kháng bệnh với các môi trường ứng cho các chỉ thị NS158, NS169, NS198, SSRY28, SSRY106, RME-1. (-): chứng âm; (C): kiểm chứng PCR; (L): thang DNA

Khảo sát nhiệt độ bắt cặp mồi (Ta) tối ưu

Nhìn chung, ở tất cả các nhiệt độ Ta khảo sát, phản ứng PCR được thiết lập với các mồi tương ứng với sáu chỉ thị đều thu được sản phẩm khuếch đại có kích thước phù hợp. Tuy nhiên, nhiệt độ Ta phù hợp (cho sản phẩm rõ nhất) có sự thay đổi khác nhau tùy thuộc vào từng mồi. Các mồi NS158, NS169, NS198 và SSRY28 cho sản phẩm sáng và rõ nhất ở nhiệt độ tương ứng 54.8°C, 54.8°C, 56.0°C và 53.8°C trong khoảng nhiệt độ khảo sát từ 52 - 59°C. Mồi SSRY106 cho sản phẩm sáng và rõ nhất ở

nhiệt độ 57.8°C trong khoảng từ 55 - 62°C và mồi RME-1 cho sản phẩm sáng và rõ nhất ở nhiệt độ 50.0°C trong khoảng từ 46 - 53°C (Hình 3). Kết quả này cho thấy việc thay đổi nhiệt Ta có ảnh hưởng đến hiệu quả khuếch đại của phản ứng PCR. Phù hợp với kết quả này, Rychlik và cộng sự [15] cũng cho rằng nhiệt độ Ta là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả khuếch đại của phản ứng PCR; và việc tối ưu hóa Ta có ý nghĩa rất quan trọng trong các phản ứng sử dụng DNA bộ gen làm khuôn.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA của lá khoai mì kháng bệnh với mồi tương ứng cho các chỉ thị phân tử ở các nhiệt độ Ta khác nhau.
(-): chứng âm, (+): chứng dương, (L): thang DNA (100 - 10,000 bp)

Kiểm tra sự hiện diện của gen kháng trên các giống khoai mì thu thập

Kết quả kiểm tra sự hiện diện của gen kháng bệnh khảm lá trên 25 mẫu khoai mì thu thập với 6 chỉ thị phân tử (NS158, NS169, SSRY28, RME-1, NS198 và SSRY106) cho thấy tất cả các mẫu kiểm tra đều có mang ít nhất 5 trong số 6 chỉ thị được khảo sát. Trong đó, có 20 mẫu (80%) mang 5 chỉ

thị và 5 mẫu (20%) mang 6 chỉ thị (Bảng 5). Sự khác biệt giữa các mẫu khoai mì thu thập so với mẫu đối chứng (kháng bệnh) thể hiện ở chỉ thị RME-1. Điều này cho thấy các mẫu khoai mì thu thập có mang chỉ thị RME-1 (mẫu VT20-24) có thể là các mẫu có mang gen kháng và RME-1 là chỉ thị có vai trò quan trọng trong việc xác định sự hiện diện của gen kháng CMD.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra gen kháng bằng chỉ thị phân tử

Ký hiệu mẫu	Chỉ thị liên kết gen kháng bệnh khảm lá khoai mì						(*)
	NS158	NS169	NS198	SSRY28	SSRY106	RME-1	
VT-01	+	+	+	+	+		5
VT-02	+	+	+	+	+		5
VT-03	+	+	+	+	+		5
VT-04	+	+	+	+	+		5
VT-05	+	+	+	+	+		5
VT-06	+	+	+	+	+		5
VT-07	+	+	+	+	+		5
VT-08	+	+	+	+	+		5
VT-09	+	+	+	+	+		5
VT-10	+	+	+	+	+		5
VT-11	+	+	+	+	+		5
VT-12	+	+	+	+	+		5
VT-13	+	+	+	+	+		5
VT-14	+	+	+	+	+		5
VT-15	+	+	+	+	+		5
VT-16	+	+	+	+	+		5
VT-17	+	+	+	+	+		5
VT-18	+	+	+	+	+		5
VT-19	+	+	+	+	+		5
VT-20	+	+	+	+	+	+	6
VT-21	+	+	+	+	+	+	6

VT-22	+	+	+	+	+	+	6
VT-23	+	+	+	+	+	+	6
VT-24	+	+	+	+	+	+	6
VT-25	+	+	+	+	+		5
ĐC	+	+	+	+	+	+	6
(**)	26	26	26	26	26	6	

Ghi chú: (+): có sự xuất hiện bằng DNA mục tiêu; (*): số chỉ thị có bằng DNA phù hợp với mẫu; (**): số mẫu có bằng DNA phù hợp với một chỉ thị.

4. KẾT LUẬN

Quy trình PCR nhận diện chỉ thị phân tử liên kết với gen kháng CMD đã được thiết lập và áp dụng cho việc nhận diện 6 chỉ thị (NS158, NS169, SSRY28, RME-1, NS198 và SSRY106) trên 25 mẫu khoai mì thu thập. Kết quả cho

thấy có 20 mẫu (80%) mang 6 chỉ thị tương tự như mẫu đối chứng kháng bệnh và 5 mẫu (20%) mang 5 chỉ thị. Sự khác biệt giữa mẫu thu thập và đối chứng được thể hiện ở chỉ thị RME-1, cho thấy chỉ thị này có ý nghĩa quan trọng đối với việc xác định gen kháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.S. Pita, V.N. Fondong, A. Sangare, G.W. Otim-Nape, S. Ogwal, C.M. Fauquet, "Recombination, pseudo recombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda", *Journal of General Virology*, No.8, pp. 655 -665, 2001.
- [2] O.J. Alabi, P.L. Kumar and R.A. Naidu, "Cassava mosaic disease: A curse to food security in Sub-Saharan Africa", *APSnet Features*, pp.1 -16, 2011.
- [3] Cục Bảo vệ thực vật, "Báo cáo tình hình bệnh khảm lá sắn và công tác chỉ đạo phòng chống dịch", *Hội nghị Giải pháp phòng, chống bệnh khảm lá khoai mì. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, tr.1 -11, 2018.
- [4] Fondong, "The search for resistance to *Cassava mosaic geminiviruses*: How much

we have accomplished, and what lies ahead", *Frontiers in Plant Science*, Vol8, pp.1 -19, 2017.

- [5] D. Deng, W.G. Otim-Nape, A. Sangare, S. Ogwal, R.N. Beachy and C.M. Fauquet. "Presence of a new virus closely related to *East African cassava mosaic geminivirus*, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda", *African Journal of Root and Tuber Crops*, Vol2, pp.23 -28, 1997.

- [6] X. Zhou, Y. Liu, L. Calvert, C. Munoz, G.W. Otim-Nape, D. J. Robinson, B.D, "Harrison. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination", *Journal of General Virology*, Vol78, pp.2101 -2111, 1997.

- [7] Viện Bảo vệ thực vật, "Một số nghiên cứu về bệnh virus khảm lá sắn và giải pháp phòng

trừ". *Hội nghị Giải pháp phòng, chống bệnh khảm lá khoai mì, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, tr. 35 - 61, 2018.

[8] A.O. Akano, A.G.O. Dixon, C. Mba, E. Barrera, M. Fegene, "Genetic mapping of dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease", *Theor Appl Genet*, Vol 105, pp. 521 - 525, 2002.

[9] E. Okogbenin, M.C.M. Porto, C. Egesi, C. Mba, E. Espinosa, L.G. Santos, C. Ospina, J. Marín, E. Barrera, J. Gutiérrez, I. Ekanayake, C. Iglesias, M. Fregene. "Marker-assisted introgression of resistance to cassava mosaic disease into Latin American germplasm for the genetic improvement of cassava in Africa", *Crop Science*, Vol 47, pp. 1895 - 1904, 2007.

[10] E. Okogbenin, C.N. Egesi, B. Olanmi, O. Ogundapo, S. Kahya, P. Hurtado, J. Marin, O. Akinbo, C. Mba, H. Gomez, C. de Vicente, S. Baiyeri, M. Uguru, F. Ewa and M. Fregene, "Molecular marker analysis and validation of resistance to cassava mosaic disease in elite cassava genotypes in Nigeria", *Crop Science*, Vol 52, pp. 2576 - 2586, 2012.

[11] Y. Lokko, E.Y. Danquah, S.K. Offei, A.G.O. Dixon, M.A. Gedil, "Molecular markers

associated with a new source of resistance to the cassava mosaic disease", *African Journal of Biotechnology*, Vol 4, pp. 873 - 881, 2005.

[12] I.Y. Rabbi, M.T. Hamblin, M. Gedil, P. Kulakow, M. Ferguson, A.S. Ikpan, D. Ly, J.-L. Jannink, "Genetic mapping using genotyping-by-sequencing in the clonally-propagated cassava", *Crop Science*, Vol 54, pp. 1384 - 1396, 2014a.

[13] I.Y., Rabbi, M.T., Hamblin, P.L. Kumar, M.A. Gedil, A.S. Ikpan, J. Jannink, P.A. Kulakow, "High-resolution mapping of resistance to cassava mosaic geminiviruses in cassava using genotyping-by-sequencing and its implications for breeding", *Virus Research*, Vol 186, pp. 87 - 96, 2014b.

[14] A. Healey, A. Furtado, T. Cooper and R. J. Henry, "Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species", *Plant methods*, Vol 10, No. 1, pp. 21 - 29, 2014.

[15] W. Rychlik, W.J. Spencer and R.E. Rhoads, "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*", *Nucleic Acids Research*, Vol 18, No. 21, pp. 6409 - 6412, 1990.

Establishment of PCR procedure for identifying molecular marker linked to cassava mosaic disease (*Manihot esculenta* Crantz) resistant gene

Huynh Nguyen Minh Nghia, Nguyen Thi Kim Thoa,
Nguyen Thi Thanh Thao and Nguyen Xuan Dung*

ABSTRACT

Cassava mosaic disease (CMD) is one of the most devastating pests of cassava production in the world. The disease-resistant cassava varieties are currently being selected based on the

presence of molecular markers associated with the resistance gene. This paper presents the results of establishing the process of identifying molecular markers associated with the anti-CMD gene by the PCR method. In which, PCR reaction is set up to identify six markers, including SSRY28, SSRY106, NS158, NS169, NS198 and RME-1. The annealing temperature (Ta) of the PCR reaction was optimized for each marker before applying for identification on collected samples of cassava. The results showed that there were 20 samples with six markers and five samples with five markers. The difference between the collected samples compared with the control (disease resistance) samples was shown in the RME-1 marker. This suggests that RME-1 may have an important role in the identification of the CMD resistance gene.

Keywords: *cassava mosaic disease, CMD resistant gene, Manihot esculenta Crantz, molecular marker*

Received: 16/04/2021

Revised: 12/05/2021

Accepted for publication: 18/05/2021