

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกับลักษณะความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว

Microsatellite markers associated with powdery mildew resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek)

สมพงศ์ จันทร์แก้ว¹, ประกิจ สมท่า², วรวิทย์ โสรจจาภินันท์², ธนพร ขจรผล³,
สุษุมารณ์ ศรีเพ็ญ³ และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์^{2*}

Sompong Chankaew¹, Prakrit Somta², Worawit Sorajjapinun², Tanaporn Kajonphol³,
Sukhumaporn Sriphadet³ and Peerasak Srinives^{2*}

บทคัดย่อ: โรคราแป้ง (powdery mildew) เป็นโรคที่สำคัญของถั่วเขียวที่ปลูกในช่วงที่มีสภาพอากาศแห้งและเย็น การที่โรคเกิดเฉพาะในฤดูหนาวเป็นข้อจำกัดที่ทำให้ความก้าวหน้าของการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ล่าช้า วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ ค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกับความต้านทานในถั่วเขียวสายพันธุ์ V 4718 เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน งานวิจัยนี้ได้สร้างประชากร F₁ และ F_{2:3} จากกลุ่มผสมระหว่างพันธุ์ กำแพงแสน 1 (KPS1) ที่อ่อนแอต่อโรค (สายพันธุ์แม่) กับสายพันธุ์ V 4718 ที่ต้านทานต่อโรค (สายพันธุ์พ่อ) แล้วปลูกทดสอบปฏิกิริยาของโรคพบว่า ปฏิกิริยาของโรคมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่องไม่สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต้านทาน และอ่อนแอได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานเป็นลักษณะปริมาณ และพบว่า ปฏิกิริยาของโรคไม่มีสหสัมพันธ์กับวันสุกแก่ ในส่วนของ การวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในประชากร F₂ พบว่า มี 2 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับความต้านทานโรคราแป้ง

คำสำคัญ: ถั่วเขียว, โรคราแป้ง, เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

ABSTRACT: Powdery mildew (PM) caused by fungus *Erysiphe pologoni* is a serious foliar disease of mungbean production during dry season. Progress in breeding resistance cultivar is slow because disease occurs only one season a year. Molecular marker linked to resistance gene(s) is useful in breeding resistance cultivar. In this study, we identified microsatellite markers associated with resistance to powdery mildew in mungbean accession V4718. F₁ and

¹ สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Program in Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 73140

² ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 73140

³ สาขาวิชาทรัพยากรเกษตรชีวภาพ คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ สกลนคร 47000

Program in Agro-Bioresources Agronomy, Faculty of Natural Resources and Agro Industry, Kasetsart University, Chalmprakhiat Sakhon Nakhon Province Campus. 47000

* Corresponding author: agrps@yahoo.com

$F_{2:3}$ populations were developed from a cross between Kamphaeng Saen 1 (KPS1; susceptible cultivar) as a female parent and V4718 (highly resistance) as a male one. The populations and parents were evaluated for resistance in the field. The results showed that the disease resistance was segregated continuously, indicating quantitative inheritance of the trait. Resistance score was not correlated with days to maturity, suggesting that gene(s) controlling the two traits was unlinked. Two microsatellite markers were found associating with the resistance.

Keywords: mungbean, powdery mildew, microsatellite marker, SSR marker

บทนำ

โรคราแป้ง (powdery mildew) เกิดจากเชื้อรา *Erysiphe pologoni* โรคนี้ระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกถั่วเขียวที่สำคัญของโลก โดยเฉพาะถั่วเขียวที่ปลูกในฤดูแล้ง ซึ่งมีสภาพอากาศค่อนข้างแห้งและเย็น ลักษณะอาการของโรคมักพบที่ใบล่างก่อน โดยเชื้อโรคสามารถเข้าทำลายทั้งด้านบนและด้านล่างของใบ ในทุกระยะของการเจริญเติบโต และทุกส่วนของต้นถั่วเขียว โดยอาการของโรคจะเริ่มจากการมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราลักษณะคล้ายผงแป้งปกคลุมอยู่บนใบ ต่อมาใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตายไปในที่สุด ถ้าเชื้อราเข้าทำลายในระยะก่อนออกดอกจะทำความเสียหายมากกว่าในระยะอื่นๆ (Poehlman et al., 1991) ถ้าโรคนี้ระบาดรุนแรงมากจะทำให้ผลผลิตลดลงถึง 20-40 % (Fernandez and Shanmugasundaram, 1988) แต่หากเชื้อราเข้าทำลายในระยะออกดอกติดฝักจะทำให้ต้นถั่วแคระแกร็นติดฝักไม่โต ขนาดของฝักและเมล็ดเล็กลง หรือทำให้ฝักร่วงจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลย ถึงแม้จะมีการศึกษาพันธุ์กรรมความต้านทานต่อโรคราแป้งในหลายแหล่งความต้านทาน (Young et al., 1993; Chaitieng et al., 2002; Gawande and Patil, 2003; Humphry et al., 2003; Khajudparn et al., 2007; Kasettranon et al., 2009; 2010) แต่ปัจจุบันก็ยังไม่มีถั่วเขียวพันธุ์การค้าพันธุ์ใดที่ต้านทานต่อโรคดังกล่าว ดังนั้น การศึกษาถึงพันธุ์กรรมของการต้านทานโรคเป็นสิ่งสำคัญในการปรับปรุงถั่วเขียวให้ต้านทานต่อโรคนี้ แต่เนื่องจากโรคราแป้งมักจะระบาดในฤดูแล้งที่มีอากาศแห้งและเย็น ทำให้การปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์มีข้อจำกัดด้านสภาพแวดล้อม ดังนั้น หากสามารถหาเครื่องหมาย

โมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคนี้ได้ จะทำให้สามารถคัดเลือกได้ทุกฤดูปลูก (marker-assisted selection, MAS) ส่งผลให้การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานต่อโรคนี้ทำได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการรวมยีนจากแหล่งต้านทานต่างๆ เข้าไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน เพื่อให้ได้ถั่วเขียวสายพันธุ์การค้าที่มีความต้านทานต่อโรคราแป้งมากขึ้นในอนาคต

วิธีการศึกษา

การสร้างประชากร และการสกัดดีเอ็นเอ ผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 (KPS1) ที่อ่อนแอต่อโรคกับสายพันธุ์ V 4718 ที่ต้านทานต่อโรค (Hartman et al., 1993) เพื่อผลิตลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 (F_1) ปลูกต้น F_1 แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ปลูก F_2 134 ต้นแยกต้นในกระถางขนาด 30 ซม. เก็บใบอ่อนไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Lodhi et al. (1994) จากนั้นปล่อยให้ F_2 แต่ละต้นผสมตัวเองเพื่อสร้างเมล็ดลูกผสมชั่วรุ่นที่ 3 (F_3) ซึ่งนำไปใช้ปลูกทดสอบปฏิกิริยาของโรคราแป้ง

การทดสอบปฏิกิริยาของโรค

นำพันธุ์พ่อแม่ ลูกผสม F_1 และ F_3 ไปปลูกทดสอบปฏิกิริยาต่อโรคราแป้ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) จำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 10 ต้น ในฤดูแล้งช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม ปี 2554 ณ แปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยการปลูกพันธุ์ CN 60 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคในระดับสูงระหว่างแถวและรอบๆ แปลงทดลอง เพื่อใช้ช่วยแพร่

ระบาดของโรค หลังจากปลูกถั่วเขียว 25 วัน ทำการปลูกเชื้อโรคราแป้งโดยการฉีดพ่นสารละลายสปอร์ของเชื้อที่เก็บจากใบของถั่วเขียวที่เป็นโรคตามธรรมชาติ และปลูกเชื้อซ้ำทุกๆ 5 วันติดต่อกัน 3 ครั้ง จนอาการของโรคเริ่มปรากฏบนพันธุ์ KPS1 จึงทำการประเมินการเกิดโรคในสายพันธุ์ โดยใช้วิธีการให้คะแนนด้วยสายตาตามวิธีการของ Young et al. (1993) โดยแบ่งระดับคะแนนการเกิดโรคออกเป็น 5 ระดับ ตั้งแต่ 1-5 (1 = ไม่ปรากฏอาการของโรค, 2 = ปรากฏอาการของโรค 1-25%, 3 = ปรากฏอาการของโรค 26-50%, 4 = ปรากฏอาการของโรค 51-75% และ 5 = ปรากฏอาการของโรค 76-100%) ประเมินการเกิดโรคทั้งหมด 2 ครั้ง คือ 50 และ 60 วันหลังปลูก (DAP)

นอกจากการประเมินปฏิกริยาต่อโรคราแป้งแล้ว บันทึกระยะเวลาสุกแก่ของแต่ละสายพันธุ์ด้วย โดยกำหนดให้ระยะเวลาสุกแก่ คือจำนวนวันหลังปลูกถึงวันที่ประมาณ 50% ของต้นภายในสายพันธุ์นั้นมีฝักสุกแก่ (ฝักมีสีดำหรือน้ำตาล)

การวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ตรวจสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อแม่ และแม่ โดยใช้เครื่องหมายจำนวน 753 เครื่องหมายที่มาจากถั่วชนิดต่างๆ คือ azuki bean (Wang et al., 2004), common bean (Blair et al., 2003), mungbean (Seehalak et al., 2009; Somta et al., 2008, 2009; Tangphatsornruang et al., 2009) and cowpea (Li et al., 2001) การวิเคราะห์เครื่องหมายทำตามวิธีที่อธิบายไว้โดย (Somta et al., 2008) แล้วนำเฉพาะเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ไปวิเคราะห์ในประชากร F_2

การวิเคราะห์สถิติ

หาค่าสหสัมพันธ์ (coefficient of correlation) ระหว่างคะแนนการเกิดโรคของการประเมินที่ 50 วัน และ 60 วันหลังปลูก กับระยะเวลาสุกแก่ วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) แล้วหา

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อโรคราแป้งโดยการวิเคราะห์ single marker analysis ตามวิธีการของ Karsey and Pooni (1996) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.001

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ในการทดลองครั้งนี้ สามารถประเมินความต้านทานของโรคราแป้งครั้งแรกได้หลังจากปลูกถั่วเขียวไป 50 วัน หรือหลังการปลูกเชื้อ 25 วัน โดยสายพันธุ์ KPS1 แสดงอาการของโรคทั้งด้านบนและด้านล่างของใบ (Figure 1) ส่วน V4718 ไม่แสดงอาการของโรค โดยมีระดับคะแนนการเกิดโรคเป็น 5 และ 1 ตามลำดับ ส่วนในลูกผสม F_1 แสดงอาการของโรคเพียงเล็กน้อย มีระดับคะแนนเท่ากับ 1.2 และในประชากร $F_{2:3}$ พบว่า มีความแตกต่างกันในลักษณะความต้านทานต่อโรค (Table 3) โดยลักษณะความต้านทานโรคมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง มีค่าคะแนนการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 1 ถึง 5 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.79 (Figure 2) ในขณะที่ 60 วัน หลังปลูกเชื้อ พบว่า ระดับการระบาดของโรคเพิ่มสูงขึ้นมาก คะแนนการเกิดโรคของ KPS1, V4718 และ F_1 เท่ากับ 5, 1.2 และ 2.25 ตามลำดับ ในประชากร $F_{2:3}$ ค่าคะแนนการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 1.7 ถึง 5 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.81 (Figure 2) คะแนนการเกิดโรคของการประเมินโรคครั้งที่ 1 (50 DAP) กับ ครั้งที่ 2 (60 DAP) มีความสัมพันธ์กันทางบวกในระดับสูง ($r = 0.791$, $P < 0.001$) (Table 1) แสดงให้เห็นว่า สามารถประเมินความต้านทานของโรคราแป้งของถั่วเขียวได้ทั้ง 2 ระยะ อย่างไรก็ตามที่ระยะ 60 DAP ทำให้ได้ผลประเมินที่แม่นยำกว่า ซึ่งยืนยันได้จากค่า R^2 ที่ 60 DAP สูงกว่าที่ 50 DAP (Table 2) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Setiawan et al. (2000) ที่พบว่า ในระยะที่มีการระบาดของโรคสูงสุดจะสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานหัวบีต (sugar beet) ต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า การเกิดโรคทั้ง 2 ระยะ ไม่มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการสุกแก่ของถั่วเขียว (Table 1)

แสดงว่า หากมีการระบาดของโรคที่รุนแรงไม่ว่าจะเป็นระยะใด เชื้อก็สามารถเข้าทำลายถั่วเขียวได้ทั้งสิ้น ผลการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ พบว่า 69 (13.91%) จาก 753 เครื่องหมายแสดงความแตกต่างระหว่าง KPS1 พันธุ์ V4718 และเมื่อนำไปวิเคราะห์ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 พบว่า มี 2 เครื่องหมาย (VA259 และ DMB130) ที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคมาก โดยแต่ละเครื่องหมายอธิบายความแปรปรวนของความต้านทาน

โรคได้แตกต่างกัน คือ 16.42 (VA259) และ 19.74% (DMB130) ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองเครื่องหมายสามารถอธิบายความแปรปรวนของความต้านทานโรคได้รวมกัน 20.47% จากผลการทดลองดังกล่าว ถึงแม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 สามารถอธิบายความแปรปรวนของความต้านทานได้เพียง (16-20 %) แต่ก็อาจใช้เป็น MAS ในการคัดเลือกหรือรวมยีนต้านทานจากแหล่งต้านทานต่าง ๆ เข้าไว้ในถั่วเขียวพันธุ์การค้าให้ต้านทานต่อโรคราแป้งได้

Table 1 Coefficient of correlation between the time of scoring and the days to maturity

Trait	Days to maturity	Score at 60 DAP
Score at 50 DAP	0.069 ^{ns1/}	0.791 ^{***2/}
Score at 60 DAP	0.018 ^{ns}	-

^{1/}ns=not significant at P=0.001, ^{2/}*** = significance at P=0.001

Table 2 SSR marker showing significant association with PM resistance based on single marker analysis.

Trait	SSR marker	Probability ^{1/}	R ² (%)
50 DAP	VA259	<0.001 ^{***}	15.10
	DMB130	<0.001 ^{***}	16.84
60 DAP	VA259	<0.001 ^{***}	16.42
	DMB130	<0.001 ^{***}	19.74

^{1/}*** = significant at P=0.001

Table 3 The analysis of variance of disease score in the F₃ lines derived from the cross KPS1 x V4718 at 50 and 60 DAP.

SOV	df	Mean Sq		F value	
		50 DAP	60 DAP	50 DAP	60 DAP
Rep	1	0.1185	2.1377	0.659 ^{ns1/}	0.011 ^{ns}
Ling	133	2.7739	1.5739	0.001 ^{***2/}	0.001 ^{***}
Error	132	0.6084	0.3195		

^{1/}ns=not significant at P=0.001, ^{2/}*** = significant at P=0.001

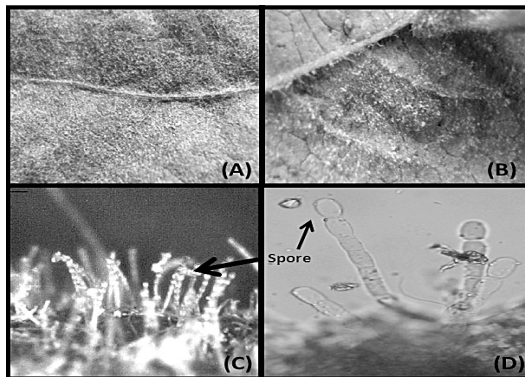


Figure 1 Powdery mildew disease in mungbean; (A): fungus on upper side of leaves, (B) fungus on lower side of leaves, (C) the spore of *Erysiphe polygoni* at 40x under microscope, and (D): the spore of *Erysiphe polygoni* at 100x under microscope.

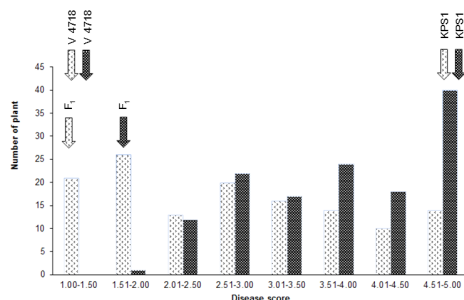


Figure 2 Frequency distribution of reaction to powdery mildew disease in $F_{2:3}$ population derived from the cross KPS1 x V4718.

สรุป

ความต้านทานต่อโรคราแป้งในถั่วเขียวสายพันธุ์ V-4718 เป็นลักษณะปริมาณ และอาจถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ VA259 และ DMB130 เชื่อมโยงกับความต้านทานโรคราแป้ง และใช้ในการช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทานได้

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 11 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และโครงการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวไทย จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Blair, M.W., F. Pedraza, H. F. Buendia, E. Gaitán-Solis, S.E. Beebe, P. Gepts, and J. Thome. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. 107:1362-1374.
- Chaitieng, B., A. Kaga, O.K. Han, X.W. Wang, S. Wongkaew, P. Laosuwan, N. Tomooka, and D.A. Vaughan. 2002. Mapping a new source of resistance to powdery mildew in mungbean. Plant breeding 121:521-525.
- Fernandez G. C.J. and S. Shanmugasundaram. 1988. The AVRDC mungbean improvement program: the part, present and future. P.58-70. In: Proc. 2nd Int. Mungbean Symp., Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan.
- Gawande V.L. and J.V. Patil. 2003. Genetics of powdery mildew (*Erysiphe polygoni* D.C.) resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Crop Prot. 22:567-571.
- Hartman, G.L., T.C. wang, and D.W. Kim. 1993. Field evaluation of mungbean for resistance to cercospora leaf spot and powdery mildew. Int. J. Pest Manage. 39:418-421.
- Humphry, M.E., T. Magner, C.L. McIntyre, E.A.B. Aitken, and C.J. Liu. 2003. Identification of a major locus conferring resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni* D.C.) in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) by QTL analysis. Genome 46:738-744.
- Kasettranon W., P. Somta, and P. Srinives. 2009. Genetics of resistance to powdery mildew disease in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). J. Crop Sci. Biotech. 12:37-42.

- Kasettranan, W., P. Somta, and P. Srinives. 2010. Mapping of quantitative trait loci controlling powdery mildew resistance in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). J. Crop Sci. Biotech 13:155-161.
- Kearsey, M. J. and H. S. Pooni. 1996. The Genetical Analysis of Quantitative Traits. Chapman and Hall, London.
- Khajudparn P., S. Wonghaew, and P. Thipyapong. 2007. Mungbean powdery mildew resistance identification of gene for resistance to powdery mildew in mungbean. African Crop Science Conference Proceeding 8:743-745.
- Li, C.D., C.A. Fatokun, B. Ubi, B.B. Singh, and G.J. Scoles. 2001. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. Crop Sci. 41:189-197.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol. Bio. Rep. 12:6-13.
- Poehlman, J.M. 1991. The Mungbean. Oxford and IBH Publishing Co. PVT. LTD., New Delhi. 375 p.
- Seehaluk, W., P. Somta, W. Sommanas, and P. Srinives. 2009. Microsatellite markers for mungbean developed from sequence database. Mol. Ecol. Res. 9:862-864.
- Setiawan, A., G. Koch., S.R. Barnes, and C. Jung. 2000. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Cercospora* leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. 100:1176-1182.
- Somta, P., W. Musch, B. Kongsamai, S. Chanprame, S. Nakasathien, T. Toojinda, W. Sorajjapinun, W. Seehaluk, S. Tragoomrung, and P. Srinives. 2008. New microsatellite markers isolated from mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Mol. Ecol. Res. 8:1155-1157.
- Somta, P., W. Seehaluk, and P. Srinives. 2009. Development, characterization and cross-species amplification of mungbean (*Vigna radiata*) genic microsatellite. Conserv. Genet. 10:1939-1943.
- Tangphatsomruang, S., P. Somta, P. Uthaipaisanwong, J. Chanprasert, D. Sangsrakru, W. Seehalak, W. Sommanas, S. Tragoomrung, and P. Srinives. 2009. Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). BMC Plant Biol. 9:137.
- Wang, X.W., A. Kaga, N. Tomooka, and D.A. Vaughan. 2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. Theor. Appl. Genet. 109:352-360.
- Young, N.D., D. Danesh, D. Menancio-Hautea, and L. Kumar. 1993. Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. Theor. Appl. Genet. 87:243-249.