# ارزیابی شجره و صفات مرفولوژیکی ژنوتیپ‌های گندم نان با استفاده از نشانگر ملکولی RGA در راستای معرفی ارقام سازگار

# Evaluation Pedigree and Morphological Traits Studies of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes Using RGA to Introduce Compatible Cultivars

علیرضا حبیب‌زاده[1]، محمد خیاط[1*]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

**[*]نویسنده مسوول مکاتبات:** Khayat.agri@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲

## چکیده

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۳۰ رقم گندم خارجی و داخلی با استفاده از نشانگرهای RGA مورد بررسی قرارگرفت. با استفاده از روش دلاپورتا DNA از برگ نمونه‌ها استخراج گردید. از پنج جفت آغازگر RGA به‌کار برده شده سه جفت آغازگر چندشکلی نشان دادند. بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد چندشکلی به‌ترتیب مربوط به نشانگرهای P14N و P54N بود. درصد باندهای پلی‌مورفیسم نشانگرهای P810 و P54N و P14N به‌ترتیب ۴۲٪، ۳۳٪ و ۳۹٪ بود. تجزیه کلاستر براساس حضور و عدم حضور باند با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد مبتنی بر UPGAMA انجام گرفت. دامنه ضرایب تشابه از ۰/۰۶۱ تا ۰/۸۸ متغیر بود. بیش‌ترین تشابه بین ارقام کوهدشت و کرمان و کم‌ترین تشابه بین ارقام TP981 و Lee بود. در این تحقیق، رابطه معنی‌داری بین فاصله ژنتیکی و فاصله مناطق جغرافیایی کشت، مشاهده گردید، به‌طوری‌که ارقام ایرانی و خارجی با ضریب تشابه ۰/۴۴ از هم تفکیک یافتند. اما دو رقم Anza و Hyrmand از این تقسیم‌بندی تبعیت نکردند. همچنین از نظر تنوع ژنتیکی جایگاه ارقام ایرانی (با شجره معلوم) در کلاستر تابع روابط خویشاوندی آن‌ها بود. بررسی دندروگرام تشابه جاکارد نشان داد گرچه ارقام در خوشه‌های مجزایی دسته‌بندی نگردیدند. کلیه ارقام حساس به زنگ زرد در کنار هم در انتهای دندروگرام قرارگرفتند. در مجموع نتایج مبین کارآیی تکنیک RGA در بحث بررسی تنوع ژن‌های مقاومت است.

**واژ گان کلیدی**: ژنوتیپ، شجره، گندم نان، مرفولوژی و تکنیک RGA

**مقدمه**

افزایش محصول در گیاهان زراعی اهلی در آغاز مربوط به تلاش‌های متخصصان اصلاح نباتات بود و این یکی از بزرگ‌ترین افتخارات بشر به‌شمار می‌رود. علم ژنتیک از زمان پیدایش خود بر تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر اصول وراثت استوار بود و با مطالعه خویشاوندان و ار تباط ژنتیکی آن‌ها نقش مهمی در بهبود و افزایش محصولات کشاورزی داشت. در سال‌های اخیر انقلاب بیولوژی مولکولی ابزار مناسبی برای تجزیه ژنتیکی موجودات عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم آورد و شاید اساسی‌ترین این ابزارها نشانگرهای DNA هستند که به‌سادگی اختلاف در اطلاعات ژنتیکی فرد یا افراد را مشخص می‌سازند (خدابنده، ۱۳۷۸).

آگاهی از خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب والدین برای انجام تلاقی و استفاده از هتروزیس را تسهیل می‌نماید. اولین قدم در توسعه نقشه‌های ژنتیکی با نشانگرهای مولکولی DNA ، آزمایش میزان تنوع DNA در داخل گونه‌ها و شناسایی والدین که چندشکلی کافی برای نقشه‌یابی را نشان می‌دهند، می‌باشد. مطالعه تنوع ژنتیکی، انتخاب جمعیت‌های مناسب برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی، نشانمند کردن ژن‌ها و جداسازی ژن‌های مفید را ممکن می‌سازد (یزدی صمدی و عبدمیشانی، ۱۳۸۲).

جهت بررسی تنوع ژنتیکی روش‌های مولکولی مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lefebvre and Chevre, 2013). استفاده از مارکرهای مولکولی که چندشکلی بالایی را نشان می‌دهند؛ روش بسیار مناسب در بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد. مارکر اختصاصی RGA به‌عنوان یک نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی مطرح می‌باشد که براساس موتیف‌های حفاظتی ژن‌های مقاومت طراحی گردید. این موتیف‌ها در بسیاری از ژن‌های گیاهی مسوول مقاومت به بیماری‌های ویروسی قارچی، باکتریایی و نماتد وجود دارند (Paterson *et al*., 2011). مارکر RGA به‌علت دارا بودن پلی‌مورفیسم و تکرارپذیری بالا و همچنین تفسیر آسان و مطمئن نتایج آن می‌تواند مارکری مناسب در بررسی تنوع ژنتیکی باشد (Alard, 2016).

بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها نشان می‌دهد گرچه از نظر توالی شباهتی زیادی بهم ندارند. اما مناطق حفاظت شده خاصی بنام آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت (RGA) در آن‌ها وجود دارد. آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت یکی از عامل‌های بسیار مهم برای مقاومت به بیماری‌ها در غلات به‌خصوص گندم است (Jahal and Brigg, 2008) که نقش شناسایی عامل بیماری‌زا و انتقال پیام دفاعی را داراست. یکی از مهم‌ترین آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت NBS-LRR است. این نوع کلاس ژنی دارای نواحی تکراری غنی از لوسین (LRR) و همچنین یک جایگاه اتصال نوکلئوتیدی است که شامل چندین ناحیه حفاظت شده می‌باشد. این نواحی به‌وفور در ژن‌های مقاومت وجود دارد. با استفاده از مناطق حفاظت شده ژن‌های مقاومت به بیماری یک راهکار مبتنی بر پی.سی.آر جهت جداسازی ژن‌های مقاومت جدید و ایجاد نشانگرهای شدیدا پیوسته با ژن‌های مقاومت به نام مارکرهای RGA در گونه‌های مختلف زراعی از جمله گندم ایجاد گردید (Foroni *et al*., 2007). چن و همکاران (Chen *et al*., 2009) با استفاده از آغازگرهای مبتنی بر نواحی حفاظتی ژن‌های مقاومت به زنگ زرد ۱۳۰ باند در گندم آشکار کردند و در مجموع ۲۷ درصد باندهای چندشکل به‌دست آمد. مک فادن و همکاران (Macfadden *et al*., 2006) در بررسی تنوع زنتیکی گندم و جو با استفاده از مارکرهای RGA پلی‌مورفیسم مناسبی را به‌دست آوردند. سیلا و همکاران (Sela *et al*., 2009) با استفاده از مارکرهای RGA مبتنی بر آنالوگ‌های NBS-LRR به بررسی ۱۱۸ ژنوتیپ گندم پرداختند و توانستند پلی‌مورفیسم بالای ۵۸ درصدی را به‌دست آورند. دژستان و همکاران (Dezhsetan *et al*., 2014) با استفاده از مارکرهای RGA جهت جداسازی ژن‌های مقاومت در سیب‌زمینی در مجموع ۴۵۴ باند چندشکل ایجاد کردند که پس از جداسازی نوارها و توالی‌یابی ۶۶/۱۱ درصد نوارها تشابه معنی‌داری با ژن‌های مقاومت داشتند.

زوانگ و همکاران (Zhuhang *et al*., 2012) از تکنیک RGA و RFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی

برنج استفاده کردند که در مجموع باندهای ظاهر شده توسط مارکر RGA بین ۴۲-۳۳ درصد پلی‌مورفیسم نشان داد. مارکر RGA ایجاد شده بر مبنای مناطق حفاظت شده نقش بسیار مهمی در برنامه‌های اصلاحی برای مقاومت به بیماری‌ها و همچنین در هرمی ساختن ژن‌های مقاومت دارند. بنابراین در غربال‌گری ژنومی به‌منظور برنامه‌های اصلاحی RGA بر سایر نشانگرها ارجحیت دارد زیرا نشانگرهای RGA برخلاف سایر نشانگرها خود به خود ژن‌های مفید را بیان می‌کنند و می‌توانند در بررسی تنوع ژن‌های مقاومت و بالطبع تنوع مقاومت به بیماری‌ها نقش مهمی را ایفا نماید. هدف از این تحقیق، بررسی تنوع ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ زرد در ۳۰ رقم گندم داخلی و خارجی اصلاح شده توسط نشانگرهای دی‌جنره RGA بود. همچنین کارآیی نشانگرهای فوق در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام با در نظرگرفتن شجره آنها و وابستگی به مقاومت برای گروه‌بندی ارقام مورد بررسی قرارگرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این تحقیق بذور ۳۰ رقم گندم از کلکسیون موسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال جمع‌آوری شد (جدول یک). بذور جوانه‌زده در گلدان‌های جداگانه کشت و گلدان‌ها در دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جدول ۱- نام، شجره و چگونگی مقاومت ارقام گندم

Table 1. Name, Degree and Describe Resistance ability of Wheat Genotypes

| شجره ارقام خارجی<br>Foreign genotype degree | ارقام ایرانی<br>Iranian genotypes | مقاومت به زنگ زرد<br>Resistance to yellow rust | ارقام خارجی<br>foreign degree |
|---|---|---|---|
| Attila (CM85836-4Y-0M-0Y-8M-0Y-OPZ166 | Shirodi | (R) | Chinese |
| Attila (CM85836-4Y-0M-3M-0 | Chamran | (S) | Lee |
| Byt/4/jar//cfn/sr70/3/jup "S | Hyrmand | (R) | Moro |
| STM/3/KAL/V534/JIL716) | Kavir | (R) | Compair |
| GV/D630//ALD "S"/3/AZD | Shiraz | (S) | Anza |
| ALVAND//ALDAN/IAS58) | Pishtaz | (R) | Yr1/6 Avocet S |
| KVZ/BUHO "S"//KAL/BB | Falat | (S) | Yr6/6 Avocet S |
| RSH/5/WT/4/NORLO/K54*2//FN/3/PTR/6 | Omid | (R) | Flanders |
| K Gods/1-27-6275/CF1770 | Alvand | (S) | Jupateco S |
| TI/PCH/5/MT48/3/WT*//NAR59/TOTA63/4/MUS | Mahdavi | (S) | Heines Kolben |
| BOW "S"/NKT "S" (CM67428-GM-LR-5M-3R-LB-Y) | Tajan | (S) | Heines Peko |
| SPN/MCD//CAM/3/NZR | Tos | (S) | TP981 |
| KVZ/TIL71/MAYA"S"//BB/INIA/4/KARAJ2/5/A | Shahriar | (S) | Bolani |
| TR8010200-29R-1R-6R-0R NZA/3/PI/NAR//HYS | Kohdasht | (R) | MV17 |
| TAN/VEE//OPATA | Zagross | | |
| Kauz "S" | Zagross | | |

### استخراج DNA پی سی ار

استخراج DNA از برگ گیاهان در مرحله دو برگچه‌ای و با استفاده از روش دلاپورتا (Dellaorta *et al*., 1998) صورت‌گرفت. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج A260 و A280 بررسی شد. با استفاده از سه جفت آغازگر نمونه‌ها مورد آزمایش PCR قرار گرفتند (جدول دو). اجزای PCR حاوی دو مایکرولیتر dNTP و ۲/۲۵ مایکرولیتر بافر، ۰/۲ مایکرولیتر Taq، دو مایکرولیتر آغازگر و همچنین پنج مایکرولیتر DNA نمونه (یک نانوگرم/ مایکرولیتر) بود. از پروفیل حرارتی PCR شامل مرحله ابتدای واسرشته‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه و ۴۵ سیکل شامل (واسرشته‌سازی در ۹۴ به‌مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۳۸ درجه به‌مدت یک دقیقه) و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به‌مدت هفت دقیقه استفاده شد.

جفت آغازگر براساس ساختار حفاظتی LZ-NBS-LRR ژن‌های Yr10 گندم، Mla جو، RPS2 و HRT آرابیدوپسیس تالیانا prf گوجه‌فرنگی و RX1 سیب‌زمینی طراحی شدند. جفت آغازگر P5-P4N براساس ساختار حفاظتی TIR-NBS-LRR ژن‌های L6 و M کتان و N توتون طراحی شدند.

جفت آغازگر P10-P2 براساس ساختار حفاظتی NBS-LRR ژن‌های $Cre_3$ گندم، $I_2$ گوجه‌فرنگی، $Bs_2$ فلفل طراحی شدند.

جدول ۲- لیست آغازگرهای RGA و توالی آن‌ها
Table 2. List of RGA primer and successions.

| توالی آغازگر<br>Succession of Primer | جهت<br>Direction | نام آغازگر<br>Name of Primer |
|---|---|---|
| GGIAAIACIACICTIGCI | F | P1 |
| IAGIGCIAGIGGIAGICC | R | P4N |
| CTTITTGTIGTGAT | F | P5 |
| IAGIGCIAGIGGIAGICC | R | P4N |
| ATCCTGGTGACIACICGI | F | P8 |
| ATGICGCAAGTTGATIAG | R | P10 |

### الکتروفورز و رنگ‌آمیزی

محصولات PCR در سیستم‌های مختلف الکتروفورز گردیدند. الکتروفورز اولیه به‌صورت افقی و در آگارز ۱٪ ، ولتاژ ۸۰ و به‌مدت ۴۵ دقیقه و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. به‌منظور وضوح و جداسازی بهتر باندها از الکتروفورز عمودی (Mod.Vss-1100) در ژل پلی‌اکریلامید و بافر TBE (1X) به‌مدت یک ساعت در ولتاژ ۲۴۰ استفاده گردید. جهت دستیابی به تفکیک بهتر باندها از الکتروفورز عمودی (POWER PAC 3000) حاوی ژل پلی‌اکریلامید ۶٪ و بافر TBE (1X) استفاده شد. پس از Pre Run کردن به‌مدت ۴۰ دقیقه در ولتاژ ۱۶۰۰، نمونه‌ها را در ولتاژ ۱۴۰۰ به‌مدت دو تا ۲/۵ ساعت run و با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی صورت گرفت.

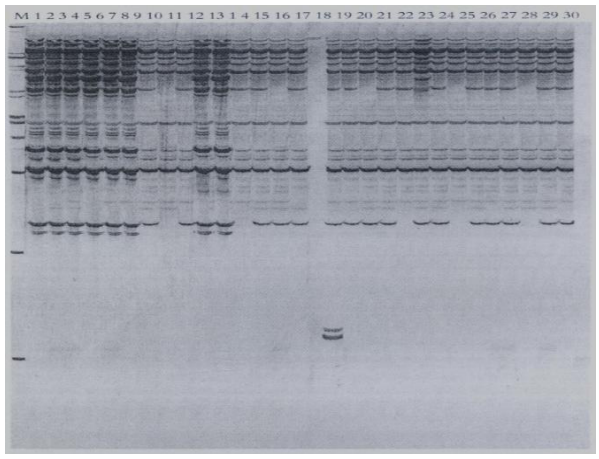
### آنالیز اطلاعات

شمارش باندها و رتبه‌بندی آن‌ها براساس وجود، یا عدم وجود باندها به‌ترتیب با ثبت اعداد یک و صفر انجام شد. تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش UPGMA انجام و دندروگرام تشابه ترسیم گردید.

### نتایج و بحث

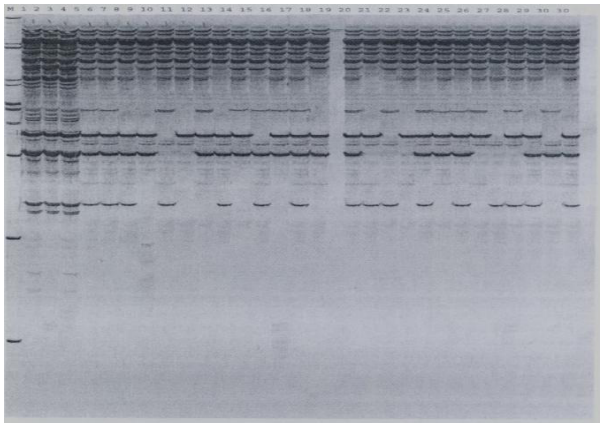
در ژل اگارز، به‌طور معمول اسمیری حدود bp ۱۰۰-۸ یا باندهی محدودی مشاهده گردید که اگر چه برای نمره‌دهی مناسب نبود، اما خود دلیلی بر موفقیت تکثیر ژنومی بود (Gupta *et al*., 2010). الکتروفورز پولی‌اکریل‌آمید در سیستم عمودی با ابعاد کوچک موجب بهبود نسبی باندهی گردید اما شرایط بهینه در سیستم بزرگ الکتروفورز (توالی‌یاب DNA) به‌دست آمد و توسط آن باندهای چندشکل متعددی از هر نشانگر آشکار شد (شکل یک، دو، سه). براین اساس مشخص گردید که بسیاری از باندها در سیستم عمودی کوچک هم‌پوشانی داشت و به‌درستی تفکیک نگردید. سیستم الکتروفورز توالی یاب DNA که مخصوص توالی‌یابی DNA می‌باشد، می‌تواند تفاوت‌هایی تا یک نوکلئوتید را مشخص نماید. تا دو دهه گذشته، برای جداسازی محصولات PCR بر پایه نشانگرهای RGA فقط از ژل آگارزو RFLP استفاده می‌شد، بنابراین هتروژن بودن یک باند منفرد حاصل از ژل آگارز مکرراً گزارش می‌گردید (Wu *et al*., 2004). آنالیز باندهای به‌دست آمده نشان داد که سه نشانگر RGA توانستند چندشکلی بالایی ایجاد کنند. این سه نشانگر در

مجموع ۱۴۸۶ باند اصلی تکثیر نمودند که ۴۲-۳۳ درصد آن‌ها چندشکل بودند. بالاترین تعداد باند و بیش‌ترین درصد باندهای چندشکل توسط نشانگر P810 ایجاد گردید (شکل یک، دو، سه).



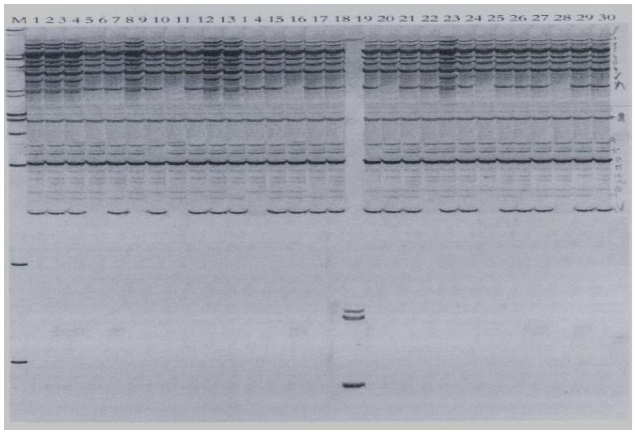

شکل ۱- الگوی نواربندی قطعات تکثیر شده براساس آغازگر P54N

Fig. 1. Banding patterns amplified fragment-based primer P54N.



شکل ۲- الگوی نواربندی قطعات تکثیر شده براساس آغازگر P810

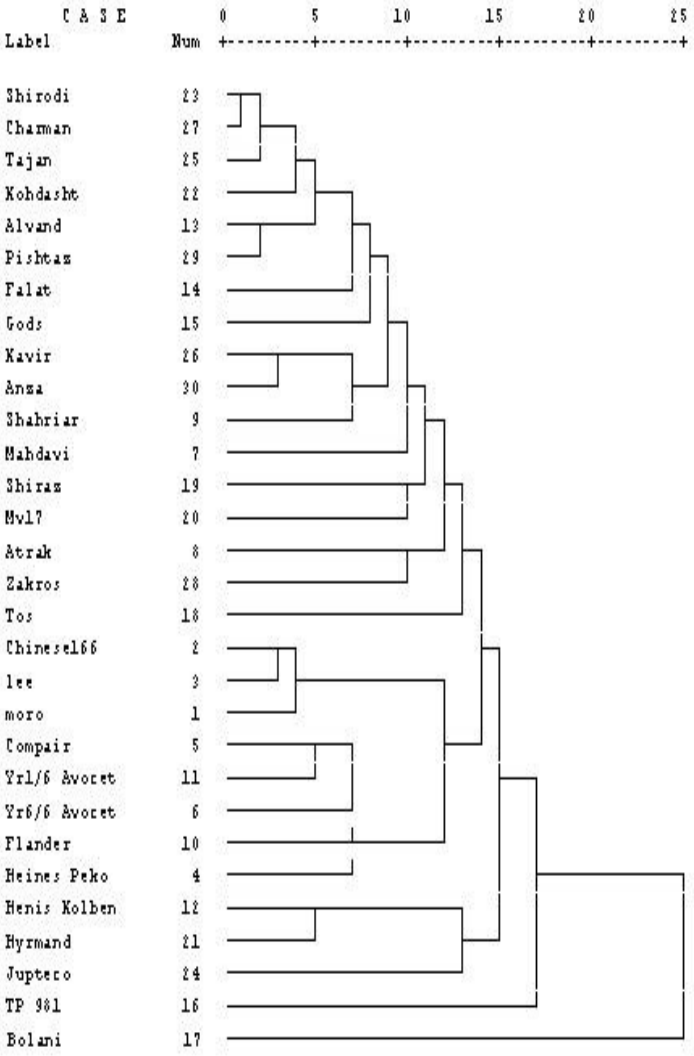
Fig. 2. Banding patterns amplified fragment-based primer P810




شکل ۳- الگوی نواربندی قطعات تکثیر شده براساس آغازگر P14N

Fig. 3. Banding patterns amplified fragment based on the P14 primer.

دندوگرام براساس ضریب تشابه جاکارد ترسیم شد. مطالعه اولیه دندوگرام نشان می‌دهد که ارقام اصلاح شده در ایران و خارج (به‌جز چند رقم که ذکر آن خواهد آمد)، در دو کلاستر مجزا تفکیک شدند (شکل چهار).




شکل۴- دندوگرام تعیین میزان خویشاوندی بین ژنوتیپ‌های، با استفاده از ضریب تشابه جاکارد

Fig. 4. Cluster analysis to determine the relationship between genotypes by using Jaccard coefficient

علت تفکیک ژنتیکی ارقام خارجی و داخلی را می‌توان ناشی از فشار انتخاب بر روی ژن‌های مقاومت محلی دانست، بدین‌ترتیب‌که در هر کشور، در طی برنامه‌های اصلاحی، ژن‌های مقاومتی انتخاب و تقویت شدند؛ که علیه نژادهای فیزیولوژیک بیمارگرهای آن منطقه موثر بودند (Ferdinande *et al*., 2015)، بنابراین قرارگرفتن ارقام ایرانی در یک کلاستر جداگانه می‌تواند به‌دلیل قرابت ژنتیکی آن‌ها ناشی از وجود مجموعه ژن‌های مقاوم مشترک باشد. بنابراین نشانگر RGA می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی ارقام گندم باشد. با وجود تفکیک ارقام ایرانی و خارجی دو رقم انزا و هیرمند از این تقسیم تبعیت نمی‌کنند. بدین ترتیب که رقم ایرانی هیرمند در کلاستر ارقام خارجی، دو رقم انزا و

هیرمند از این تقسیم‌بندی تبعیت نمی‌کنند. بدین ترتیب که رقم هیرمند در کلاستر ارقام خارجی و در کنار jupateco S واقع گردید.

بررسی شجره این رقم نشانگر وجود Jupateco S در آن می‌باشد و احتمالا رقم هیرمند به‌دلیل قرابت ژنتیکی در کنار آن قرارگرفته است. وجود رقم انزا در کنار کلاستر ارقام ایرانی و در کنار رقم شهریار نیز ممکن است به‌دلایل مشابهی باشد، زیرا رقم انزا جزو شجره شهریار است. در این تحقیق با استفاده از اطلاعات موجود، صفات مرفولوژیکی ژنوتیپ‌های ایرانی، همچون تیپ رشدی، حساسیت به سرما، حساسیت به ریزش و همچنین اجداد ارقام با الگوباندی آن‌ها مورد مقایسه قرارگرفت و مشخص شد در بسیاری از ژنوتیپ‌ها که صفات مورد بررسی مشابه دارند؛ همگی در یک زیرگروه قرارگرفتند. بررسی کلاستر ارقام ایرانی نشان می‌دهد که جایگاه اکثر ارقام در درون کلاستر تابع روابط خویشاوندی می‌باشد. به‌عنوان مثال رقم شیرودی و چمران که در یک زیرگروه قراردارند؛ از نظر صفات مرفولوژیکی مورد بررسی یکسان بودند و در بررسی اجداد آن‌ها مشخص شد هر دو از Attila اصلاح گردیدند. رقم پیشتازکه درکنار الوند واقع شده، ریشه از آن گرفته است. در مورد ارقام Gods و Falat که در یک زیر کلاستر جا دارند؛ علاوه بر شباهت صفات مورد بررسی دارای اجداد مشترک BB و KAL می‌باشند.

کویر که در کنار قدس قرارگرفته در شجره KAL با آن مشترک است نزدیکی شهریار و انزا می‌تواند به‌دلیل این باشد که انزا در شجره آن بود، و مهدوی و شهریار در کنار هم هستند، دارای جد مشترک NAR می‌باشند. برخی محققان نیز نتایج مشابهی گزارش نمودند (حلاجیان، ۱۳۸۸؛ معالی‌امیری، ۱۳۸۹).

## نتیجه‌گیری کلی

سه رقم ایرانی اترک، طوس و زاگرس رابطه خویشاوندی خاصی نداشته و در انتهای کلاستر ارقام ایرانی واقع شدند. نتایج حاصله حاکی از تطابق مناسب بین صفات مرفولوژیکی و تنوع ژنتیکی می‌باشد.

نتایج مشابهتی مبنی بر تفکیک موفق ارقام مختلف جو، گندم و برنج بر پایه شجره توسط RGA گزارش‌گردید. در جو، تکنیک RGA ارقام پوشینه‌دار را از بدون پوشینه، تفکیک نمود. همچنین ارقام برنج *Oryza sativa japonica* به‌طور کامل از *O. Sativa indica* توسط این تکنیک تفکیک شدند. بررسی دندروگرام تشابه جاکارد نشان داد گرچه ارقام در خوشه‌های مجزایی دسته‌بندی نگردیدند. کلیه ارقام حساس به زنگ زرد در کنار هم در انتهای دندروگرام قرارگرفتند. در مجموع نتایج مبین کارایی تکنیک RGA در بحث بررسی تنوع ژن‌های مقاومت است.

## منابع References


**حلاجیان، ط. ۱۳۸۸.** نشان‌مندکردن ژن یا ژن‌های مقاومت به زنگ زرد در گندم با استفاده از نشانگرهای مولکولی RGAP و RAPD. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی. دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۱۰ صفحه.

**خدابنده، ن. ۱۳۷۸.** غلات. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۰۶ صفحه. چاپ چهارم.

**معالی‌امیری، ر. ۱۳۸۹.** پلی‌مورفیسم ارقام مختلف گندم با استفاده از تکنیک RAPD-PCR. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۲۰ صفحه.

**یزدی‌صمدی، ب و عبدمیشانی، س. ۱۳۸۲.** اصلاح نباتات زراعی. انتشارات مرکز دانشگاهی. ۲۸۳ صفحه.

**Alard, R.W. 2016.** Genetic changes associated with the evolution of adapted ness in cultivated plants and their wild progenitors. J. Hered. 79(2): 225-238.

**Chen, X.M., Line, R.F., and Leung, H. 2009**. Genome scanning for resistance gene analogue in rice, barley and wheat by high resolution electrophoresis. Theory. Apply. Genet. 97: 345-355.

**Dellaorta, S.C., Wood, F., and Hicks, J.B. 1998**. A Plant DNA Mini Preparation: Version II. Plan. Mol. Bio Reporter. 1(4): 19-21.

**Dezhsetan, S., Mohammadi, S.A., Moghaddam, M., Aharizah, S., and Vossen, J.H. 2014**. Isolation of Resistance Gene Analogues (RGAs) in Potato Using Motif directed Profiling Method and Development of Their Genetic Map. Journal of Plant Improvement. 26(1):105-123.

**Ferdinande, Y.S.N., Somers., D.Y., and Coulman, B.E. 2015.** Estimating the genetic relationship of hybrid bromgrass using RAPD markers. Plant Breeding Journal. 120(3): 140-153.

**Foroni, I., Woeste, K., Monti, L.M., and Rao, R. 2007.** Identification of Sorrento walnut using simple sequence repeats (SSRs). Genet Resource Crop 54(2): 1081-1094.

**Gupta, P.K., and Varshney, R.K. 2010.** Development and use of micro satellite marker for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica Journal. 3(2):163-185.

**Jahal, G.S., and Brigg, S.P. 2008.** Reeducate activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. Plant Science. 258: 985-987.

**Lefebvre, V., and Chevre, A.M. 2013.** Tools for marking plant disease and Pest resistance gene review. Agronomica Journal. 15(3): 3-19.

**Macfadden., H.G., Lehmenisek, A., and Lagudah. E.S. 2006.** Resistance Gene Analogues of wheat: molecular genetic analysis of ESTs. Theory. Appl. Genet. 24: 125-139.

**Paterson, A.H., Tanksley, S.D., and Serrells, M.E. 2011**. DNA marker in plant improvement. Botany and Agronomy. 46(4): 39-90

**Sela, H., Cheng, J., Jun, Y., Nevo, E., and Fahima, T. 2009**. Divergent diversity patterns of NBS and LRR domains of resistance gene analogs in wild emmer wheat populations. .Appl. Genet. 9(4): 25-35.

**Wu, J., Leung., H., and Zheng, K. 2004**. RAPD identification of resistance gene analogs linked to two blast resistance .Biotechnology Department, China 1st National Rice Institute, Hangzhou. China. 111 pp.

**Zhuhang, J.Y., FAN, Y.Y., Leung, H., and Zheng., K.L. 2012**. Comparison of RGA and RFLP markers for determining the genetic relationship in rice. .Appl. Genet. 10(2): 156-196.

.