

## مکان‌یابی دقیق ژن مقاومت به زنگ زرد Yr15 در گندم دوروم

### Fine Mapping of Stripe Rust Resistance Gene Yr15 in Durum Wheat

بابک عبدالمهدی مندولکانی<sup>۱</sup>، محمدرضا بی‌همتا<sup>۲</sup>، عباسعلی زالی<sup>۳</sup>،  
بهمن یزدی صمدی<sup>۴</sup>، محمدرضا تقوی<sup>۳</sup> و آلان شولمن<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج
- ۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج
- ۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج
- ۴- استاد، موسسه بیوتکنولوژی دانشگاه هلسینکی، فنلاند

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۵/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۹/۱

#### چکیده

عبدالمهدی مندولکانی، ب. بی‌همتا، م. زالی، ع. یزدی صمدی، ب. تقوی، م. ر. و شولمن، ا. ۱۳۸۷. مکان‌یابی دقیق ژن مقاومت به زنگ زرد Yr15 در گندم دوروم. نهال و بذر ۲۴: ۳۸۷ - ۳۷۱.

زنگ زرد از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گندم است که در تمامی قاره‌ها و بیش از ۶۰ کشور جهان گزارش شده است. گندم وحشی امر *Triticum dicoccoides* به عنوان جد تترابلوئید گندم زراعی از منابع با ارزش برای ژن‌های مقاومت به زنگ زرد برای اصلاح گندم محسوب می‌شود. نمونه جی ۲۵ (G<sub>25</sub>) از این گونه دارای ژن Yr15 است که به ۳۱ نژاد زنگ زرد مقاومت نشان می‌دهد. این ژن روی کروموزوم 1BS مکان‌یابی شده است. به عنوان اولین قدم جهت همسانه سازی این ژن براساس نقشه، مکان‌یابی دقیق آن با استفاده از یک جمعیت F<sub>2</sub> شامل ۸۲۵ فرد انجام شد. با توجه به حضور رتروترنسپوزون‌ها در نواحی یوکروماتین و اطراف ژن‌ها، عمدتاً از نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها استفاده شد. سه نشانگر SSR، سه نشانگر IRAP و هفت نشانگر REMAP با فاصله کمتر از ۲ سانتی‌مورگان با ژن شناسایی و نقشه ژنتیکی اطراف ژن اشباع شد. برخی نشانگرها در سمت سانترومری ژن تفرق همزمان داشتند. یکی از نشانگرهای IRAP و دو نشانگر REMAP به نشانگرهای اختصاصی و همباز تبدیل شدند که نشانگر اختصاصی و همباز SC792 با ژن تفرق همزمان داشت. نشانگرهای اختصاصی و همباز SC1600 و SC1028 ژن را در فاصله یک سانتی‌مورگان احاطه می‌کردند. این نشانگرها می‌توانند برای گزینش به کمک نشانگر و همسانه سازی براساس نقشه این ژن استفاده شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای رتروترنسپوزونی برای مکان‌یابی دقیق ژن‌های کنترل کننده صفات مهم زراعی می‌توانند بسیار مفید باشند.

واژه‌های کلیدی: گندم دوروم، Yr15، مکان‌یابی دقیق، IRAP، REMAP.

نویسنده مسئول: delbabak@yahoo.com

## مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول غذایی در جهان است که تقاضا برای آن در سال ۲۰۲۰ میلادی به مقدار ۴۰ درصد بیش از سطح فعلی تقاضا پیش‌بینی شده است. این در حالی است که منابع در دسترس برای تولید گندم با محدودیت مواجه است. با توجه به این چشم‌انداز، در حال حاضر در کشورهای در حال توسعه تلاش زیادی برای افزایش تولید گندم به عمل می‌آید که از نظر اهمیت همانند کوشش‌های سه دهه پیش و دوران آغاز انقلاب سبز است (Anonymous, 2005).

در بین تنش‌های مختلف، تنش‌های زنده تحمیلی به گندم از جمله بیماری‌ها باعث کاهش قابل ملاحظه در عملکرد گندم می‌شوند که در بین این بیماری‌ها زنگ‌ها بیشترین خسارت را به این محصول وارد می‌کنند. زنگ زرد که عامل آن قارچ *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* است، مهم‌ترین بیماری گندم در نواحی خنک و مرطوب محسوب می‌شود. کاهش تا ۴۰ درصدی عملکرد در اثر این بیماری معمول است (Chen, 2005). در ایران ۸۰ درصد از کل زمین‌های زیر کشت گندم یعنی ۴/۴ میلیون هکتار استعداد اپیدمی زنگ زرد دارند (Singh et al., 2004).

موثرترین راهکار ایجاد مقاومت برای این بیماری استفاده از ژن‌های مقاومت تمام مرحله‌ای در رقمی با زمینه متوسطی از مقاومت کمی است

(Ghannadha, 1996; Chen, 2005). گندم

تتراپلوئید وحشی *Triticum dicoccoides* یکی از غنی‌ترین منابع اصلاح گندم به ویژه برای مقاومت به زنگ زرد است. گرچتسر-آمیتسای و استابز (Gerechter-Amitai and Stubbs, 1970)

یکی از نمونه‌های بسیار مقاوم این گونه به نام جی ۲۵ (G25) را در فلسطین اشغالی شناسایی کردند که مقاومت بالایی را در مراحل گیاهچه‌ای و بلوغ به زنگ زرد نشان می‌داد. مطالعات بعدی توسط همین گروه وجود ژن غالب *Yr15* را در این نمونه نشان داد. انتقال این ژن به گندم تراپلوئید و هگزاپلوئید زراعی مقاومت آن را به ۳۱ نژاد زنگ زرد در گندم نشان داد (Gerechter-Amitai et al., 1989). مکی‌تاش و همکاران (McIntosh et al., 1996) با استفاده از روش‌های سیتوژنتیکی نشان دادند که این ژن روی کروموزوم 1BS قرار دارد. سان و همکاران (Sun et al., 1997) در مکان‌یابی اولیه، دو نشانگر RAPD و RFLP را در فاصله ۲۷ و ۱۱ سانتی‌مورگانی این ژن شناسایی کردند. چاگو و همکاران (Chague et al., 1999) دو نشانگر RAPD و SSR را در فاصله ۱۲ سانتی‌مورگانی این ژن شناسایی کردند. پنگ و همکاران (Peng et al., 2000) اقدام به مکان‌یابی دوباره این ژن و ژن *YrH52* کرده و نشان دادند که این دو ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم 1B قرار گرفته‌اند. آن‌ها گزارش

(Huang et al., 2003؛ Stein et al., 2000)؛ Mago et al., 2005؛ Ling et al., 2003؛ RGAP (Kota et al., 2006) و (Yan et al., 2003) برای مکان‌یابی دقیق ژن‌های مقاومت به زنگ در گندم استفاده شده است. اگرچه این نشانگرها ابزاری مناسب برای این هدف هستند ولی برخی زمان‌بر و دارای چندشکلی کمتری هستند و قادر به شناسایی نشانگرهای بسیار نزدیک با ژن‌های مقاومت نبوده‌اند. در سال‌های اخیر نشانگرهایی بر اساس توالی‌های رتروترانسپوزونی در ژنوم توسعه داده شدند (Waugh et al., 1997)؛ (Kalendar et al., 1999). رتروترانسپوزون‌ها توالی‌های متحرک تکراری در ژنوم هستند که برخلاف ترانسپوزون‌ها کپی‌های خود را از طریق ساختن cDNA در ژنوم درج می‌کنند و خودشان از محل اولیه‌شان در ژنوم بریده نمی‌شوند. این نشانگرها تکرارپذیر، ساده و چندشکلی بسیار زیادی نشان می‌دهند. در برخی مطالعات ۲۵ درصد چندشکلی بیشتری در مقایسه با AFLP نشان داده‌اند (Yu and Wise, 2000؛ Waugh et al., 1997). توزیع تصادفی و تعداد متغیر نسخه رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم استفاده از آن‌ها را به عنوان نشانگرهای ملکولی کارا میسر می‌سازد. همچنین بسیاری از مطالعات توالی‌یابی ژنومی حاکی از توزیع و حضور وسیع رتروترانسپوزون‌ها در نواحی یوکروماتینی و اطراف ژن‌ها است، بنابراین شناسایی نشانگرهای

کردند که به خاطر کوچک بودن جمعیت مورد استفاده، ترتیب و فاصله نشانگرها با نتایج مطالعات قبلی مطابقت نداشته و جهت مکان‌یابی دقیق و مطمئن، نیاز به جمعیت‌های بزرگ‌تر و استفاده از افراد دارای نوترکیبی در اطراف ژن *Yr15* است.

در گندم به طور متوسط هر سانتی مورگان ۴/۴ میلیون جفت باز (Mbp) برآورد شده است. این مقدار در نواحی مختلف ژنوم بسیار متغیر بوده و در برخی نواحی ژنومی با نوترکیبی بالا ممکن است کمتر باشد (Gill et al., 1996 a and b؛ Sandhu and Gill, 2002)، ولی به نظر می‌رسد که هر سانتی مورگان در قطعه حاوی ژن *Yr15* که از گونه *T. dicoccoides* به گندم دوروم و نان وارد شده است بیشتر از حتی مقدار متوسط باشد چون غالباً در تلاقی‌های دور، به ویژه در ژنوم B نسبت نوترکیبی کاهش می‌یابد. بر این اساس اندازه قطعه حامل ژن *Yr15* بین دو نشانگر براساس مطالعه چاگو و همکاران (Chague et al., 1999) در حدود ۶۰ میلیون جفت باز و حتی بیشتر برآورد می‌شود (هر سانتی مورگان ۵ میلیون جفت‌باز در نظر گرفته شده است)، بنابراین جهت تسهیل گزینش به کمک نشانگر و همسانه سازی براساس نقشه این ژن، نیاز به نشانگرهای خیلی نزدیک‌تر و استفاده از جمعیت‌های بزرگ‌تر است.

نشانگرهای مختلفی مانند SSR، RFLP، AFLP، EST

تلاقی برگشتی  $G_{25}$  با  $DW_1$  حاصل شده‌اند) بودند. جمعیت مورد استفاده برای مکان‌یابی، ۸۲۵ فرد  $F_2$  حاصل از تلاقی لاین‌های تقریباً ایزوژنیک ( $B_{10}$  و  $B_9$  (Near Isogenic Line) با  $DW_1$  بود. یعنی این جمعیت عمدتاً برای قطعه حامل ژن  $Yr15$  تفرق نشان می‌داد. استخراج DNA طبق روش CTAB با تیمار RNaseA انجام شد (Ausubel *et al.*, 1995). تعداد ۶۰۰ فرد از این جمعیت  $F_2$  ابتدا براساس نشانگرهای  $Xgwm911$  و  $Xgwm18$  غربال شده و افراد نوترکیب برای فاصله بین این دو نشانگر انتخاب شدند. این دو نشانگر احاطه کننده ژن  $Yr15$  با حد فاصل ۲۳ سانتی‌مورگان بودند (Peng *et al.*, 2000). با استفاده از افراد نوترکیب در این فاصله به عنوان جمعیت در حال تفرق، دو نشانگر  $Xgwm413$  و  $Xbarc8$  معرفی شدند. این دو نشانگر احاطه کننده ژن با حد فاصل ۲/۷ سانتی‌مورگان بودند. بقیه افراد جمعیت (۲۲۵ فرد) براساس دو نشانگر  $Xbarc8$  و  $Xgwm413$  که در مرحله قبل شناسایی شدند غربال شده و افراد نوترکیب برای این فاصله شناسایی شدند. ده بذر  $F_3$  از هر کدام از افراد نوترکیب  $F_2$  براساس جفت نشانگرهای مربوطه غربال شده و یک فرد نوترکیب هموزیگوس از بین آن‌ها انتخاب و برای مکان‌یابی دقیق استفاده شد. هشت بذر  $F_4$  از هر کدام از نوترکیب‌های هموزیگوس  $F_3$  با نژاد 38E134 (این نژاد روی ژن‌های  $Yr2$ ،  $Yr6$ ،  $Yr7$  و  $Yr9$  بیماریزاست) زنگ زرد در مرحله گیاهچه‌ای آلوده شد و

بسیار نزدیک با ژن‌های مهم زراعی با استفاده از این نشانگرها امکان‌پذیر است (Kumar and Bennetzen, 1999). از معروف‌ترین این نشانگرها می‌توان به IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism Retrotransposon-Microsatellite) و REMAP (Amplified Polymorphism Retrotransposon-Microsatellite) اشاره کرد. هر دو این نشانگرها چندشکلی را در نواحی ادغام رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم شناسایی می‌کنند. به طوری که IRAP نواحی بین رتروترانسپوزون‌ها و REMAP نواحی بین رتروترانسپوزون‌ها و توالی‌های ریزماهواره را تکثیر می‌کند. در این مطالعه هدف توسعه نشانگرهای رتروترانسپوزونی در گندم، استفاده از آن‌ها برای اولین بار جهت شناسایی نشانگرهای بسیار نزدیک (کمتر از یک سانتی‌مورگان) با ژن  $Yr15$  و تبدیل این نشانگرها به نشانگرهای اختصاصی و در صورت امکان همبارز جهت استفاده در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و همسانه‌سازی براساس نقشه این ژن بود.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی

مواد گیاهی شامل لاین دهنده ژن  $Yr15$ ،  $T. dicoccoides$   $G_{25}$  LDN، لاین‌های دوروم  $DW_1$  و حساس به زنگ زرد و فاقد ژن  $Yr15$  و لاین‌های  $B_9$  و  $B_{10}$  (لاین‌های  $BC_3F_9$ ) دارای ژن  $Yr15$  در زمینه ژنتیکی  $DW_1$  (که از طریق

ژل آگارز ۲ درصد زلوت لاین شرکت بیوزایم (Resolute<sup>TM</sup> line Biozyme) با ولتاژ ۹۰ و بافر STBE (Kalendar and Schulman, 2006) یک برابر انجام شد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای نشانگر ریزماهواره Xgwm413 که اختلاف آلل مقاومت و حساسیت دو جفت باز بود محصولات تکثیری با استفاده از دستگاه توالی‌یاب ABIprism-3130 XL تفکیک شده و اندازه قطعات در نمونه‌های مختلف برآورد شد. برای این کار آغازگر رفت با استفاده از رنگ فلورسنت فم (Fam) نشاندار شد و یک میکرولیتر از محصولات با ۴۰ میکرولیتر فرماید و ۰/۱ میکرولیتر از استاندارد GS120 LI2<sup>TM</sup> مخلوط شده و در دستگاه بارگذاری شد. کشف پیک‌ها و سیگنال‌های فلورسنت با استفاده از نرم افزار PeakScanner نسخه یک (Applied Biosystems) انجام شد.

#### نشانگرهای IRAP و REMAP

تعداد ۲۰۰ آغازگر IRAP و ۴۲۰ ترکیب آغازگری REMAP (حاصل از ترکیب ۴۲ آغازگر مبتنی بر توالی‌های ریزماهواره با ۱۰۰ آغازگر IRAP) در والدین جهت شناسایی نشانگرهای چندشکل به طور بالقوه پیوسته با ژن Yr15 مورد ارزیابی قرار گرفتند. برخی از آغازگرهای IRAP و ترکیبات آغازگری REMAP الگوی نواری واضحی تولید نکردند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، الکتروفورز و رنگ

آزمون مقاومت و حساسیت (وجود یا عدم وجود ژن Yr15) براساس روش گرچتر-آمیتای و همکاران (Grechter-Amitai et al., 1989) انجام شد.

#### نشانگرهای ریزماهواره

آغازگرهای ریزماهواره Xgwm413، Xgwm133، Xwmc406، Xwmc216، Xbrc8 و IBS که همگی روی کروموزوم IBS و بین دو نشانگر ریزماهواره Xgwm18 و Xgwm911 قرار دارند، مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نشانگرهای ریزماهواره در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل بافر یک برابر با یوتولز (BioTools) با ۲ میلی‌مول MgCl<sub>2</sub>، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۲۵ میکرومول از هر آغازگر و یک واحد آنزیم تک (Taq) پلی‌مرز شرکت بیوتولز در ترموسایلر PTC-100 Programmable Thermal Controller انجام شد. برنامه دمائی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نشانگرهای ریزماهواره شامل ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، سپس ۳۴ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه (واسرشت‌سازی)، ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه (اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه (بسط) و بسط نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری در همه نشانگرهای ریزماهواره به جز Xgwm413 با استفاده از

هر نشانگر بود. چرخه دمایی شامل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه، ۲۳ چرخه شامل ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه (اتصال آغازگر)، ۷۲ درجه به مدت ۱۰ تا ۱۲۰ ثانیه بسته به اندازه قطعه اتصالی (بسط) و بسط نهایی به مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه بود. محصولات با استفاده از ژل آگارز ۱/۶ درصد تفکیک شدند. ۱۵ میکرولیتر از کلونی های صحیح در محیط LB با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین در دمای ۳۷ درجه روی شیکر به مدت ۱۲ ساعت رشد داده شدند. پلاسمیدها با کیت Miniprep, QIAprep<sup>®</sup> spin شرکت کیاژن خالص سازی و توالی یابی با آغازگرهای UP(5'CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT3') و RP (3'TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC3') در دستگاه توالی یاب ABI3700 انجام شد. آغازگرهای اختصاصی برای توالی ها طراحی شدند و دوباره روی والدین و جمعیت در حال تفرق ارزیابی شدند تا از صحت قطعه همسانه شده اطمینان حاصل شود.

#### تجزیه داده ها

نقشه پیوستگی با استفاده از نرم افزار MapMaker (Lander *et al.*, 1987) تهیه شد. فاصله نشانگرها از ژن بدون استفاده از تابع نقشه یابی محاسبه شد (بدلیل نزدیکی نشانگرها تعداد نوترکیبی مستقیما به فاصله ژنتیکی تبدیل شد). جهت طراحی آغازگر از نرم افزار

آمیزی طبق روش کلندر و شولمن (Kalendar and Schulman, 2006) انجام شد.

#### تبدیل نشانگرهای با فاصله خیلی نزدیک با ژن

##### Yr15 به نشانگرهای اختصاصی

یک نشانگر IRAP و چهار نشانگر REMAP که نزدیک ترین فاصله را با ژن داشتند جهت تبدیل به نشانگرهای اختصاصی انتخاب شدند. نشانگر RE443-495 با ژن کاملاً پیوسته بود. دیگر نشانگرها که فاصله نزدیکی با ژن داشتند عبارت بودند از JR2107، RE440-679، RE438-483 و RE443-834. برای تولید نشانگرهای اختصاصی، نوارهای مربوطه از ژل بریده شده و با استفاده از کیت استخراج از ژل MinElite<sup>™</sup> شرکت کیاژن (QiaGen) خالص سازی شدند. همسانه سازی با ناقل pGEM<sup>®</sup>-T و تراریزش با سلول های JM109 در محیط کشت LB با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین و حاوی ۴۴ میکرولیتر مخلوط IPTG + Xgal (۴۰ میکرولیتر Xgal و ۴ میکرولیتر IPTG به ترتیب با غلظت های ۲۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) انجام شد. کلونی های نوترکیب در ۲۰۰ میکرولیتر محلول ذخیره کلونی شامل 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH, 7 حل شدند و دو میکرولیتر از آنها با استفاده از آغازگرهای مربوط به هر نشانگر در واکنش ۲۰ میکرولیتری زنجیره ای پلیمرز تست شدند. اجزای واکنش مطابق واکنش اصلی برای

*Xbarc8*، چندشکل بین والدین و به طور بالقوه با ژن پیوسته بودند. نشانگر *Xgwm413* در سمت سانترومری، ۱۰ نوترکیبی (۱/۲۲) سانتی مورگان) با ژن نشان داد. نشانگرهای *Xbarc8* و *Xwmc406* در طرف تلومری کروموزوم 1BS، به ترتیب ۱۱ (۱/۳۵ سانتی مورگان) و ۱۵ نوترکیبی (۱/۸۵ سانتی مورگان) با ژن نشان دادند. بدین ترتیب *Xgwm413* نزدیکترین نشانگر ریزماهواره به ژن بود که ال مقاومت در لاین‌های B<sub>9</sub> و B<sub>10</sub>، ۹۲ جفت باز، ولی در لاین‌های حساس DW<sub>1</sub> و LDN، ۹۴ جفت باز بود.

#### نشانگرهای IRAP و REMAP

از ۲۰۰ آغازگر IRAP مورد استفاده، ۲۸ آغازگر چندشکلی به طور بالقوه پیوسته با ژن ایجاد کردند. غربال افراد نوترکیب با آن‌ها جهت به دست آوردن فاصله ژنتیکی دقیق و شناسایی نشانگرهای فوق‌العاده نزدیک، نشان داد که سه نشانگر IR2107، IR517 و IR833 در فاصله کمتر از یک سانتی مورگانی ژن قرار داشتند. نشانگر IR2107 با ۶ نوترکیبی نسبت به ژن (۰/۷۳ سانتی مورگان) در سمت تلومری، نزدیکترین نشانگر IRAP بوده و نشانگرهای IR517 و IR833 به ترتیب با ۲ (۰/۲۴ سانتی مورگان) و ۷ (۰/۸۵ سانتی مورگان) نوترکیبی در سمت سانترومری قرار داشتند. معمولاً نشانگرهای IRAP قطعاتی بین ۴۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تولید کردند.

FastPCR (Kalendar, 1998-2007) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به نشانگر *Xgwm413* از نرم افزار PeakScanner نسخه یک استفاده شد.

#### نتایج و بحث

#### غربال جمعیت F<sub>2</sub> برای شناسایی افراد

#### نوترکیب

ابتدا ۶۰۰ فرد جمعیت F<sub>2</sub> با استفاده از نشانگرهای *Xgwm911* در طرف تلومری و *Xgwm18* در طرف سانترومری ژن غربال شد و افراد نوترکیب در این فاصله براساس این نشانگرها شناسایی و برای توسعه نشانگرهای ریزماهواره استفاده شدند. این دو نشانگر توسط پنگ و همکاران (Peng et al., 2000) شناسایی شده و ژن *Yr15* را با حد فاصل ۲۳ سانتی مورگان احاطه می کردند. البته جمعیت مکان‌یابی برای آن مطالعه کوچک بوده (۱۲۳ فرد) و این فاصله نمی تواند دقیق باشد. ولی به هر حال امکان شناسایی افراد دارای نوترکیبی در اطراف ژن براساس این دو نشانگر امکان پذیر بود. تعداد ۲۲۵ فرد دیگر برای دو نشانگر *Xbarc8* و *Xgwm413* که در مرحله قبل توسعه داده شدند غربال شده تا ناحیه حامل ژن جهت جستجوی نشانگرهای نزدیک تر محدودتر شود. با استفاده از این دو نشانگر فاصله حامل ژن به ۲/۷ سانتی مورگان محدود شد.

#### نشانگرهای ریزماهواره

از بین نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده، سه نشانگر *Xgwm413*، *Xgwm406* و

همزمان داشت و یک قطعه ۷۹۰ جفت بازی را در افراد مقاوم تولید می کرد. فواصل ژنتیکی و تعداد نوترکیبی دیگر نشانگرهای REMAP در جدول ۱ نشان داده شده است. نشانگرهای REMAP معمولاً قطعاتی بین ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تولید کردند. لازم به ذکر است که برخی آغازگرهای IRAP و تعداد زیادی ترکیب آغازگری REMAP بیش از یک نوار چندشکل به طور بالقوه پیوسته با ژن

از بین ۴۲۰ ترکیب آغازگری REMAP مورد استفاده، ۸۰ آغازگر چندشکلی به طور بالقوه پیوسته با ژن بین والدین تولید کرده که استفاده از افراد نوترکیب جهت محاسبه فاصله دقیق ژنتیکی نشان داد که هفت نشانگر RE438-483، RE443-834، RE443-495، RE440-679، RE426-455، RE459-516 و RE425-2113 نزدیک ترین نشانگرهای REMAP نسبت به ژن هستند (با فاصله ژنتیکی کمتر از ۱/۵ سانتی مورگان). نشانگر RE443-495 نزدیک ترین نشانگر بود و کاملاً با ژن تفرق

بین والدین تولید کردند.

جدول ۱- نشانگرهای پیوسته با ژن *Yr15*

Table 1. Molecular markers linked to gene *Yr15*

نشانگر Marker	فاصله ژنتیکی Genetic distance	تعداد نوترکیبی Number of recombinations	اندازه قطعه Fragment size	موقعیت نشانگر Marker position	توالی (۵'-۳') Sequence (5'-3')
SC792	0.00	0	792	Co-segregated	acacacacacacacact tctgcacttgaggcccaac
SC1028	0.24	2	1028	Proximal	cctcgttggttcgacactctaacacaca cactctctagttagggact
IR-517	0.24	2	1900	Proximal	tgtcctcgttgggatcgac aacaacgtcagtcgggttagtacacaca
SC776	0.60	5	776	Proximal	cacacgtgtcgag caccaccaccaccactttgaattt
RE426-455	0.60	5	1300	Proximal	ctgctacttcccc
SC1600	0.73	6	1600	Distal	catgatgcaaaatggacgtatcagaaagc atgatgcaaaatggacgtatcact
SC326	0.85	7	326	Proximal	gcatattggcgctgacacgtacacacaca cacaccgatagtcga
IR833	0.85	7	1470	Proximal	Tgatcccctactctgtgggtca
RE425-2113	1.22	10	970	Proximal	cacacacacacacacagtagcat ccgtgcccgaac
RE459-516	1.22	10	1500	Proximal	tgctgctgctgctgctcctcctgctggg atcgactcc
<i>Xgm413</i>	1.22	10	92	Proximal	tgcttctagattgcttgggatcgtctcg tccttggca
<i>Xbarc8</i>	1.47	12	223	Distal	gcgggaatcatgatagaaacagaag cgggggcgaacatacataaaaaaca
<i>Xwmc406</i>	1.97	16	217	Distal	tatgagggtcggatcaataacaggttta ctgcaacaatgg

۱. برای نشانگرهای REMAP و SCAR توالی اول و دوم به ترتیب آغازگرهای رفت و برگشت هستند.

1. For REMAP and SCAR markers, the first and second sequence are forward and reverse primer sequences, respectively.

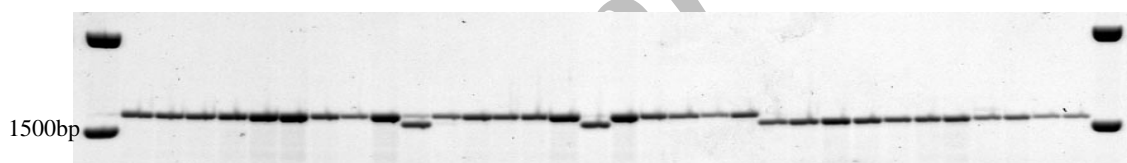


به ترتیب قطعاتی با اندازه‌های ۱۶۰۰، ۷۹۲ و ۱۰۲۸ جفت‌باز در افراد مقاوم تولید کردند و به ترتیب SC1600، SC792 و SC1028 نامیده شدند (SC مخفف SCAR است) و در جمعیت نوترکیب نیز مانند نشانگرهای اصلی که از آن منشا گرفته بودند عمل کردند. شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب الگوی نواری نشانگرهای SC1600 و SC792 را در تعدادی از افراد مقاوم و حساس جمعیت در حال تفرق نشان می‌دهد. در این شکل‌ها والدین وارد نشدند. افراد با نوار سنگین‌تر دارای ژن *Yr15* (مقاوم) و افراد دارای نوار سبک‌تر (حساس) فاقد ژن *Yr15* هستند.

نشانگرهای اختصاصی و همباز حاصل از

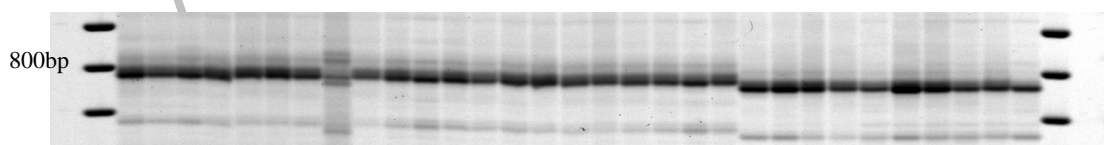
#### نشانگرهای IRAP و REMAP

تعدادی از نزدیک‌ترین نشانگرها شامل RE438-483، RE443-834، RE443-495، IR2107 و RE440-679 هم‌سانه‌سازی و توالی‌یابی شدند. سپس آغازگرهای اختصاصی برای آن‌ها طراحی شده تا به نشانگرهای اختصاصی و در صورت امکان همباز جهت تسهیل گزینش به کمک نشانگر و هم‌سانه‌سازی براساس نقشه تبدیل شوند. سه نشانگر IR-2107، RE-443-495 و RE-443-834 به نشانگرهای همباز و اختصاصی تبدیل شدند و



شکل ۱- الگوی نواری نشانگر SC1600 روی تعدادی افراد مقاوم (دارای نوار سنگین‌تر) و حساس (دارای نوار سبک‌تر) جمعیت  $F_2$  نوترکیب. فرد شماره ۱۰ و ۱۶ از سمت چپ دارای نوترکیبی برای این نشانگر هستند

Fig. 1. Banding pattern of the SC1600 marker on some resistant (higher band) and susceptible (lower band)  $F_2$  recombinant plants. Number 10 and 16 from the left are recombinants for this marker



شکل ۲- الگوی نواری نشانگر SC792 روی تعدادی از افراد مقاوم (دارای نوار سنگین‌تر) و حساس (دارای نوار سبک‌تر) جمعیت  $F_2$  نوترکیب

Fig. 2. Banding pattern of the SC792 marker on some resistant (higher band) and susceptible (lower band)  $F_2$  recombinant plants

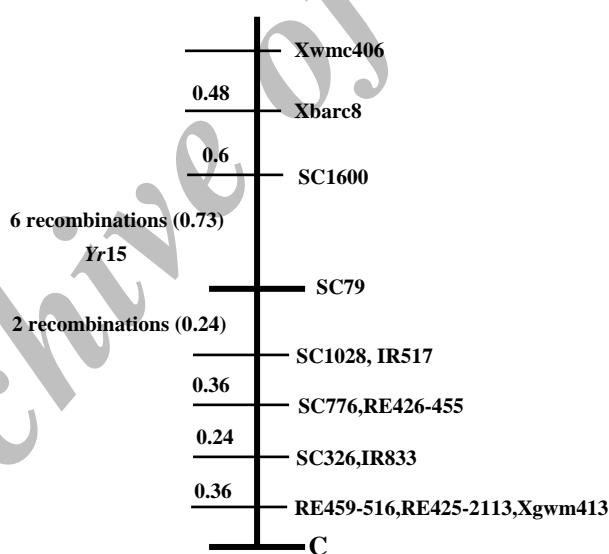
این ژن را کاهش دهد. بنابراین استفاده از جمعیت‌های بزرگ‌تر و شناسایی افراد دارای نوترکیبی در اطراف ژن، احتمال شناسایی نشانگرهای نزدیک‌تر حتی به لحاظ فیزیکی را افزایش می‌دهد که برای همسانه سازی بر اساس نقشه این ژن ضروری است. از طرف دیگر با توجه به این که قطعه حاوی ژن *Yr15* از گونه وحشی است، ممکن است حامل ژن‌های نامطلوب پیوسته با ژن مورد نظر باشد (Grechter-Amitai and Grama, 1974) بنابراین بهتر است نشانگر به لحاظ فیزیکی نزدیک‌تری برای گزینش به کمک نشانگر هم استفاده شود تا حداقل امکان از انتقال دیگر ژن‌های نامطلوب پیوسته با ژن مورد نظر جلوگیری شود.

در کل بیش از ۱۵۰ نوار چند شکل به طور بالقوه پیوسته با این ژن بین والدین شناسایی شدند. دلیل تعداد زیاد نوارهای چندشکل، شاید چندشکلی بالای نشانگرهای رتروترانسپوزونی و منشا قطعه حامل ژن *Yr15* بوده که از گونه وحشی است. هوانگ و همکاران (Huang et al., 2003) بیان کردند که انتقال ژن *Lr21* از گونه وحشی *Aegilops tauschii* به گندم نان چندشکلی را در نواحی اطراف ژن افزایش داده است. سه نشانگر ریزماهواره، سه نشانگر IRAP و هفت نشانگر REMAP فاصله نزدیک‌تری با ژن داشتند (کمتر از ۲ سانتی مورگان). نشانگر *Xgwm413* نزدیک‌ترین نشانگر ریزماهواره بود که در سمت سانترومیری

نشانگرهای RE438-483 و RE440-679 به نشانگرهای اختصاصی تبدیل شدند و ال مقاومت و حساسیت با اندازه‌های ۳۲۶ و ۷۷۶ جفت‌باز تکثیر کردند و به ترتیب SC326 و SC776 نامیده شدند. جدول ۱ موقعیت نشانگرها، تعداد نوترکیبی، فاصله ژنتیکی، توالی آغازگری و اندازه قطعه مربوط به آن‌ها را نشان می‌دهد. در این جدول به جای نشانگرهای IRAP و REMAP تبدیلی، نشانگرهای اختصاصی حاصل از آن‌ها قرار داده شده است. معرفی نشانگرهای ریزماهواره *Xgwm911* و *Xgwm18* توسط پنگ و همکاران (Peng et al., 2000) شناسایی افراد نوترکیب در اطراف ژن را ساده‌تر می‌سازد. تولید لاین‌های نوترکیب و استفاده از آن‌ها برای مکان‌یابی دقیق مزایای زیادی دارد. اولاً این امر فقط امکان جستجوی نشانگرهای جدید در فاصله بین دو نشانگر مذکور را مقدور می‌سازد و نیازی به ارزیابی نشانگرهای بالقوه پیوسته با ژن روی همه افراد جمعیت  $F_2$  نیست. از طرف دیگر قطعه حامل ژن *Yr15* از گونه وحشی *T. dicoccoides* به گندم زراعی وارد شده و در تلاقی‌های دور مقدار نوترکیبی به خصوص در مورد ژنوم B کاهش می‌یابد (Talbert et al., 1995). مکینتاش و همکاران (McIntosh et al., 1996) نشان دادند که قطعه حامل ژن *Yr15* از قطعه همولوگ آن در گندم هگزاپلوئید و تتراپلوئید زراعی مقداری متفاوت است. این امر می‌تواند نوترکیبی در قطعه حامل

RE459-516 و IR833 با SC326، RE426-455 و RE425-2113 با Xgwm413. شاید علت آن کاهش نسبت نوترکیبی در سمت سانترومر باشد (Sandhu *et al.*, 2001) و (Sandhu and Gill, 2002). توزیع فیزیکی نوترکیبی در طول کروموزومها یکسان نیست و در نواحی تلومری چندین برابر نواحی سانترومری کروموزومها است (Ling *et al.*, 2003). شکل ۳ نقشه ژنتیکی کروموزوم 1BS حول ژن *Yr15* براساس نشانگرهای مورد مطالعه را نشان می دهد.

قرار داشت و با نشانگرهای RE459-516 و RE425-2113 تفرق همزمان داشت. نشانگر SC792 نزدیک ترین نشانگر بود و هیچ گونه نوترکیبی با ژن نشان نداد. نشانگر SC1600 تنها نشانگر رتروترنسپوزونی در طرف تلومری بود که فاصله ژنتیکی نزدیکی (۰/۷۳ سانتی مورگان) با ژن داشت. بقیه نشانگرهای IRAP و REMAP نزدیک به ژن در طرف سانترومری ژن قرار داشتند در سمت سانترومری کروموزوم 1BS تعدادی از نشانگرها با هم تفرق داشتند (نشانگر SC1028، IR517، SC776 با



شکل ۳- نقشه ژنتیکی دقیق کروموزوم 1BS اطراف ژن *Yr15*، فواصل ژنتیکی در سمت چپ بر حسب سانتی مورگان است

Fig. 3. Fine genetic map of chromosome 1BS around gene *Yr15*, genetic distances on the left are in centimorgan

توالی یابی ژنومی نشان داده شده است که احتمال مشاهده نشانگرهای رتروترنسپوزونی در

نزدیک ترین نشانگرها، نشانگرهای رتروترنسپوزونی بودند. براساس داده های

جدید در داخل این ناحیه قرار خواهد گرفت و حداقل در مورد نشانگرهای IRAP اختصاصی کردن آن مشکل خواهد بود. چون نواحی LTR برای یک خانواده رتروترانسپوزونی محفوظ بوده و مکان‌های زیادی تکثیر خواهند شد. در مورد نشانگرهای REMAP که یکی از آغازگرها براساس توالی ریزماهواره است در صورت اختصاصی کردن آغازگر مربوط به توالی ریزماهواره کار راحت‌تر خواهد بود. ولی بهتر است قبل از طراحی آغازگر جستجوی نشانگرهای توالی‌یابی شده در بانک‌های اطلاعاتی توالی‌های تکراری و رتروترانسپوزون‌ها انجام شود و عمومی بودن این توالی‌ها و بخش‌های انتهایی آن‌ها مشخص شود. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که تولید نشانگرهای اختصاصی در گندم به لحاظ همولوژی بین کروموزوم‌های همیولوگ و حتی دیگر گروه‌های همولوگ سخت است (Peng *et al.*, 2004).

بر اساس گزارش سیاندهو و همکاران (Sandhu *et al.*, 2001) ژن *Yr15* در ناحیه غنی از ژن 1S0.8 کروموزوم 1BS قرار دارد. این ناحیه ۲۵ سانتی‌مورگان بوده که فقط ۶ درصد از بازوی کروموزومی بوده ولی ۸۲ درصد از نوترکیبی‌ها در این ناحیه رخ می‌دهد. تعداد جفت باز در هر سانتی‌مورگان در این ناحیه ۳۶۵ هزار برآورد شده است که در کل 1BS به طور متوسط پنج میلیون جفت باز است. بنابراین در صورتی که با توجه به موارد بالا ژن

نواحی نزدیک ژن‌ها نسبت به سایر نشانگرها زیاد است (SanMiguel *et al.*, 1998)، (Huang *et al.*, 2003).

در تبدیل نشانگرهای رتروترانسپوزونی به نشانگرهای اختصاصی و همباز، سه نشانگر اختصاصی و همباز (SC792، SC1028 و SC1600) و دو نشانگر اختصاصی و غالب (SC776 و SC326) تولید شدند که نشانگر SC792 کاملاً با ژن پیوستگی داشت. همسانه‌سازی و توالی‌یابی ال‌های این نشانگر در افراد مقاوم و حساس نشان داد که ناحیه چندشکل در بخش داخلی توالی قرار داشته و در نواحی اتصال آغازگر نیست. به نظر می‌رسد که اگر ناحیه چندشکل و دارای جهش در نواحی اتصال آغازگر باشد در صورت توالی‌یابی قطعه مربوطه و طراحی آغازگر اختصاصی امکان تبدیل آن به نشانگر همباز سخت خواهد بود. در این صورت فقط یکی از ال‌ها تکثیر خواهد شد. استفاده از ترکیبات مختلف آغازگرهای قبلی و اختصاصی در والدین کاملاً این مسئله را آشکار ساخت. در مورد تبدیل این نشانگرها به نشانگرهای اختصاصی بایستی به محل طراحی آغازگر در داخل توالی رتروترانسپوزون‌ها هم توجه کرد. اگر توالی رتروترانسپوزونی در ناحیه داخلی‌تر LTR (توالی‌های محفوظ تکراری در دو انتهای رتروترانسپوزون‌ها هستند که معمولاً آغازگرها بر اساس آن‌ها طراحی می‌شوند) طراحی شود در صورت اختصاصی کردن آغازگر، آغازگر

از ترکیب ژن‌های مربوط به مقاومت گیاهچه‌ای (مانند *Yr15*) با مقاومت HTAP (High Temperature Adult Plant Resistance) استفاده شود (Singh *et al.*, 2004)؛ (Chen, 2005). ادغام این دو مقاومت سخت بوده که در این راستا نشانگرهای ملکولی معرفی شده برای ژن *Yr15* بسیار مؤثر خواهد بود.

#### سپاسگزاری

از مسئولین گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و وزارت علوم، تحقیقات و فن‌آوری به خاطر پشتیبانی‌های مالی سپاسگزاری می‌شود. از دکتر روسلان کلندر و فرانسوا سابت، محققین آزمایشگاه ژنومیکس گیاهی موسسه بیوتکنولوژی دانشگاه هلسینکی به خاطر بحث‌های بسیار مفید و ارزنده در تهیه آغازگرهای رتروترانسپوزونی و مقاله، از مارکو یاسکلاین، آنه-ماری ناروانتو و اورسولا لانگویست به ترتیب دانشجو و تکنسین‌های آزمایشگاه مذکور به خاطر کمک در ازمیابی مواد گیاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

*Yr15* در ناحیه غنی از ژن 1S0.8 قرار گرفته باشد انتظار می‌رود که نشانگرهای کاملاً پیوسته و حتی سایر نشانگرها با فاصله‌ی ژنتیکی کمتر از یک سانتی‌مورگان در این مطالعه، فاصله‌ی فیزیکی بسیار نزدیکی با ژن داشته باشند، بنابراین پیش‌بینی می‌شود حداقل در صورت استفاده از نشانگر کاملاً پیوسته با ژن یعنی SC792 جهت جداسازی و غربال کتابخانه ژنومی برای شناسایی کلون BAC حاوی ژن *Yr15*، نیاز به حداقل تعداد کروموزوم پیمایی باشد. البته بایستی به این نکته نیز توجه کرد که قطعه حاوی ژن *Yr15* از گونه وحشی به گندم دوروم زراعی وارد شده و بدین دلیل احتمالاً نوترکیبی در این قطعه کمتر از مقدار آن نسبت به مقدار برآورد شده خواهد بود. بهر حال غربال‌سازی کتابخانه ژنومی با این نشانگر که قدم بعدی در ادامه این مطالعه خواهد بود تعداد دقیق نوترکیبی در این قطعه را مشخص خواهد کرد.

در این مطالعه نشانگرهای مطمئن جهت استفاده در گزینش به کمک نشانگر معرفی شد. بهر حال جهت ایجاد مقاومت پایدار برای زنگ زرد پیشنهاد شده که

#### References

- Anonymous, 2005. Statistic Report. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran.
- Applied Biosystems, 2006. PeakScanner software version 1.0.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M., and Varki, A. 1995. Current Protocols in

Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.

- Chague, V., Fahima, T., Dahan, A., Sun, G.L., Korol, A.B., Ronin, Y.L., Grama, A., Roder, M.S., and Nevo, E. 1999.** Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the *Yr15* gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. *Genome* 42: 1050-1056.
- Chen, M.X. 2005.** Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 314-337.
- Gerechter-Amitai, Z.K., and Grama, A. 1974.** Inheritance of resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis*) in crosses between wild emmer (*Triticum dicoccoides*) and cultivated tetraploid and hexaploid wheats.1. *Triticum durum*. *Euphytica* 23: 387-392.
- Gerechter-Amitai, Z.K., and Stubbs, R.W. 1970.** A valuable source of yellow rust resistance in Israeli populations of wild emmer, *Triticum dicoccoides* Koern. *Euphytica* 19: 12-21.
- Gerechter-Amitai, Z.K., Van Silfhout, C.H., Grama, A., and Kleitman, F. 1989.** *Yr15* a new gene for resistance to *Puccinia striiformis* in *Triticum dicoccoides* sel. G-25. *Euphytica* 43: 187-190.
- Ghannadha, M.R. 1996.** Improvement strategies for resistance to stripe rust. Proceedings of the 4<sup>th</sup> Iranian Congress of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, pp. 382-426 (in Farsi).
- Gill, K.S., Gill, B.S., Endo, T.R., and Boyko, E.V. 1996a.** Identification and high density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. *Genetics* 143: 1001–1012.
- Gill, K.S., Gill, B.S., Endo, T.R., and Boyko, E.V. 1996b.** Identification and high density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics* 144: 1883–1891.
- Huang, L., Brooks, S.A., Li, W., Fellers, J.P., Trick, H.N., and Gill, B.S. 2003.** Map-Based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploidy genome of bread wheat. *Genetics* 164: 655-664
- Kalendar, R. 1998-2007.** FastPCR©. <http://www.Biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr>.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Souniemi, A., and Schulman, A. 1999.** IRAP

- and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704-711.
- Kalendar, R., and Schulman, A.H. 2006.** IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1: 2478 - 2484
- Kota, R., Spielmeier, W., McIntosh, R.A., and Lagudah, E.S. 2006.** Fine genetic mapping fails to dissociate durable stem rust resistance gene *Sr2* from pseudo-black chaff in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 492-499.
- Kumar, A., and Bennetzen, J.L. 1999.** Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 33: 479-532.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., and Newburg, L. 1987.** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Ling, H.-Q., Zhu, Y., and Keller, B. 2003.** High-resolution mapping of the leaf rust disease resistance gene *Lr1* in wheat and characterization of BAC clones from the *Lr1* locus. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 875-882.
- Mago, R., Miah, H., Lawrence, G.J., Wellings, C.R., Spielmeier, W., Bariana, H.S., McIntosh, R.A., Pryor, A.J., and Ellis, J.G. 2005.** High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes *Sr31*, *Lr26* and *Yr9* on the short arm of rye chromosome 1. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 41-50.
- McIntosh, R.A., Silk, J., and The, T.T. 1996.** Cytogenetic studies in wheat XVII. Monosomic analysis and linkage relationships of gene *Yr15* for resistance to stripe rust. *Euphytica* 89: 395-399.
- Peng, J.H., Fahima, T., Röder, M.S, Huang, Q.Y., Dahan, A., Li, Y.C., Grama, A., and Nevo, E. 2000.** High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance genes *YrH52* and *Yr15* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides* . *Genetica* 109: 199-210.
- Peng, J.H., Zadeh, H., Lazo, G.R., Gustafson, J.P., Chao, S., Anderson, O.D., Qi, L.L., Echalié, B., Gill, B.S., Dilbirligi, M., Sandhu, D., Gill, K.S., Greene, R.A., Sorrells, M.E., Akhunov, E.D., Dvorak, J., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Hossain, K.G., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Mahmoud Miftahudin, A.A.,**

- Colney, E.J., Anderson, J.A., Pathan, M.S., Nguyen, H.T., McGuire, P.E., Qualset, C.O., and Lapitan, N.L.V. 2004.** Chromosome bin map of expressed sequence tags in homologous group 1 of hexaploid wheat and homoeology with rice and Arabidopsis. *Genetics* 168: 609-623.
- Sandhu, D., Champoux, J.A., Bondareva, S.N., and Gill, K.S. 2001.** Identification and physical localization of useful genes and markers to a major gene-rich region on wheat group 1S chromosomes. *Genetics* 157: 1735-1747.
- Sandhu, D., and Gill, K.S. 2002.** Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiology* 128: 803-811.
- SanMiguel, P., Gaut, B.S., Tikhonov, A., Nakajima, Y., and Bennetzen, J.L. 1998.** The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature Genetics* 20: 43-45.
- Singh, R.P., William, H.M., Huerta-Espino, J., and Rosewarne, G. 2004.** Wheat rust in Asia: Meeting the challenges with old and new technologies. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Crop Science Congress, 26 Sep. -1 Oct., Brisbane, Australia.
- Stein, N., Feuillet, C., Wicker, T., Schlagenhauf, E., and Keller, B. 2000.** Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 97: 13436-13441.
- Sun, G.L., Fahima, T., Korol, A.B., Turpeinen, T., Grama, A., Ronin, Y.L., and Nevo, E. 1997.** Identification of molecular markers linked to the *Yr15* stripe rust resistance gene of wheat originated in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 622-628.
- Talbert, L.E., Blake, N.K., Storlie, E.W., and Lavin, M. 1995.** Variability in wheat based on low copy DNA sequence comparisons. *Genome* 38: 951-957.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A.J., Pearce, S.R., Kumar, A., Thomas, B.B.T., and Powell, W. 1997.** Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics* 253: 687-694.
- Yan, G.P., Chen, X.M., Line, R.F., and Wellings, C.R. 2003.** Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat



stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 636-643.

**Yu, G.-X., and Wise, R.P. 2000.** An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid *Avena*. *Genome* 43: 736-749.

Archive of SID