

تجزیه ارتباطی بین صفات زراعی مهم و نشانگرهای رتروترانسپوزونی

SSAP در نمونه های گندم دوروم

سجاد رشیدی منفرد^۱، محسن مردی^۲، عبدالهادی حسین زاده^۱، محمد رضا نقوی^۱

۱- دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج

۲- پژوهشکده تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش ژنومیکس، کرج

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: rashidimf@ut.ac.ir

چکیده

ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای ملکولی با استفاده از ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر ملکولی حاصل از ۱۰ جفت آغازگر SSAP روی ۸۷ ژنوتیپ بومی و ۲۱ رقم زراعی گندم دوروم مطالعه شد. PIC بین $(Tagermina)M+ACA$ تا $(Tagermina)M+ACA$ (۰/۴۱) و $(Thv19)M+ACA$ و MI بین $(Tagermina)M+ACA$ (۰/۵۵) $(M+ACA)$ تا $(Thv19)M+ACA$ (۳/۷) متغیر بود. با استفاده از روش رگرسیون چندگانه (گام به گام) ارتباط بین هر کدام از ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر چند شکل مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت ۳۲ نشانگر SSAP رابطه معنی داری با حداقل یکی از ۶ صفت زراعی داشتند که می توان از آنها در اصلاح وابسته به نشانگر بهره گرفت.

مقدمه

در طی دودهه اخیر نشانگرهای ملکولی مبتنی بر DNA بطور گسترده ای برای اهداف مختلف هم در گیاهان و هم در حیوانات مورد استفاده قرار گرفته اند (۷). رتروترانسپوزون ها عناصر اصلی متحرک در ژنوم گیاهان هستند و از طریق یک RNA حد واسط در ژنوم جابجا می شوند (۵). بخاطر گستردگی و فراوانی آنها در ژنوم های گیاهی می توان از آنها به عنوان نشانگرهای ملکولی استفاده کرد، که دارای چندشکلی بسیار بالای می باشند و آغازگرها را براساس نواحی تکراری بلند انتهای (Long Terminal Repeat) آنها طراحی نمود (۳ و ۱۱). چندین نوع نشانگر ملکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون ها وجود دارد و یکی از آنها که بیشترین کاربرد را دارد نشانگر ملکولی SSAP می باشد که توسط واف و همکاران (۱۹۹۷) معرفی شد (۱۵).

واژه های کلیدی

گندم دوروم ،
تجزیه ارتباطی،
رگرسیون،
SSAP

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در این تحقیق ۸۷ ژنوتیپ بومی دوروم از نقاط مختلف ایران به همراه ۲۱ رقم متعلق به ۱۰ کشور خارجی که از بانک ژن دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران فراهم شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. مواد گیاهی در مزرعه پژوهشی گروه زراعت و اصلاح نباتات به مدت دو سال (۸۴ و ۸۵) در غالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار روی خطوطی به طول ۱ متر کاشت شده و صفات طول بوته، طول خوشه، طول پدانکل، تعداد دانه در خوشه، تعداد سنبلچه در سنبله و وزن صد دانه بر اساس ۵ نمونه در هر تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. DNA با استفاده از روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۹۳) با کمی تغییر جداسازی شد. ۱۰ ترکیب آغازگری SSAP مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

نشانگرهای رتروترانسپوزون مورد استفاده

نشانگرهای رتروترانسپوزونی بکار گرفته شده در این تحقیق از گروه Ty1-copia شامل

BARE-1 (5- CTAGGGCATAATTCACA-3)
Tagermina (5-AGAGGAGGATATCCCAACAT-3)
Thv19 (5-GCCCAACCGACCAGGTTGTTACAG-3)
Tar1 (5 - CTCCCAGTTGACCAACAA-3)

بودند.

تجزیه SSAP

مراحل کار بر اساس روش واف و همکاران (۱۹۹۹) بدینصورت انجام شد. ابتدا DNA ژنومی استخراج شد و با استفاده از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* برش داده شد. سپس آدپتورها مربوطه به قطعات حاصل از هضم آنزیم متصل گردید. و مرحله تکثیر ابتدایی همانند AFLP صورت گرفت. اما تکثیر اصلی بین دو آغازگر که بر اساس نواحی LTR رتروترانسپوزونها و آدپتور مربوط به *MseI* با دو و سه نوکلئوتید انتخابی انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه و به مدت

با کمک تجزیه ارتباطی مبتنی بر لینکاژ در گندم تعداد زیادی ژن برای صفات زراعی متفاوت (از جمله صفات کیفی، مقاومت به استرس‌های زنده و غیرزنده و غیره) ردیابی شده‌اند (۸، ۱۴ و ۶). در دسترس بودن نشانگرها رتروترانسپوزونی در گندم دوروم ما را بر آن داشت که تجزیه ارتباطی بین این نشانگرها و صفات مورفولوژیکی را مورد مطالعه قرار دهیم. مزیت نشانگر SSAP نسبت به نشانگرهای دیگر جهت یافتن نشانگرهای آگاهی بخش حضور فراوان این عناصر در نواحی یوکروماتینی ژنوم یعنی مکانی که اکثر ژنهای کد کننده صفات زراعی قرار دارند، می‌باشد. هر رتروترانسپوزون دارای دو توالی LTR در اطراف خود می‌باشد و در هر LTR یک پروموتور وجود دارد (۵)، در واقع الحاق رتروترانسپوزونها در اطراف ژن‌ها باعث تغییر در الگوی بیان آنها می‌شود (که این علت حضور فراوانشان در نواحی یوکروماتینی می‌باشد). بدلیل اینکه هر رتروترانسپوزون بصورت کپی‌های فراوان در ژنوم وجود دارد ممکن است یک توالی رتروترانسپوزون در اطراف چندین صفت زراعی وجود داشته باشد که این خصوصیت آنها همسانه سازی و جداسازی ژن‌های مورد نظر را آسان می‌نماید. اکثر مطالعات تجزیه ارتباطی مبتنی بر لینکاژ، ردیابی ژن‌های مختلف مرتبط با صفات زراعی را مقدور کرده ولی اغلب به دلیل فاصله زیاد بین نشانگر و صفت زراعی، هم اصلاح با کمک نشانگر و هم جداسازی و کلونینگ ژن مورد نظر را مشکل می‌سازد و هم اینکه از تعداد کمی ژنوتیپ به عنوان والد برای نقشه‌یابی جمعیت‌ها استفاده می‌شود. در سالهای اخیر برای فائق آمدن بر این مشکل از تجزیه ارتباطی بین نشانگرها و صفات زراعی استفاده شده که نه تنها نقشه‌یابی ژن‌های را با درجه اطمینان بالا ممکن می‌سازد، بلکه شناسایی ژن‌های را که در نقشه‌یابی مبتنی بر لینکاژ قابل ردیابی نبودند مقدور می‌سازد (۹ و ۱۴). در سیستم‌های گیاهی مطالعات کمی در مورد تجزیه ارتباطی صورت گرفته است (۲ و ۱۰). هدف ما از این تحقیق شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش (Informative markers) مرتبط با صفات زراعی مورد نظر در ۱۰۸ ژنوتیپ گندم دوروم با استفاده از سیستم نشانگری SSAP می‌باشد.

نتایج و بحث

در این تحقیق ۱۰ ترکیب آغازگر SSAP، ۷۴ باند چند شکل را تولید نمودند. شاخص نشانگری (MI) نشانگرها که معیاری برای قدرت تمایز هر جفت آغازگر می باشد محاسبه گردید. بطوریکه ترکیبات آغازگری *TarI\M+ACA*، *Thv19\M+ACA* و *BAREI\M+ACA* دارای بیشترین MI و آغازگر *Tagermina\M+ACA* دارای کمترین MI (جدول ۱) بودند و در بین رتروترانسپوزون‌ها *TarI* و *Tagermina* به ترتیب دارای بیشترین و کمترین شاخص نشانگری (MI) بودند. ترکیبات آغازگری *TarI\M+ACA*، *Tagermina\M+ACA*، *Thv19\M+ACA* بیشترین مقدار PIC به ترتیب برابر با ۰/۴۱، ۰/۳۷ و ۰/۳۴ و *Thv19\M+CAT* و ترکیبات آغازگری *BAREI\M+CG* کمترین PIC به ترتیب برابر با ۰/۱۸ و ۰/۲۳ را نشان دادند. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی در این تحقیق ۰/۳۲ بود (جدول ۱). جدول ۲ و ۳ تجزیه داده‌های مورفولوژی و ملکولی را با استفاده از روش رگرسیون گیری گام به گام نشان می دهد. بیشترین تعداد نشانگر برای صفت وزن صد دانه (۱۰ نشانگر) و کمترین مربوط به تعداد سنبلیچه در خوشه (۱ نشانگر) می باشد و همچنین بیشترین R^2 کل مربوط به طول گیاه (۰/۷۳٪) است. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون مشخص گردید که نشانگر B56 از ترکیب آغازگری *BAREI\M+CG* دارای بیشترین R^2 (۲۳ و ۱۲/۳) برای صفات طول خوشه و تعداد سنبلیچه در خوشه با طول ۲۵۸ bp، نشانگر T29 از ترکیب آغازگری *TarI\M+ACA* دارای بیشترین R^2 (۳۲/۴، ۳۵ و ۴۲) برای صفات تعداد دانه در خوشه، طول گیاه و طول پدانکل با طول ۲۶ bp و نشانگر T33 از ترکیب آغازگری *TarI\M+ACA* دارای بیشترین R^2 (۱۵/۶) برای صفت وزن صد دانه با طول ۱۶۲ bp بود. با توجه به این نتایج می توان گفت که رتروترانسپوزونهای *TarI* و *BAREI* بیشتر از رتروترانسپوزونهای *Tagermina* و *Thv19* در نواحی کد کننده صفات زراعی موجود قرار دارند به همین دلیل تغییرات بیشتری از صفات زراعی مورد بررسی را نشان می دهند. همچنین می توان گفت که

۳۰ ثانیه، ۱۰ چرخه اول بصورت تاج داون انجام شد بطوریکه در هر چرخه دمای اتصال ۱ درجه سانتیگراد کاهش یافت (۶۳-۵۳ °C) و مرحله بسط آغازگری در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه انجام شد؛ ۲۳ چرخه بعدی نیز بدینصورت انجام شد (۹۴°C، ۲ دقیقه، ۷۲°C، ۳۰ ثانیه و ۵۴°C، ۳۰ ثانیه). واکنش PCR در دستگاه بیورد مدل (Sequi-Gen GT MA) انجام شد.

تجزیه‌های آماری

داده‌های ملکولی بر اساس وجود باند یک و عدم وجود آن صفر برای هر جفت آغازگر اختصاصی حاصل شد. میزان اطلاعات چندشکل (Polymorphic Information Content) نشانگرها، با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ (pi فراوانی نشانگر i ام در یک ترکیب آغازگر اختصاصی SSAP) برای کلیه جفت آغازگرهای اختصاصی محاسبه شد. شاخص نشانگر (Marker Index) با استفاده از فرمول $MI = PIC.N.\beta$ برای کلیه آغازگرها محاسبه می گردید (۱ و ۱۰). که PIC میانگین اطلاعات چندشکل برای هر جفت آغازگر، N تعداد کل باندها برای هر جفت آغازگر، β نسبت چندشکلی برای هر جفت آغازگر می باشد. این شاخص علاوه بر مزایای شاخص PIC تعداد کل باند را در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید باند بیشتر روی ژل نیز محاسبه می کند. سپس تجزیه رگرسیونی ۶ صفت زراعی در ۱۰۸ ژنوتیپ گندم با استفاده از نرم افزار SPSS با روش رگرسیون گام به گام انجام شد. بدینصورت که در هر بار انجام تجزیه یکی از صفات مورفولوژیکی را به عنوان متغیر وابسته (Y) و کلیه نشانگرها را به عنوان متغیرهای مستقل (X) در تجزیه وارد شدند و بعد از تعیین نشانگرهای که درصد بالایی از تغییرات را توجیه می کردند موقعیت آنها در روی ژل مشخص شد.

آغازگری بیشتر برای رتروترانسپوزونهای مذکور استفاده شود می‌توان به پیدا کردن نشانگرهایی که دارای همبستگی بالا با صفات مرتبط با عملکرد و اجزاء عملکرد باشند، امید داشت و از آنها در پژوهش‌های دیگر استفاده نمود. شناسایی نشانگرهای ملکولی مرتبط با ژن‌های بزرگ اثر برای صفات مورد نظر در سال‌های اخیر از طریق ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق همچون DH، RIL، F₂ انجام گرفته است. بعضی از این نشانگرها جهت انجام کارهای اصلاحی استفاده شده اما در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق جهت نقشه یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای ملکولی از جمله مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی می‌باشد (۶) که با انجام آنالیز ارتباطی می‌توان تا حدودی بر این محدودیت‌ها فائق آمد. همچنین با استفاده از نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات زراعی از جمله اجزاء عملکرد (مخصوصاً در مورد نشانگرهایی که مکان کروموزومی آنها مشخص می‌باشد می‌توان با تولید لاین‌های با جایگزینی کروموزومی، صفات زراعی مورد نظر را در یک لاین فاقد آن صفت از طریق تلاقی‌های فی مابین انتقال داد)، انتخاب اولیه ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا مخصوصاً برای زراعت در مناطق دیم ممکن می‌شود. می‌توان باند نشانگر(ها) آگاهی بخش شناسایی شده را که R² بالایی دارند از روی ژل جدا و کلون نمود. سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه‌های اطلاعاتی با توالی‌های موجود هم ردیفی (Alignment) نمود و ژن‌های کاندید (Candidate genes) که شباهت زیادی با نشانگرهای مورد نظر را داشتند شناسایی نمود، همچنین می‌توان از روی توالی مورد نظر آغازگرهای اسکار (SCAR) را برای صفات مورد نظر طراحی کرد و در انتخاب بواسطه نشانگر (MAS) در برنامه‌های اصلاحی بهره برد.

رتروترانسپوزون‌های *BARE1* و *Tar1* در فرایندهای تکاملی گیاه مورد نظر بیشتر جابجا شده‌اند و کپی‌های بیشتری از خود را در داخل ژنوم ایجاد کرده‌اند زیرا چند شکلی (PIC) و تعداد باند (MI) بیشتر تولید کرده‌اند (حاصل جابجایی بیشتر در ژنوم می‌باشد) همچنین کوپین و همکاران (۲۰۰۴) نیز با استفاده از لاین‌های تترازومی - نولی زومی در گندم نشان دادند که توزیع رتروترانسپوزونهای *BARE1* در ژنوم A و B بیشتر از ژنوم D است. روی و همکاران (۲۰۰۶) تجزیه ارتباطی بین ۱۱ صفت زراعی و ۵۱۹ نشانگر SSR (۲۲۱ نشانگر)، SAMPL (۴۳ نشانگر) و AFLP (۲۵۵ نشانگر) را در گندم نان انجام دادند، در نشانگرهای SSR بیشترین میزان R² برای صفت شاخص برداشت با ۲۸٪ و طول bp ۲۹۱ در آغازگر *Xwmc44* در نشانگرهای SAMPL بیشترین میزان R² برای صفت شاخص برداشت با ۲۰٪ و طول bp ۲۵۰ در ترکیب آغازگری *XccsS6M_{CAG}* و در نشانگرهای AFLP بیشترین میزان R² برای صفت تعداد گلچه در خوشه با ۲۹٪ و طول bp ۱۶۰ در ترکیب آغازگری *XccsE_{AA}CM_{CTC}* مشخص شد. آنان بحث کردند که نشانگرهای بالا توزیع یکنواختی در اطراف صفات زراعی مورد بررسی داشتند، که با توالی یابی نشانگرهای دارای R² بالا می‌توان به یافتن ژنهای کدکننده صفات زراعی و همچنین نشانگرهای که دارای ارتباط فراوان با آن صفات هستند جهت اشباع نقشه‌های لینکاژی امیدوار بود. در مطالعات قبلی مشخص شده بود که ژنوم A دارای ژنهای کنترل کننده فراوان اجزاء عملکرد می‌باشد و نقش بسیار مهمی در کنترل عملکرد دارد (۱۳). همانطور که در بالا اشاره شد با توجه به توزیع بیشتر رتروترانسپوزون‌های *BARE1* و *Tar1* در ژنوم A و B و اینکه ژنوم A نقش بسیار مهمی در کنترل عملکرد دارد شاید دلیل بالا بودن میزان R² برای صفات اجزاء عملکرد این نشانگرها را توجیه نماید. این نتایج نشان می‌دهد که چنانچه از ترکیبات

جدول ۱- میزان محتوای چند شکلی اطلاعات (PIC) و شاخص نشانگری (MI) برای ۱۰ جفت آغازگر مورد استفاده در نشانگر SSAP در نمونه های دوروم

شماره	آغازگر	PIC	MI
۱	<i>Thv19\M+ACA</i>	۰/۳۴	۳/۷
۲	<i>Tagermina \M+ACA</i>	۰/۱۸	۰/۵۵
۳	<i>Thv19\M+CAT</i>	۰/۳۷	۲/۲۳
۴	<i>Tar1\M+CG</i>	۰/۳۵	۲/۱
۵	<i>Tar1\M+ACA</i>	۰/۴۱	۳/۲۵
۶	<i>BARE1\M+CAT</i>	۰/۲۸	۲/۷۹
۷	<i>BARE1\M+ACA</i>	۰/۳۶	۳/۱۹
۸	<i>BARE1\M+CG</i>	۰/۲۳	۱/۱۶
۹	<i>Tagermina \M+CAT</i>	۰/۳۷	۲/۵۹
۱۰	<i>Tar1\ M+CAT</i>	۰/۳۲	۲/۸۷
-	میانگین کل	۰/۳۲	۲/۴۴

جدول ۲- تجزیه داده های ۶ صفت مورفولوژی طول خوشه، تعداد سنبلیچه در خوشه، وزن صد دانه، تعداد دانه در خوشه، طول گیاه و طول پدانکل و داده های ملکولی با استفاده از روش رگرسیون گیری گام به گام

صفت	تعداد نشانگر (T)	R ² (%)max	R ² (%)T
طول خوشه	۲	۲۳	۲۸/۷
تعداد سنبلیچه در خوشه	۱	۱۲/۳	۱۲/۳
وزن صد دانه	۱۰	۱۵/۶	۶۳
تعداد دانه در خوشه	۶	۳۲/۴	۶۳
طول گیاه	۸	۳۵	۷۳
طول پدانکل	۵	۴۲	۶۲

T: تعداد نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات زراعی

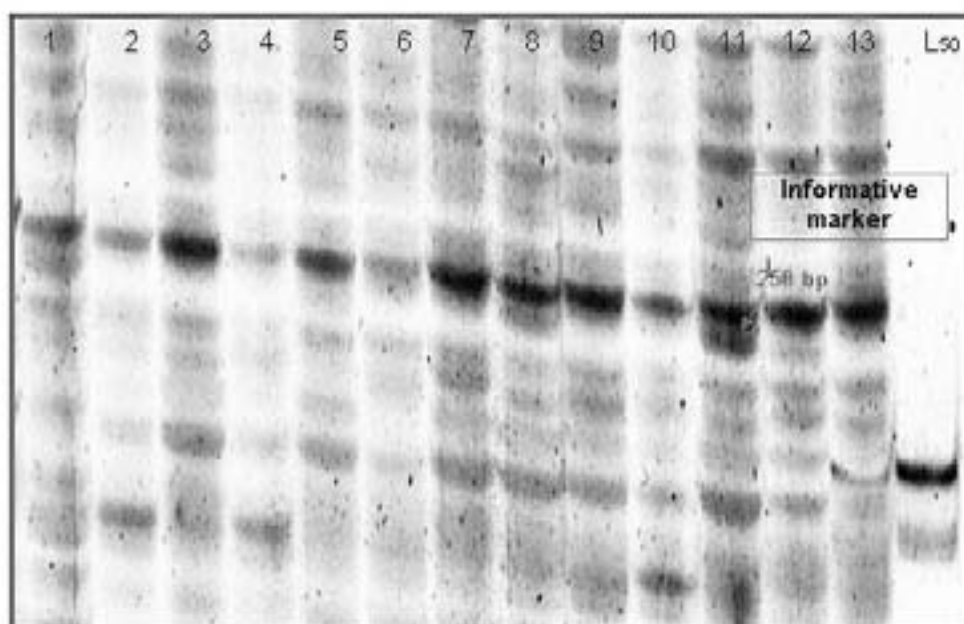
T adjusted R²: مجموع کل R² تعدیل شده نشانگرها آگاهی بخش برای صفات زراعی (%).

max adjusted R²: بیشترین R² تعدیل شده مربوط به یک نشانگر برای صفات زراعی (%).

جدول ۳- جزئیات تجزیه وایانس رگرسیون گام به گام ۷۴ باندها چند شکل SSAP و ۶ صفت زراعی

میانگین مربعات				منبع واریانس	صفت
SSAP com	df	SSAPmax	df		
۷/۱۸۶**	۲	۱۱/۳۰۹**	۱	X(رگرسیون)	طول خوشه
۰/۵۶۷	۵۶	۰/۶۱۱	۵۷	Y(خطا)	
۱۱۹/۳**	۱	۱۹/۳**	۱	X	تعداد سنبلچه در خوشه
۲/۱	۵۷	۲/۱	۵۷	Y	
۲/۰۴۹**	۱۰	۵/۰۱۱**	۱	X	وزن صد دانه
۰/۱۸۶	۴۸	۰/۴۲۲	۵۷	Y	
۴۵۸/۱۲۷**	۶	۱۵۶۴/۶۸۱**	۱	X	تعداد دانه در خوشه
۳۶/۵۷۹	۵۲	۵۴/۲۱۸	۵۷	Y	
۱۵۰۳/۵۲۶**	۸	۵۶۸۹/۷۴۹**	۱	X	طول گیاه
۷۱/۸۳۳	۵۰	۱۷۴/۲۱۲	۵۷	Y	
۴۷۹/۵۱۳**	۵	۵۶۹/۰۴۷**	۱	X	طول پدانکل
۲۳/۶۳۹	۵۳	۳۶/۵۱۵	۵۷	Y	

*** و ** معنی داری در سطح ۰/۱ و خیلی معنی دار



شکل ۱ - شناسایی نشانگر آگاهی بخش برای صفات طول خوشه و تعداد سنبلچه در خوشه با استفاده از ترکیب آغازگری *BAREIM+CG* در تعدادی از نمونه های دوروم.

(L50) : سایز مارکر

منابع

- 1- Anderson, J.A., Churchill, J.E., Autrique, S.D., Tanksley, S., Sorrells, M.E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36, 181–188.
- 2- Breseghello, F. and Sorrells, M. E., Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, 2005, DOI 10.1534/genetics.105.044586.
- 3- Castilho, A., A. Vershinin and J.S. Heslop-Harrison. 2000. Repetitive DNA and the chromosomes in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Ann. Bot.* 85: 837–844.
- 4- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. HICKS. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant. Mol. Bio. Rep.*, (1):19–21.
- 5- Flavell, A.J., E. Dunbar., R. Anderson., S.R. Pearce., R. Hartley and A. Kumar. 1992. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic .Acids. Res.* 20: 3639–3644.
- 6- Gupta PK., Rustgi S and Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology* 57: 461–485.
- 7- Langridge P., Lagudah E S., Holton TA., Appels R., Sharp PJ and Chalmers KJ (2001) Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Australian. J. Agri. Res* 52: 1043–1077.
- 8- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Noli, E. and Tuberosa, R. 2005. Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Mol. Breed.*, 15, 271–289.
- 9- Neale DB , & Savolainen O (2004) Association genetics of complex traits in conifers. *Trends Plant Science* 9:325–330.
- 10- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2:225–238
- 11- Pearce, S.R., M. Knox., T.N.H. Ellis., A.J. Flavell and A. Kumar. (2000). Pea Ty1-copia group retrotransposons: transitional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. *Mol. Gen. Genet.* 263: 898–907.
- 12- Queen R, Gribbon B, James C, Jack P, Flavell A (2004) Retrotransposons-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Mol Gen Genet* 271:91-97
- 13- Quarrie, S.A., D. Dodig., S. Pekic., J. Kirby and Kobiljski B (2003). Prospect for marker- assisted selection of improved drought response in wheat. *Bulg. J. Plant. Physiol.* 91:83-95.
- 14- Roy JK., Bandopadhyay R., Rustgi S., Balyan HS and Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current science* 90:5-10
- 15- Waugh, R., K. McLean., A.J. Flavell., S.R. Pearce., A. Kumar., B.B.T. Thomas and W. Powell. (1997). Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequences-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol. Gen. Genet.* 253:687–694.