

**Molekulêre karakterisering van 'n *Aegilops speltoides*-
verhaalde translokasie en verkorte vorms**

deur

TAMRIN ANNELIE BEKKER



*Tesis ingelewer ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die
graad van Magister in die Natuurwetenskappe
aan die
Universiteit Stellenbosch*

Departement Genetika

Natuurwetenskappe

Studieleier: Prof. G. F. Marais

Datum: Maart 2009

VERKLARING

Deur hierdie tesis elektronies in te lewer, verklaar ek dat die geheel van die werk hierin vervat, my eie, oorspronklike werk is, dat ek die outeursregeienaar daarvan is (behalwe tot die mate uitdruklik anders aangedui) en dat ek dit nie vantevore, in die geheel of gedeeltelik, ter verkryging van enige kwalifikasie aangebied het nie.

Datum: 27 Februarie 2009

OPSOMMING

Die oordrag van teikengene vanaf verwante, wilde spesies na koring gaan gewoonlik gepaard met die gelyktydige oordrag van groot hoeveelhede spesie chromatien. Daardie spesie-chromatien wat op dieselfde chromosoomsegment as die teikengene voorkom mag as 'n koppelingsblok saam met die teikengene oorgeërf word, 'n verskynsel wat as koppeling-sleur ('linkage drag') bekend staan. Die graad van koppeling-sleur is uiteraard 'n funksie van die mate van homo(eo)logie en gevolglike meiotiese rekombinasie tussen die introgressie/translokasie en koringsegmente.

Die S13 translokasie is deur die departement Genetika, US ontwikkel na kruising van 'n *Aegilops speltoides* aanwinst met Chinese Spring (koring kultivar) en daaropvolgende terugkruising na Chinese Spring en W84-17 (koring teellyn). Hierdie translokasie het drie roes weerstandsgene met voorlopige simbole *LrS13*, *SrS13* en *YrS13*, gedra. Die drie gene was skynbaar onlosmaaklik gekoppel aan sogenaamde gametosied-gene (*Gc*-gene). Gametosied-gene veroorsaak swak planttipe, verlaagde vrugbaarheid en hibriednekrose in koring. Dit was dus nodig om die roes weerstandsgene van die *Gc*-gene 'los te maak' voordat dit in 'n kommersiële lyn vrygestel kan word.

Met die aanvang van hierdie studie is daar vier vermoedelik verkorte rekombinante vorms van die S13 translokasie beskikbaar gestel. Die vier lyne is uit 'n homoeoloë paringsinduksie-eksperiment (toetskruising: 04M127) geselekteer. Die huidige studie het ten doel gehad: (i) om die vier rekombinante molekule te karakteriseer, (ii) die inligting te gebruik om nog rekombinante in kruising 04M127 te probeer opspoor, (iii) die kortste rekombinante te identifiseer (iv) en te poog om die kortste rekombinante verder te verkort ten einde die *Gc*-gene te verwyder.

Sewe rekombinante (04M127-1, -2, -3, -4, -7, -11 en -12) van die S13 translokasie is tydens dié studie geïdentifiseer en gekarakteriseer. Hierdie rekombinante (groep A rekombinante genoem) het verskillende hoeveelhede spesie-chromatien vir koringchromatien verruil, maar die effekte van koppeling-sleur was nog duidelik sigbaar met die plante wat steeds aansienlike hibriednekrose asook verrimpelde saad getoon het.

Van die rekombinante het ook die broosaar-fenotipe van die wilde ouer getoon waar die are met rypwording na die eerste sjaar afbreek.

Daar is gevind dat rekombinant 3 die nuttigste van die sewe was. Daar is toe gepoog om hierdie rekombinant verder te verkort deur dit met koring (W84-17) te kruis. Bestande F_1 (heterosigoties vir die translokasie) is vervolgens getoetskruis met Chinese Spring nullisomies 3A tetrasomies 3B/D plante. Vyf-en-dertig bestande toetskruis F_1 plante is herwin (sg. groep B rekombinante). Die bestande groep B rekombinante asook nege vatbare toetskruis F_1 , wat ook geblyk het om gerekombineerd te wees, is met 'n mikrosatelliet en SCAR merkerpaneel gekarakteriseer. Uit die data het dit geblyk dat al 35 plante translokasies besit het wat grootskaalse rekombinasie ondergaan het en by al die merkerloci koringchromatien herwin het. Die oorblywende spesie-chromatien (waarop *LrS13* geleë is) kom waarskynlik by die 3AS telomeer voor of andersins digby die 3AS sentromeer of proksimale 3AL gedeelte. 'n SCAR-merker wat spesifiek is vir die S13 translokasie kon gebruik word om te bevestig dat daar steeds *Ae. speltoides* chromatien in elke groep B rekombinant voorkom. Hierdie merker het ook potensiaal om in die toekoms gebruik te word vir verdere verkorting van die translokasie, of as merker vir merker-bemiddelde seleksie. Saailingtoetse het getoon dat dié rekombinante nie meer die *SrS13* en *YrS13* gene dra nie.

'n Poging is aangewend om translokasie-spesifieke merkers te vind wat vir verdere karakterisering van die groep B rekombinante gebruik kon word. Vir die doel is gepubliseerde volgorde-inligting van *Ae. speltoides* spesifieke herhalings en transposons bekom en gebruik in 'n poging om translokasie-spesifieke merkers te ontwikkel. Hierdie poging was nie suksesvol nie en die inleiers het meesal dieselfde fragmente in die spesie-sowel as die koringgenome geamplifiseer. DArT-merkers is vervolgens gebruik om die 35 groep B rekombinante en kontroles te karakteriseer. Die DArT resultate het 'n onafhanklike verifiëring van die mikrosatelliet-resultate gegee. Daar kon bevestig word dat al 35 rekombinante waarskynlik die meerderheid spesie-chromatien uitgeruil het vir koringchromatien. Ten spyte van die grootskaalse rekombinasie is daar nog steeds aanduidings van *Gc*-effekte in die lyne. Hierdie effekte is egter klein en daar word verwag dat dit moontlik sal wees om deur verdere terugkruising en seleksie teen *Gc*-effekte materiaal daar te stel wat heeltemal vry sal wees van *Gc*-gene. Hoewel hierdie studie nie ten doel gehad het om *Gc*-gene te bestudeer nie, het hierdie gene kenmerke openbaar wat

in ooreenstemming is met die van transposons, en het hulle duidelik 'n drastiese invloed gehad op die selektiewe oorlewing van gerekombineerde gamete. Hierdie effekte dui op komplekse interaksies van veelvuldige *Gc*-gene op die vreemde chromatien, beide onderling en met genetiese faktore in die koringgenome.

ABSTRACT

Gene transfer from wild grass species to wheat is complicated by the simultaneous integration of large amounts of alien chromatin. The alien chromatin containing the target gene is inherited as a linkage block and the phenomenon is known as linkage drag. The degree of linkage drag depends on whether, and how readily, recombination occurs between the foreign and wheat chromatin.

The S13 translocation line was developed by the department of Genetics, US. A cross was made between Chinese Spring and a leaf rust resistant *Aegilops speltoides* accession. Resistant backcross F₁ was backcrossed to Chinese Spring and W84-17. S13 was selected from the backcross progeny and found to carry three rust resistance genes temporarily named *LrS13*, *SrS13* and *YrS13*. Unfortunately, the resistance genes were completely linked to gametocidal (*Gc*) genes that were co-transferred from the wild parent. In wheat *Gc* genes cause reduced fertility, poor plant phenotype and hybrid necrosis. In order to use employ the rust resistance genes commercially they need to be separated from the *Gc* genes.

At the onset of this study four putative shortened forms of the S13 translocation were provided. The four lines were identified in a homoeologous pairing induction experiment (involving the test cross 04M127). This study aimed to achieve the following: (i) characterize the four recombinants with the use of molecular markers, (ii) use the knowledge gained to identify further recombinants in the 04M127 cross, (iii) identify the shortest (most useful) recombinant, and (iv) attempt to shorten the shortest recombinant form still further and thereby remove as many of the *Gc* genes as possible.

In total, seven recombinants of the S13 translocation (04M127-1, -2, -3, -4, -7, -11 and -12; referred to as recombinant group A) were identified and characterised with microsatellite and SCAR markers. These recombinants have exchanged different amounts of foreign chromatin for wheat chromatin, but were still associated with *Gc* genes, showing hybrid necrosis and seed shrivelling. Some of the recombinants have lost the undesirable 'brittle rachis' phenotype which occurs in *Ae. speltoides* and the S13 translocation line. In plants

having this trait, the rachis spontaneously disarticulates after the third spikelet upon ripening of the ear.

Recombinant 3 appeared to be least affected by *Gc* genes and was therefore used in further attempts to shorten the translocation. Recombinant 3 was crossed with wheat (W84-17) and resistant F₁ (heterozygous for the translocation) were test crossed with Chinese Spring nullisomic 3A tetrasomic 3B/D plants. Thirty five resistant testcross F₁ plants were identified (named recombinant group B). The resistant group B recombinants as well as nine susceptible test cross F₁ (which also appeared to be recombinant) were characterised making use of microsatellites and a SCAR marker. From the results it appeared that each of the 35 resistant plants exchanged substantial amounts of *Ae. speltooides* chromatin for wheat chromatin. The species chromatin that remained (and which contains *LrS13*) is probably located either close to the 3AS telomere or within the proximal regions of 3AS and 3AL. A SCAR marker that has been developed specifically for the S13 translocation provided useful confirmation of the presence of *Ae. speltooides* chromatin in the 35 recombinants. If the SCAR marker proves to be tightly linked to *LrS13* it may eventually be used for marker assisted selection of the resistance or it may be employed in continued attempts to reduce the amount of foreign chromatin. Seedling rust resistance tests showed that the recombinants have lost *SrS13* and *YrS1* during recombination.

An attempt was also made to develop additional markers that specifically detect the translocation in order to further characterise the group B recombinants. Published information on *Ae. speltooides* specific repeated and transposon sequences were obtained and used for primer design. Unfortunately, no suitable markers could be found and the primers that were designed tended to amplify the same fragments in both the wheat and species genomes. DArT markers were also employed in an attempt to characterise the 35 group B recombinants and controls. The DArT results provided an independent verification of the results obtained with the microsatellite markers. The DArT results confirmed that the group B recombinants exchanged large amounts of species chromatin for wheat chromatin. Even though the 35 resistant group B recombinants have undergone extensive recombination they still show signs of residual *Gc* effects. It is believed these effects can be removed by continued backcrossing to wheat accompanied by selection against *Gc* symptoms. While the effects of *Gc* genes *per se* were not studied, their properties were reminiscent of those of transposable elements. Indications were that complex interactions

involving the *Gc* genes themselves as well as genetic factors in the wheat genome may have a drastic effect on the selective survival of recombinant gametes.

BEDANKINGS

Ek wil graag die volgende persone bedank:

- Die Hemelse Vader vir Sy krag en leiding tydens die voltooiing van hierdie tesis.
- My studieleier, Prof. G. F. Marais vir sy volgehoue aanmoediging, entoesiasme en vertrouwe in my werk.
- My ouers vir hul bystand, raad en aanmoediging.
- My kollegas in laboratorium 239. Dit was 'n plesier om saam met julle te werk.

INHOUDSOPGAWE

OPSOMMING	III
ABSTRACT	VI
BEDANKINGS	IX
LYS VAN FIGURE	XIV
LYS VAN TABELLE	XVII
LYS VAN AFKORTINGS	XIX
LYS VAN WEBTUISTES	XXIII
1. LITERATUUROORSIG	1
1.1. Agtergrond	1
1.2. <i>Triticum aestivum</i>	1
1.3. <i>Aegilops speltoides</i>	3
1.4. Roespatogene	3
1.4.1. Stam-/ swartroes	3
1.4.2. Blaar-/bruinroes	4
1.4.3. Streep-/geelroes	4
1.5. Vatbaarheid van koring vir roespatogene	5
1.6. Interspesifieke-hibridisasie	5
1.7. Translokasies	6
1.8. Chromosoom-manipulasie in koring	7
1.8.1. Inleiding	7
1.8.2. Hibridisasie en chromosoom-bemiddelde geenoordrag	7
1.8.3. Direkte geenoordrag na koring	9
1.9. Gametosied-gene	10
1.9.1. Inleiding	10
1.9.2. Oordrag van gametosied-gene na gewone koring	11
1.9.3. Die eliminasië van gamete as gevolg van chromosoom-fragmentasie	12
1.9.4. Benutting van gametosied-gene	13

1.9.5. Metodes vir die eliminasië van gametosied-gene	13
1.10. Transponeerbare genetiese elemente	14
1.10.1. Inleiding	14
1.10.2. Transponeerbare-elemente in plante	16
1.10.3. Onderlinge wisselwerking tussen transponeerbare-elemente en die gasheergenoom	19
1.10.4. Onderlinge wisselwerking tussen transponeerbare-elemente in die gasheergenoom	23
1.11. Moontlike bewyse vir gametosied-gene as transponeerbare-elemente	26
1.12. Molekulêre merkersisteme in genoom-analise van plante	27
1.12.1. DNS-gebaseerde merkersisteme	28
1.12.2. LTR-retrotransposons as molekulêre merkers	33
1.13. Diversiteits-reekse-tegnologie (DArT)	37
1.14. Agtergrond en oogmerke van hierdie studie	40
1.14.1. Agtergrond en uiteensetting	40
1.14.2. Oogmerke van studie	40
2. MATERIAAL EN METODES	42
2.1. Verloop van studie	42
2.2. Plantmateriaal	45
2.3. Deoksiribonukleïensuur- (DNS-) ekstraksie	48
2.4. Mikrosatelliet-tipering	48
2.5. Polimerasekettingreaksie (PKR) amplifikasie van mikrosatellietmerkers	50
2.6. Silwer-kleuring	50
2.7. Analise van die mikrosatelliet jelle	51
2.8. Opsporing van rekombinante S13-translokasie-homosigote	51
2.9. Saailing blaarroesweerstandstoetsing	52
2.10. Streeproes-weerstandstoetsing	52
2.11. Opspoor van <i>Aegilops speltoides</i>-spesifieke volgordes en gebruik daarvan om inleiers te ontwerp	52
2.12. Polimerasekettingreaksie (PKR) amplifisering met gebruik van <i>Aegilops speltoides</i>-gebaseerde inleierstelle	56
2.13. Gebruik van bestaande SCAR-merkers	56
2.14. DArT analise van S13 rekombinante	59

3. RESULTATE EN BESPREKING	60
3.1. DNS ekstraksie	60
3.2. Mikrosatelliet en RFLP merkerpaneel identifikasie	60
3.3. Karakterisering van S13-rekombinante 1 tot 4	61
3.3.1. Bepaling van die relatiewe groottes en liggings van die <i>Ae. speltoides</i> chromosoomstreke in rekombinante 1 tot 4	61
3.3.2. Identifikasie en karakterisering van homosigotiese, rekombinante 04M127-3A	67
3.3.3. Uitdrukking van die broos-aar (“fragile rachis”) fenotipe in die rekombinante lyne	68
3.3.4. Saadgehalte en sigbare gametosied-effekte	71
3.4. Identifikasie en karakterisering van verdere S13-rekombinante vorms	73
3.4.1. Saailing blaarroesweerstand-toetse vir verdere rekombinant identifikasie uit 04M127 families 5-55	73
3.4.2. Bepaling van die relatiewe groottes en liggings van <i>Ae. speltoides</i> chromatiën in rekombinante 7, 11 en 12	74
3.5. Poging om verdere <i>Aegilops speltoides</i>-spesifieke merkers te identifiseer	78
3.5.1. PKR-optimisering van <i>Aegilops speltoides</i> -spesifieke volgorde inleiers	78
3.5.2. Evaluering van sekere van die nuut-geïdentifiseerde <i>Ae. speltoides</i> spesifieke en koring-spesifieke volgorde-inleierstelle om te onderskei tussen S13 rekombinante	89
3.6. Poging om rekombinant 3 verder te verkort	96
3.6.1. Saailing blaarroesweerstand van die toetskruis F ₁	96
3.6.2. Merker-tipering van die toetskruis F ₁	96
3.6.3. Karakterisering van die bestande toetskruis F ₁ en nege van die vatbare toetskruis F ₁ met die volle merkerpaneel.	101
3.6.4. Bevestiging dat die 35 (groep B) rekombinante wat uit die kruising 04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D geselekteer is, nog steeds <i>Ae. speltoides</i> chromatiën besit	106
3.7. Die S13-geassosieerde streeproes- (<i>YrS13</i>) en stamroes- (<i>SrS13</i>) weerstandsgene	110
3.8. Gebruik van DArT-merkers om die groep B rekombinante verder te tipeer	110
4. SAMEVATTING	117

	XIII
5. VERWYSINGS	121
ADDENDUM A	140
ADDENDUM B	155
ADDENDUM C	163
ADDENDUM D	178
ADDENDUM E	186

LYS VAN FIGURE

- Figuur 1:** Die evolusionêre oorsprong van heksaploïede koring (aangepas vanaf Singh, 2003). 2
- Figuur 2:** Retrotransposon-gebaseerde merkermetodes. (A) SSAP: Volgorde-spesifieke-geamplifiseerde-polimorfisme. (B) IRAP: Inter-Retrotransposon-geamplifiseerde-polimorfisme. (C) REMAP: Retrotransposon-Mikrosatelliet-geamplifiseerde-polimorfisme. (D) RBIP: Retrotransposon-gebaseerde-invoeging-polimorfisme. (Gebaseer op 'n figuur van Schulman *et al.*, 2004). 39
- Figuur 3:** Hierdie skematiese voorstelling gee 'n uitleg van die verloop van die studie. Die dele wat bokant die stippellyn voorgestel word, het hierdie studie voorafgegaan. Die dele wat met letters aangedui word, verwys na die fases waarin die studie afgehandel is. 44
- Figuur 4:** (A) Volgorde van chromosoom 3A loci wat in die studie gebruik is. Die merkerloci word weergegee in hul mees waarskynlike volgorde soos blyk uit die gepubliseerde chromosoom 3A kaart (Röder *et al.*, 1998; Somers *et al.*, 2004; Sourdille *et al.*, 2004; Torada *et al.*, 2006; *GrainGenes*). (B) Fisiese kaart wat die C-band patroon van chromosoom 3A aandui (Gill *et al.*, 1991) met delesie breekpunte (onderstreep) wat die chromosoom in ses delesie-bundels verdeel (Qi *et al.*, 2003). Die geraamde posisie van die *broosaar*-geen (volgens Nalam *et al.*, 2006) word ook aangedui. Die fisiese kaart is benaderd, volgens die proporsies wat in Qi *et al.* (2003) weergegee word, geteken. 65
- Figuur 5:** Diagrammatiese voorstelling van die moontlike aard van die S13-translokasie in rekombinante vorms 1 tot 4. Die merkers wat grys gekleur is, was nie gekik vir die karakterisering van die rekombinante nie. 69
- Figuur 6:** Foto's van die broosaar-fenotipe wat in rekombinante vorms 1, 2 en 4 waargeneem is. Met ryppwording breek die are na die eerste syaar af. 70

- Figuur 7:** Verteenwoordigende saadmonsters van S13 rekombinante 1 tot 4 en die W84-17 kontrole lyn. **72**
- Figuur 8:** Diagrammatiese voorstelling van die moontlike ligging en grootte van die *Ae. speltoides* chromatiene in vier S13-rekombinante (3, 4, 11 en 12). **77**
- Figuur 9:** Agarose foto's van die PCR-produkte van ag *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes. (A) TST1, *Ae. speltoides*-transposon 1; (B) TST2, *Ae. speltoides*-transposon 2; (C) TST4, *Ae. speltoides*-transposon 4; (D) TST5, *Ae. speltoides*-transposon 5. (E) TST8, *Ae. speltoides*-transposon 8; (F) TST9, *Ae. speltoides*-transposon 9; (G) TST10, *Ae. speltoides*-transposon 10; (H) TSH2, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 2. (I) TSH4, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 4; (J) TSH5, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 5; (K) TSS1, *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde 1. Kontrole-paneel om te toets vir *Ae. speltoides*-spesifieke amplifikasie: (1) CS; (2) CS-S; (3) W84-17; (4) *Ae. speltoides*; (5) Volledige S13 translokasie. **82 tot 84**
- Figuur 10:** Agarose foto's van die PCR-produkte van vyf *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes. (A) TST3, *Ae. speltoides*-transposon 3; (B) TST6, *Ae. speltoides*-transposon 6; (C) TST7, *Ae. speltoides*-transposon 7; (D) TSH1, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 1. (E) TSH3, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 3. Kontrole-paneel om te toets vir *Ae. speltoides*-spesifieke amplifikasie: (1) CS; (2) CS-S; (3) W84-17; (4) *Ae. speltoides*; (5) Volledige S13 translokasie. **87, 88**
- Figuur 11:** Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegenereer met die *Ae. speltoides*-transposon 8 (TST8) inleierstel. Groep A rekombinante. **90**
- Figuur 12:** Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegenereer met die *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde 1 (TSS1) inleierstel. Groep A rekombinante. **90**
- Figuur 13:** Agarose jelfoto van die *Ae. speltoides*-transposon 6 (TST6) koring-spesifieke amplifikasieprodukt. Groep A rekombinante. **93**
- Figuur 14:** Agarose jelfoto van die amplifikasieprodukte gegenereer met die *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 3 (TSH3) inleierstel. Groep A rekombinante. **93**

- Figuur 15:** Agarose jelfoto van die SCAR 1 diagnostiese amplifikasieproduk wat spesifiek is vir die S13 translokasie. Groep A rekombinante. **95**
- Figuur 16:** Agarose jelfoto van die SCAR 2 diagnostiese amplifikasieproduk wat spesifiek is vir die S13 translokasie. Groep A rekombinante. **95**
- Figuur 17:** Agarose jelfoto van die SCAR 3 diagnostiese amplifikasieproduk wat spesifiek is vir die S13 translokasie. Groep A rekombinante. **95**
- Figuur 18:** Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegenereer in 'n toetskruis F₁ populasie met gebruik van die SSR-inleierstel *Xbarc57*. Plante 100-129, 194-198 is bestand; 130-193 is vatbaar asook kontrole-paneel. **98**
- Figuur 19:** Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegenereer in 'n toetskruis F₁ populasie met gebruik van die SSR-inleierstel *Xbarc294*. Plante 100-129, 194-198 is bestand; 130-193 is vatbaar asook kontrole-paneel. **99**
- Figuur 20:** Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegenereer in 'n toetskruis F₁ populasie met gebruik van die SSR-inleierstel *Xgwm674*. Plante 100-129, 194-198 is bestand; 130-193 is vatbaar asook kontrole-paneel. **100**
- Figuur 21:** Diagrammatiese voorstelling van die rekombinasiegebeure wat moontlik aanleiding gegee het tot die bestande en vatbare derivate uit die toetskruising: Rek 04M127-3A/W84-17//CSN3AT3B,D (Tabel 11). **105**
- Figuur 22:** Agarose jelfoto's van die amplifikasieprofiel gegenereer met drie SCAR-inleierpare (A-SCAR 1; B-SCAR 2; C-SCAR 3) spesifiek vir S13. Die genotipes wat getoets is, sluit in: 35 bestande toetskruis F₁ plante (rekombinante groep B) (100-129, 194-198) en 'n kontrole-paneel. **108**
- Figuur 23:** (A) Foto van sommige van die bestande, rekombinante groep B plante. (B) Aar ontwikkeling en vrugbaarheid van die plante was oënskynlik normaal. **109**

LYS VAN TABELLE

Tabel 1: Plantmateriaal wat in hierdie studie benut is.	47
Tabel 2: Inleiervolgordes, smeltingstemperature en fragmentgroottes van die mikrosatellietmerkers wat gebruik is vir die karakterisering van variante van die <i>Ae. speltoides</i> verhaalde S13 translokasie.	49
Tabel 3: <i>Aegilops speltoides</i> -spesifieke volgordes wat gekies is vir inleierontwerp in 'n poging om verdere merkers vir karakterisering van die S13 translokasie te bekom.	54
Tabel 4: Ontwerpte <i>Ae. speltoides</i> -spesifieke oligonukleotied inleiervolgordes en PKR-kondisies wat gebruik is om hul potensiële bruikbaarheid te toets.	55
Tabel 5: Geoptimiseerde konsentrasies van die PKR-reagense (<i>Bioline</i>) vir gebruik met <i>Ae. speltoides</i> -spesifieke inleierstelle.	57
Tabel 6: Oligonukleotied inleiervolgordes en PKR-kondisies. Van drie SCAR-merkers (Eksteen, 2008) wat spesifiek is vir die S13-translokasie.	58
Tabel 7: Geoptimiseerde konsentrasies van die PKR-reagense (<i>Bioline</i>) vir drie SCAR-merkers (Eksteen, 2008) wat spesifiek is vir die S13-translokasie.	58
Tabel 8: Resultate van die vier rekombinante S13 translokasies (04M127-1, -2, -3A en -4) en kontrole plante wat met die merker-paneel gegenotipeer is.	64
Tabel 9: Effek van die S13-translokasie en vier verkorte vorms daarvan op die gehalte van F ₁ -sade geproduseer uit resiproke kruisings en selfbestuiwing.	72
Tabel 10: Merker resultate van S13-rekombinante 3, 11 en 12 sowel as 04M127-7 en die kontrole plante.	76

Tabel 11: Resultate verkry na ontleding van al die bestande toetskruis F₁ (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D); nege van die oënskynlik gerekombineerde, vatbare toetskruis F₁ en die paneel van kontrole plante met een STS- en verskeie mikrosatelliet-merkers. **103**

Tabel 12: Resultate van die DArT ontleding van die groep A en die bestande groep B rekombinante. Slegs die merkers wat nie aan chromosome toegeken is nie en bruikbaar as S13 negatiewe merkers is, word getoon. **111**

Tabel 13: Resultate van die DArT analise op die groep A en bestande B rekombinante. Slegs die merkers wat aan chromosoom 3A toegeken is en bruikbare as S13 negatiewe merkers is, word getoon. **114**

Tabel 14: Resultate van die DArT analise op die groep A en bestande groep B rekombinante. Ses merkers wat aan verskillende chromosome toegeken is en bruikbaar is as S13 positiewe merkers, word getoon. **115**

LYS VAN AFKORTINGS

<i>Ae. speltoides</i>	<i>Aegilops speltoides</i>
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (geamplifiseerde-fragment-lengte-polimorfisme)
ANOVA	Analysis of Variance
bp	basispare
bv.	byvoorbeeld
cM	centi-Morgan
CS	Chinese Spring
CSDT3AL	CS ditelosomies 3AL
CSDT3AS	CS ditelosomies 3AS
CSN3AT3B	CS nullisomies 3A, tetrasomies 3B
CSN3AT3D	CS nullisomies 3A, tetrasomies 3D
CS-S	Chinese Spring short (kort)
DArT	Diversity Arrays Technology (Diversiteits-reekse- tegnologie)
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate dioksiribonukleotiedtrifosfaat
DNS	deoksiribonukleïensuur
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>En/Spm</i>	<i>Enhancer/Suppressor-mutator</i>
<i>et al.</i>	en ander (Latyns)
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (fluouesserende <i>in situ</i> Hibridisasie)
<i>Gc</i>	gametosied
GISH	Genomic <i>in situ</i> hybridization
°C	grade Celsius
IDT	<i>Integrated DNA technologies</i>
IT	infeksietipe
i.p.v.	in plaas van
IRAP	inter-retrotransposon amplified polymorphism

	(inter-retrotransposon-geamplifiseerde-polimorfisme)
LINEs	long interspersed nuclear elements (lang-verspreide-nukluêre-elemente)
LTR	long terminal repeat (lang-terminale-herhaling)
m/v	massa per volume
µl	mikroliter
MITEs	miniature inverted repeat transposable elements (miniatuur-inverse-herhaling-transponeerbare-elemente)
µM	mikromolaar
mM	millimolaar
ml	milliliter
mm	millimeter
M	molaar
MNH	N-nitrose-N-metiel-urea
ng	nanogram
NCBI	<i>National Center for Bioinformatic Information</i>
ORF	open reading frame (oop-leesraam)
PKR	polimerasekettingreaksie
<i>P. graminis</i>	<i>Puccinia graminis</i>
<i>P. recondita</i>	<i>Puccinia recondita</i>
<i>P. striiformis</i>	<i>Puccinia striiformis</i>
QTL	quatitive trait loci
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (lukraak-geamplifiseerde-polimorfiese-DNS)
RBIP	retrotransposon-based insertion polymorphisms (retrotransposon-gebaseerde-invoeging(“insertion”)- Polimorfisme)
rDNS	ribosomale-DNS
REMAP	retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (retrotransposon-mikrosatelliet-geamplifiseerde- polimorfisme)
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restriksie-fragment-lengte-polimorfisme)
RNS	ribonukleïensuur

RT	reverse transcriptase (terugtranskriptase)
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions (volgorde-gekaracteriseerde-geamplifiseerde-areas)
SINEs	short interspersed nuclear elements (kort-verspreide-nukluêre-elemente)
SNP	single nucleotide polymorphism (enkelnukleotied-polimorfisme)
SSAP	sequence specific amplified polymorphism (volgorde-spesifieke-geamplifiseerde-polimorfisme)
SSCP	Single-strand Conformation Polymorphism (enkel-string konformasie polimorfisme)
SSR	Simple Sequence Repeat (eenvoudige-volgorde-herhaling) (mikrosatelliet)
STR	Short tandem repeat (eenvoudige tandem herhalende volgorde)
<i>Taq</i>	ensiem naam afgelei van <i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TBE	TRIS, Boorsuur, EDTA
TE	transponeerbare-element
TEMED	N, N, N', N'-tetrametyleendiamien
TIRs	terminal inverted repeats (terminale-inverse-herhalings)
T_m	smeltingstemperatuur
<i>T. monococcum</i>	<i>Triticum monococcum</i>
<i>T. searsii</i>	<i>Triticum searsii</i>
<i>T. sharonensis</i>	<i>Triticum sharonensis</i>
<i>T. tauschii</i>	<i>Triticum tauschii</i>
<i>T. turgidum</i>	<i>Triticum turgidum</i>
<i>T. urartu</i>	<i>Triticum urartu</i>
TSH	<i>Aegilops speltoides</i> -herhalende volgorde
TSS	<i>Aegilops speltoides</i> -spesifieke volgorde
TST	<i>Aegilops speltoides</i> -transposon
VLPs	virus like particles (virus-agtige-partikels)
v/v	volume per volume
v.C.	voor Christus

U	eenhede (units)
UV	ultraviolet
W	Watt

LYS VAN WEBTUISTES

DArT	http://www.diversityarrays.com/
<i>Entrez Nucleotide</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide/
GrainGenes	http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml
IDT	http://www.idtdna.com/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI; BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi/
<i>PrimerQuestSM</i>	http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/
<i>Triticarte</i>	http://www.triticarte.com.au/

1. LITERATUUROORSIG

1.1. Agtergrond

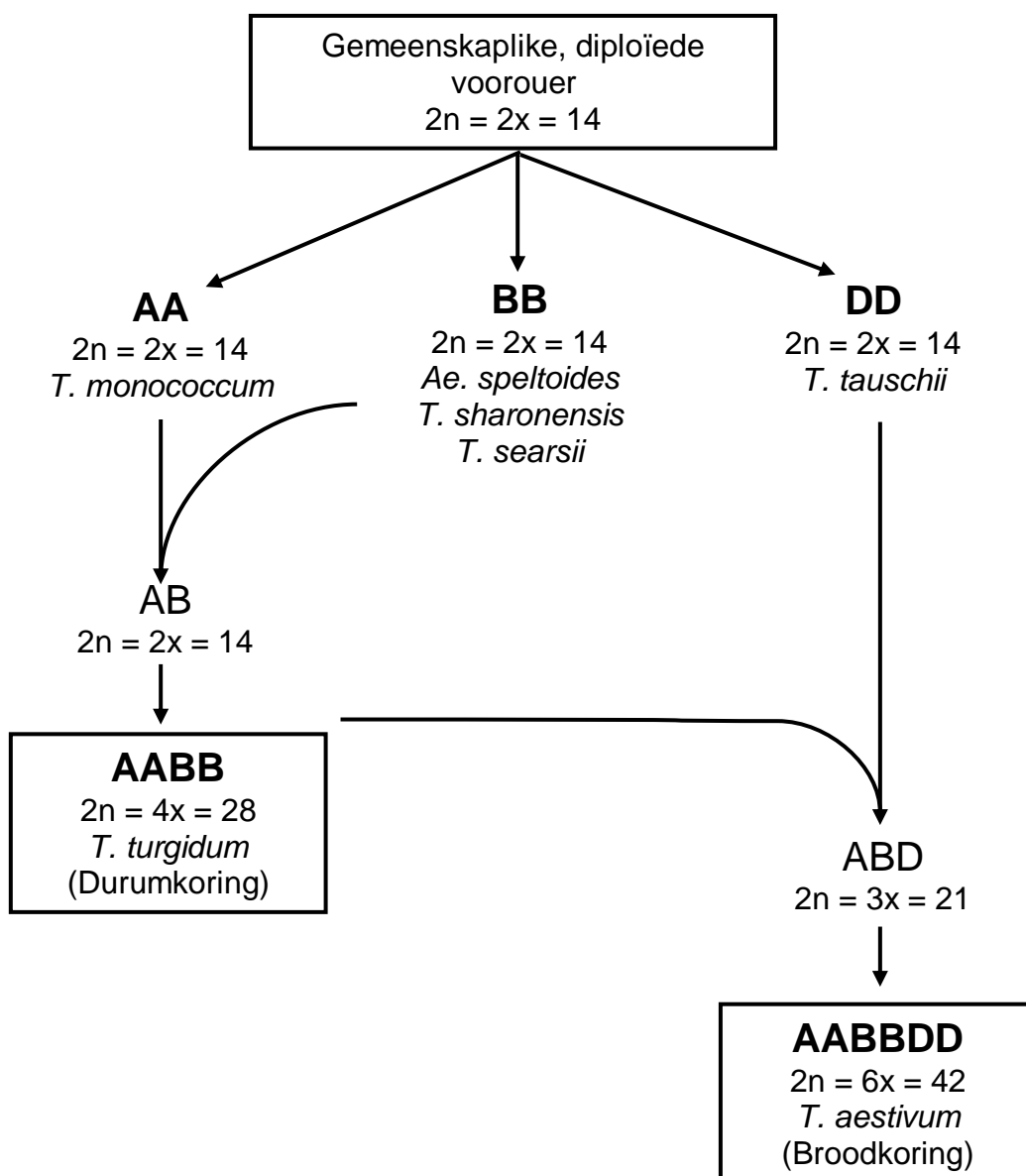
Broodkoring (*Triticum aestivum*) is een van die belangrikste stapelvoedsel gewasse in die wêreld en word reeds vir duisende jare verbou. Tydens domestikasie was koring patogene deurentyd teenwoordig en het die voorkoms van veral roessiektes 'n merkbare invloed op die ontwikkeling van die mensdom gehad (Large, 1940; Carefoot en Sprott, 1967; Roelfs *et al.*, 1992). Volgens Bybel-beskrywings moes Jakob en sy familie rondom 1870 v.C. in Egipte 'n ander heenkome vind nadat roes-epidemies uitbreek en hul bestaan bedreig het.

Roessiektes kan groot ekonomiese verliese veroorsaak wat vyftig tot sewentig persent van die jaarlikse oes mag beloop (Knott, 1989; McIntosh *et al.*, 1995). Vir die rede word grootskaalse pogings sedert die 1880's aangewend om roessiektes prakties en wetenskaplik te beheer. Dié aansienlike insette wat dit verg het daartoe gelei dat Large in 1940 opgemerk het, “the greatest single undertaking in the history of plant pathology was to be the attack on rusts in cereals”. Die stryd duur steeds voort.

1.2. *Triticum aestivum*

Broodkoring (*T. aestivum*) is 'n heksaploïed ($2n = 6x, 42$) met drie verskillende genome genaamd: A, B en D (Figuur 1). Riley *et al.* (1958) het met meiotiese paringsontledings getoon dat daar 'n hoë graad van ooreenkoms tussen die genoom van *Triticum monococcum* en die A-genoom van broodkoring is, en het voorgestel dat hierdie spesie die bron van die A-genoom van broodkoring moes wees. Deur dieselfde benadering te volg is daar vervolgens bepaal dat *Triticum tauschii* die bron van die D-genoom van koring is (Riley *et al.*, 1958). Verdere studies het daarop gedui dat verskeie spesies oorsprong aan die B-genoom van koring kon gegee het. Volgens Sasanuma *et al.* (1996) is die mees waarskynlike B-genoom skenkerspesie 'n lid van die onderafdeling *Sitopsis* van die genus *Triticum*. Die *Sitopsis* groep sluit die spesies *Aegilops speltoides*, *Triticum longissimum*, *Triticum searsii*, *Triticum sharonensis* en *Triticum bicornis* in. Van die voorafgaande is die S-genoom van *Ae. speltoides* die

waarskynlikste skenker van die B-genoom van koring, gegrond op RFLP-analise (Sasanuma *et al.*, 1996), Southern-klad analise van die genomiese DNS herhalende volgordes (Daud en Gustafson, 1996), studies van chromosoom-satelliet-morfologie (Riley *et al.*, 1958), geografiese verspreidings-opnames (Riley *et al.*, 1958), en homoeoloë paringsfrekwensies (Frenández-Calvin en Orellana, 1994).



Figuur 1: Die evolusionêre oorsprong van heksaploïede koring (aangepas vanaf Singh, 2003).

1.3. *Aegilops speltoides*

Volgens die klassifikasie van Linnaeus (1753) bestaan die *Triticeae* stam uit sewe genera insluitend *Triticum* en *Aegilops* (Kimber en Feldman, 1987). Die genus *Triticum* sluit die verboude koringspesies in terwyl *Aegilops* die wilde spesies, verwant aan koring, insluit. Siende dat daar nie wesenlike genetiese verskille en genetiese verbasteringsskanse tussen die *Triticum* en *Aegilops* spesies is nie, het Kimber en Feldman (1987) voorgestel dat die *Aegilops* spesies ingesluit word in die genus *Triticum*. *Ae. speltoides* ressorteer in die *Sitopsis* onderafdeling van die S-genoom spesies, is 'n diploïed en het 'n chromosoomgetal van $2n = 14$.

Volgens Riley *et al.* (1958) mag die S-genoom van *Ae. speltoides* by tye met die A-genoom van gewone koring paar. Paring kan ook plaasvind as die aktiwiteit van die *Ph1*-geen geleë op chromosoom 5BL (van gewone koring), wat chromosoomparing tydens meiose reguleer, gemodifiseer word (Friebe *et al.*, 1995).

1.4. Roespatogene

Koring roessiektes word veroorsaak deur drie roesswamme, naamlik: (i) *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* (veroorzaak stam-/ swartroes); (ii) *Puccinia triticina* (= *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*) (veroorzaak blaar-/ bruinroes); *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* (veroorzaak streep-/ geelroes) (McIntosh *et al.*, 1995).

1.4.1. Stam-/ swartroes

Stamroes staan ook as swartroes bekend weens die swart teliospore wat aan die einde van die groeiseisoen gevorm word (Knott, 1989). Stamroes is 'n gespesialiseerde patogeen, met ander woorde elke subspezie het ontwikkel om baie gasheer-spesifiek te wees. *P. graminis* f. sp. *tritici* val spesifiek tot koring, gars en ander koring-verwante spesies aan, maar sal nie rog of hawer aanval nie.

Stamroes is die mees vernietigende roestipe en kan 'n totale oes-verlies veroorsaak. Dit val al die bogrondse dele, insluitend: stamme, blare en are van die koringplante aan. Die skade wat aan die plante veroorsaak word, spruit uit 'n afname in wortelgroei, 'n

verlies aan die area wat vir fotosintese gebruik word, 'n verlies aan water- en voedingstofopname asook die breek van stamme. Saadverrimpeling en uiteindelik totale oesverlies, word bepaal deur die felheid van die aanval asook hoe vroeg in die seisoen die aanval plaasgevind het. Ongelukkig bevorder dieselfde omgewingskondisies wat die groei van koring bevorder ook die groei van stamroes. Belowende oeste kan dus in 'n baie kort tydjie heeltemal vernietig word.

1.4.2. Blaar-/bruinroes

Blaarroes, ook bekend as bruinroes, toon soos in die geval van stamroes ook gasheerspesialisasie. Die subspecies wat gespesialiseer is om koring aan te val staan alombekend as *P. recondita* f. sp. *tritici* (Knott, 1989).

Blaarroes is die algemeenste roessiekte. Dit kom in al die vernaamste produksiegebiede van die wêreld voor, insluitend: die Amerikas, Afrika, Europa, Asië, Australië en Nieu-Seeland.

Blaarroes val die blaarskywe, en tot 'n mindere mate die blaarskedes van koringplante, aan. Voortydige blaarverlies lei dan tot saadverrimpeling. 'n Totale oes-verlies is nog nie aangeteken nie, maar 'n oes-afname van tot 40% is wel reeds aangemeld (Knott, 1989). Die skade wat deur blaarroes aangerig word is nie só ernstig soos in die geval van stamroes nie, maar blaarroes kom wyer verspreid voor en veroorsaak in totaal 'n groter verlies aan opbrengs. Tydens 'n fel blaarroes-aanval kan al die blare van 'n plant ten volle met roes bedek wees. Die blare verouder en verdor dan vinnig, en lei tot verlies van die grootste gedeelte van die plant se fotosintese-oppervlak.

1.4.3. Streep-/geelroes

Streep- of te wel geelroes word veroorsaak deur die roesswam *P. striiformis* West. f. sp. *tritici* (Knott, 1989). Beide die algemene name wat aan dié roestipe toegeken is, is beskrywend. Hierdie roestipe vorm lang, geel strepe op die blare van koringplante. Al die bogrondse plantdele kan aangeval word, die korrels ingesluit. Die verlies aan saad-opbrengs word, soos in die geval van blaarroes, deur saadverrimpeling en 'n verlies aan blare teweeg gebring. Totale oes-verliese is nog nie aangeteken nie, maar 'n opbrengs-

afname van 75% is wel aangeteken.

Streeproes, in teenstelling met blaar- en stamroes het koeler temperature nodig om in te groei. Dit veroorsaak dat die voorkoms van streeproes beperk word tot hoogliggende areas asook tropiese areas waar koring in die koel, klam wintermaande geplant word.

1.5. Vatbaarheid van koring vir roespatogene

'n Breë en diverse basis vir genetiese weerstand in kultivars is uiteindelik noodsaaklik om die vatbaarheid van verboude koring vir roessiektes te verminder (Zhou en Dong, 1993). Erosie van genetiese diversiteit in koring te wyte aan swak bestuur en swak bewaring van hierdie hulpbron, tesame met die voortdurende ontstaan van nuwe roespatotipes, veroorsaak dat verboude koring baie kwesbaar is vir roessiektes (Antonov en Marais, 1996). Die gebruik van wilde, verwante spesies as addisionele bron van genetiese diversiteit vir siekteweerstand, geniet gevolglik geruime tyd reeds baie aandag.

1.6. Interspesifieke-hibridisasie

Erosie van die koring genepoel en die natuurlike evolusie van meer virulente patogene noodsaak die gebruik van natuurlike bronne van weerstand wat in die wilde, verwante spesies beskikbaar is. Weerstandsgene kan na hibridisasie met gewone koring uit die wilde spesies oorgedra word. Tegnieke wat hiervoor benut word, word bepaal deur die graad van verwantskap tussen die wilde skenkerspesie en broodkoring (Friebe *et al.*, 1996). Gebaseer op die moeilikhedsgraad van genoordrag na verboude koring, kan die wilde spesies opgedeel word in die primêre, sekondêre en tersiêre genepoele (Harlan en de Wet, 1971). Die primêre genepoel sluit in: *T. monococcum* (A-genoom), *T. tauschii* (D-genoom), wilde en verboude vorms van *T. turgidum* (A, B-genome) en die verboude rasse van *T. aestivum* (A, B, D-genome). Hierdié spesies se chromosome is homolog aan die chromosome van broodkoring en rekombinasie vind gereedlik plaas na hibridisasie.

Die sekondêre gene-poel sluit in: die poliploïede *Triticum* spesies wat ten minste een homoloë genoom met broodkoring deel. Die diploïede S-genoom spesies van die

Sitopsis-groep word hierby ingesluit, aangesien geenoordrag moontlik is deur rekombinasie alhoewel dit nie so gereedelik plaasvind nie.

Die tersiêre genepoel sluit daardie spesies in wat minder verwant is aan broodkoring. Chromosoomparing en rekombinasie kan slegs bemiddel word met die gebruik van meer komplekse tegnieke en die gebruik van *Ph1*-lose lyne.

Die *Ph1*-geen is op chromosoom 5BL van gewone koring, geleë. Die normale werking van dié geen is om die paring tussen homoeoloë chromosome te onderdruk en paring tussen homoloë chromosome te bevorder. Dus, kan slegs chromosome van dieselfde genoom tydens meiose met mekaar paar (A=A, B=B, D=D).

1.7. Translokasies

Kruisings tussen wilde spesies en koring met herhaalde terugkruising na koring kan spontane translokasies tot gevolg hê. Die terugkruising lei tot verskeie univalente van spesie en koring chromosome. Breking van die univalente se sentromere tydens metafase vind gereeld plaas. Die arms van verskillende chromosome mag weer verenig en soms aanleiding gee tot 'n chromosoom wat een koring en een spesie arm besit (Knott, 1987).

In 'n studie deur Friebe *et al.* (1996) is C-band-kleuring en *in situ* hibridisasie gebruik om koring-nie-koring translokasies wat na interspesifieke-hibridisasie herwin is, te karakteriseer. Van die 57 koring-nie-koring translokasies wat bestudeer is, het tien vanweë sentromeriese breking en fusie van chromosoomarms (Robertsoniese translokasie) ontstaan, twee was koring-nie-koring, interkalêre translokasies en die res (45) het uit terminale translokasies, met die distale segmente van nie-koring oorsprong, bestaan. Wanneer daar slegs na die *Ae. speltoides* translokasies gekyk is, kon afgelei word dat: (i) 'n groot gedeelte van die S-chromosoom gewoonlik getranslokeer het (ten minste 'n hele arm) en (ii) al is die S-genoom die donor van die B-genoom, translokasies nie noodwendig 'n chromosoom van die B-genoom betrek het nie.

1.8. Chromosoom-manipulasie in koring

1.8.1. Inleiding

Die wilde, verwante spesies van koring besit talle wenslike eienskappe wat na gewone koring oorgedra kan word. Siende dat gewone koring nie bestand is teen sekere roespatotipes nie, is verwante wilde grasse soms die enigste opsie om nuwe genetiese variasie vir weerstand te bekom. Wye kruisings gevolg deur sitogenetiese manipulasie van die hibriede was oor jare instrumenteel tot die genetiese verbetering van koring (Jauhar en Chibbar, 1999). Die oordrag van spesifieke siekte- en pes-weerstandsgene vanaf wilde, verwante spesies na gewone koring word moontlik gemaak deur die gebruik van chromosoom-manipulasie-tegnieke waaronder, die modifikasie van paringsbeheer-meganismes en die induksie van translokasies. *In situ* hibridisasie-tegnieke soos fluoressensie GISH in kombinasie met Giemsa C-band-kleuring kan gebruik word om die gras skenkerspesie se chromatien te karakteriseer en die oorgedraagde segment met teikengene in koring te identifiseer.

DNS-merkers soos RAPDs en RFLPs (sal later in diepte bespreek word) kan gebruik word om die wenslike genotipes te identifiseer en sodoende die oordrag van voordelige gene na koring te vergemaklik. Dié merkers asook mikrosatelliete kan dan verder aangewend word om die insluiting van die koring-vreemde gene in die koringgenoom te monitor. Die ontwikkeling van nuwe geenoordrag-tegnieke soos die direkte oordrag van DNS na embrioniese kallus-weefsel van koring, het nuwe deure oopgemaak vir die oordrag van gene. Alhoewel die *in vitro* tegnieke vir geenoordrag na koring vinnig ontwikkel, kan dit slegs dien as aanvullende hulpmiddel tot planteteelt, maar kan dit nie konvensionele planteteling vervang nie (Jauhar en Chibbar, 1999).

1.8.2. Hibridisasie en chromosoom-bemiddelde geenoordrag

1.8.2.1. Skep van hibriede en homoeoloë paringsinduksie

Die daarstelling van hibriede tussen koring en wilde, verwante spesies is die eerste stap in die oordrag van koring-vreemde gene na koring. Paring tussen koring-chromosome en spesie-chromosome is egter noodsaaklik vir suksesvolle geenoordrag. Paring tussen

homoeoloë chromosome van die koringgenoom asook paring tussen koring- en spesie-chromosome word egter normaalweg deur die werking van die *Ph1*-geen, op die lang arm van chromosoom 5B van koring, onderdruk (Sears, 1976). Die werking van die *Ph1*-geen beperk dus die inkorporering van koring-vreemde gene in die koringgenoom.

Sears (1956; 1972; 1981; 1984) het tegnieke voorgestel wat gebruik kan word om die probleme wat ondervind word met die paring van koring- en spesie-chromosome, te oorbrug. Die tegnieke berus op die daarstelling van plante sonder die *Ph1*-geen en behels onder meer die gebruik van: (i) *ph1*-mutante koringplante (Giorgi, 1978; Sears, 1984; Jauhar, 1990; Ceoloni *et al.*, 1996; Naranjo en Fernández-Rueda, 1996); (ii) plante nullisomies vir chromosoom 5B (Jauhar, 1991; Murai *et al.*, 1997; Jauhar en Almouslem, 1998); en (iii) wilde spesies soos *Ae. speltoides* wat die vermoë besit om die werking van die *Ph1*-geen te onderdruk (Riley *et al.*, 1968; Sears, 1976; Knott en Dvořák, 1981; Jauhar, 1975; 1977; 1992; Chen *et al.*, 1994; Jauhar, 1995; Farooq *et al.*, 1996; Jauhar en Joppa, 1996; Jauhar en Almouslem, 1998).

Die induksie van homoeoloë chromosoomparing tussen koring- en spesie-chromosome is 'n kragtige manier om koring-vreemde gene na koring oor te dra. Dit het egter beperkings, soos die verlaagde of algehele afwesigheid van oorkruising tussen die proksimale gedeeltes van die chromosoomarms van die twee spesies (Lukaszewski, 1995). Dit het tot gevolg dat gene in dié areas moeilik oorgedra kan word. Sears (1993) het egter voorgestel dat daar in hierdie gevalle van bestraling gebruik gemaak word om translokasies te induseer, gevolg deur seleksie vir kompenserende translokasies.

1.8.2.2. Robertsoniese translokasies tussen vreemde chromosome en koring-chromosome

Wanneer 'n breuk by die sentromeer van 'n chromosoom plaasvind, lei dit tot twee telosentriese chromosome. Indien daar sentromeriese breuke in meer as een chromosoom plaasgevind het, kan die arms van die twee verskillende chromosome verenig. Die produkte van sodanige uitruiling van chromosoomarms heet Robertsoniese translokasies. Robertsoniese translokasies verskaf 'n manier om 'n koring-vreemde chromosoomarm vir 'n homoeoloë, koring chromosoomarm te verruil. Die bekendste voorbeeld van 'n direk-buikbare koring Robertsoniese translokasie is

die vervanging van 1BS van koring met 1RS van rog wat tot bestandheid teen meeldou, streeproes, blaarroes, en stamroes van koring gelei het (Rajaram *et al.*, 1983; Zeller en Hsam, 1983). Soortgelyke 1RS-translokasies na 1BS en 1AL van koring het ook spontaan ontstaan en het daartoe bygedra dat hierdie die mees suksesvolle koring-vreemde na koring translokasies vir die verbetering van koring is (Friebe *et al.*, 1996; Villareal *et al.*, 1998).

Spontane translokasies is egter nie noodwendig altyd Robertsonies van aard nie. Wang *et al.* (1998) verskaf voorbeelde van nie-Robertsoniese translokasies tussen koring en rog.

1.8.2.3. Translokasies (geenoordrag) deur middel van bestraling

Indien die meiotiese paringsfrekwensie van koring- en spesie-chromosome laag of algeheel afwesig is, kan X-straal behandeling gebruik word om translokasies tussen die koring- en spesie-chromosome te induseer. Die proses geskied lukraak, maar daar kan soms koring-chromosome met segmente van die spesie-chromosome wat die gewenste gene dra, herwin word. Sears (1956) het van ioniserende bestraling gebruik gemaak om 'n blaarroes weerstandsgeen vanaf *Aegilops umbellulata* na chromosoom 6B van gewone koring oor te dra. Knott (1987) en Sebesta *et al.*, (1995) het van soortgelyke prosedures gebruik gemaak om onderskeidelik gene van rog en *Agropyron* na koring oor te dra.

1.8.3. Direkte geenoordrag na koring

Chromosoom-bemiddelde geenoordrag vanaf wilde, verwante spesies na koring het reeds gelei tot groot genetiese verbetering. Hierdie vorm van geenoordrag het egter ook nadele en beperkinge. Een van die nadele is die soms onvermydelike, parallelle oordrag van ongewenste koring-vreemde gene/chromosome. Chromosome met nadelige gene soos gametosied-gene kan in absolute koppeling met die teikengene oorgeërf word. Die oordrag van ongewenste kenmerke na koring staan as koppelings-sleuring ("linkage drag") bekend (Brinkman en Frey, 1977).

Die ontwikkeling van direkte geenoordrag-tegnieke het dit origins moontlik gemaak

om nuwe gene vanaf onverwante organismes na koring oor te dra. Só iets sou baie moeilik/onmoontlik met konvensionele tegnieke gedoen kon word. Genetiese manipulerings behels die direkte oordrag en integrering van DNS vanaf nie-verwante organismes na plantselle. Getransformeerde weefsel word dan gebruik om vrugbare plante wat die ingeslote-gene besit, te regeneer. Dié tegnologie verleen toegang tot 'n onuitputbare gene-pool sonder die beperkings wat met konvensionele hibridisasie-oordrag gepaard gaan (Jauhar en Chibbar, 1999).

Ten spyte van die belang van koring as stapelvoedsel, was dit een van die laaste belangrike verboude gewasse waarvoor transformasie-tegnieke ontwikkel is (Jauhar en Chibbar, 1999). Die stadige vordering met die ontwikkeling van transgeniese koring word aan twee redes toegeskryf, naamlik: die afwesigheid van 'n effektiewe *in vitro* regenerasie-sisteem; die feit dat graangewasse buite die gasheerreëks van *Agrobacterium* val. Transgeniese koring kan tans daargestel word met gebruik van 'n kombinasie van biolitiese-bemiddelde gene-oordrag en 'n hoogs effektiewe regenerasie-sisteem. 'n Suksesvolle *Agrobacterium*-bemiddelde oordrag-sisteem kon ook vir koring ontwikkel word (Cheng *et al.*, 1997).

1.9. Gametosied-gene

1.9.1. Inleiding

Gametosied- (*Gc*-) gene of -faktore in koring veroorsaak segregasie-distorsie en affekteer plante se vrugbaarheid (Nasuda *et al.*, 1998). Plante heterosigoties of hemisigoties vir *Gc*-gene is semisteriel. Gamete wat *Gc*-gene bevat, is funksioneel en die daarsonder word geaborteer. Dus geskied segregasie-distorsie deurdat slegs die gamete met *Gc*-gene selektief na die nageslag oorgedra word (Endo en Tsunewaki, 1975; Maan, 1975; Endo, 1990;). Daar word ook na *Gc*-gene of -chromosome verwys as “cuckoo”-chromosome (Finch *et al.*, 1984), gameet-elimineerder-gene, gameet-aborteerder-gene en selfs stuifmeel-doder-gene (Endo, 1990) afhangende van hul werking of effekte in die gasheergenoom.

Gene en chromosome wat verantwoordelik is vir die eliminering van nie-draer gamete is nie net tot die planteryk beperk nie. Soortgelyke verskynsels is ook in swamme

(Tsujiimoto en Tsunewaki, 1985a) en die vrugtevlieg, *D. melanogaster* (Crow, 1979; Tsujimoto en Tsunewaki, 1985a; 1985b), waargeneem. Omdat segregasie-distorsie in 'n wye verskeidenheid van organismes voorkom, is daar voorgestel dat *Gc*-gene 'n belangrike evolusionêre rol mag hê (Scoles en Kibirige-Sebunya, 1983). Dit mag byvoorbeeld geenoordrag tussen spesies verhoog wanneer 'n chromosoom wat voorkeur oordrag toon, betrokke is (Scoles en Kibirige-Sebunya, 1983). Endo (1990) het verder voorgestel dat dit as 'n verbasteringskans mag dien. Wanneer twee verskillende populasies van plante (wat geslagtelik verenigbaar is) verbaster word die hibriede, wat heterosigoties vir 'n *Gc*-geen is, selektief benadeel en kan populasies sodoende in isolasie kans kry om in nuwe spesies te differensieer. Daar kan ook nuwe spesies gevorm word wanneer hibridisasie tussen draer en nie-draer plante plaasvind. Die mutasies wat vorm tydens die proses veroorsaak genoom-herrangskikking. As die daaropvolgende genotipe beter aangepas is by omgewingstoestande sal 'n plant wat geneties verskillend van die ouertipes is, vorm (Endo, 1987).

Gametosied-gene beskik oor sekere algemene kenmerke (Middleton, 1998), naamlik: (i) in die meeste *Gc*-heterosigote is daar 'n persentasie nie-draer gamete wat die eliminasië-proses oorkom en lewensvatbaar is (Middleton, 1998); (ii) dit blyk dat *Gc*-gene teen 'n hoër frekwensie deur manlike gamete as vroulike gamete oorgedra word. Chromosoom-abnormaliteit en saadverrimpeling is ook meer algemeen as die gene deur stuifmeel oorgedra word (Endo, 1990); (iii) plante homosigoties vir die *Gc*-gene blyk normaal te wees in voorkoms en vrugbaarheid en die wat heterosigoties is, is semi-steriel en hul nageslag toon chromosoom-abnormaliteite (Tsujiimoto en Tsunewaki, 1985b); (iv) die *Gc*-effek word ook deur die genotipe van die plant beïnvloed, sodat sekere genotipes die oordrag van *Gc*-gene bevorder terwyl ander dit verhoed (Endo, 1978; Kibirige-Sebunya en Knott, 1983); (v) *Gc*-gene word nie deur al die natuurlike populasies van wilde gras-spesies gedra nie (Miller, 1983); (vi) die verskillende populasies van wilde grasspesies mag *Gc*-gene dra wat verskillende eienskappe toon (Endo, 1985).

1.9.2. Oordrag van gametosied-gene na gewone koring

Gametosied-gene word onbewustelik na koring oorgedra tydens interspesifieke-

hibridisasie met verwante *Triticum* spesies en daaropvolgende terugkruising na gewone koring (Endo, 1990). Die wilde spesie se chromosome met *Gc*-gene word selektief of selfs uitsluitlik behou. In sekere gevalle word segmente van die koring-vreemde chromosome met die *Gc*-gene daarop na homoeoloë chromosome van koring getranslokeer (Tsujimoto en Tsunewaki, 1984).

Gametosied-chromosome is reeds in verskeie *Triticum* spesies geïdentifiseer en geklassifiseer in die onderafdelings: *Cylindropyrum* (Endo en Katayama, 1978; Endo, 1979; 1996); *Polyeides* (Endo en Tsunewaki, 1975; Friebe *et al.*, 1998) en *Sitopsis* (Maan, 1975; 1980; Endo, 1982; Miller *et al.*, 1982; Endo, 1985; Friebe *et al.*, 1993). Die *Sitopsis*-groep sluit chromosome 2S en 6S van *Ae. speltoides* in (Tsujimoto en Tsunewaki 1983; 1988; Kota en Dvořák, 1988). Na studies van onderlinge interaksies tussen die verskillende *Gc*-gene in dubbel-monosomiese chromosoom-addisie- en substitusie-lyne het beide Endo (1990) en Tsujimoto (1995) tot die gevolgtrekking gekom dat *Gc*-gene op dieselfde homoeoloë groep chromosome, dieselfde effekte/kenmerke het.

1.9.3. Die eliminasië van gamete as gevolg van chromosoom-fragmentasie

Endo (1990) het waargeneem dat daar strukturele chromosoom-afwykings in al die nageslag van plante, monosomies vir 'n *Gc*-chromosoom, voorkom. Chromosoom-mutasies of -breuke word in bykans alle *Gc*-sisteme waargeneem. Endo (1990) het, gebaseer op hierdie waarnemings, tot die gevolgtrekking gekom dat die primêre aksie van *Gc*-gene die induksie van chromosoom-breuke in gamete wat nie die *Gc*-gene bevat nie, behels. Indien die chromosoom-skade ernstig van aard is, is die gamete nie-funksioneel en word geaborteer. Indien die skade egter nie só ernstig is nie, kan die gameet funksioneel bly en kan beskadigde chromosome na die nageslag oorgedra word.

Nasuda *et al.* (1998) het breedvoerige sitologiese studies van manlike gametogenese in drie verskillende *Gc*-sisteme in "Chinese Spring" genetiese agtergrond gedoen. Die drie *Gc*-sisteme het verskil in hul vermoë om chromosoom-breuke te induseer. Die studie is gebaseer op waarnemings deur Maan (1975), Miller *et al.* (1982) en Tsujimoto en Tsunewaki (1984) rakende die *Gc*-gene op chromosome, 2S en 4S^{sh}, van *Ae.*

speltoides en *T. sharonensis*. Die betrokke *Gc*-gene het sterk *Gc*-effekte getoon en gamete sonder dié gene het nie aan bevrugting deelgeneem nie. Nasuda *et al.* (1998), het gevind dat chromosoom-breuke tydens anafase van meiose I met stuifmeelvorming in alle plante wat hemisigoties vir die *Gc*-gene is, plaasvind. Verder het die morfologie van die chromosoom-fragmente daarop gedui dat die *Gc*-gene voor die S-fase van die eerste stuifmeel-meiose siklus uitgedruk word.

1.9.4. Benutting van gametosied-gene

Gametosied-gene kan gebruik word om delesie-lyne daar te stel vir chromosoom kartering en vir gebruik in planteteelt. Sulke delesie-lyne kan saam met DNS-merkers gebruik word om gene toe te wys aan areas tussen die breekpunte van twee delesies (Gill *et al.*, 1993; Kota *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1995; Hohmann *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1996). Die delesie-lyne kan dan in assosiasie met *in situ* hibridisasie en chromosoom band-kleurings-tegnieke gebruik word vir die konstruksie van delesie-kaarte in koring (Endo, 1990).

Teoreties sou *Gc*-gene onder sekere omstandighede nuttig aangewend kon word in seleksie-programme. Voordelige gene wat nou gekoppel is aan *Gc*-gene, mag dan by voorkeur saam met die *Gc*-gene oorgedra word in kruisings. Planttelers, sou dus nie vir hierdie gene hoef te selekteer nie en kan op ander eienskappe fokus (Endo, 1990). Duidelik sou dit slegs moontlik wees indien die *Gc*-geen geen nadelige, gekoppelde effekte het nie.

1.9.5. Metodes vir die eliminasië van gametosied-gene

Interspesifieke-hibridisasie kan gebruik word om voordelige gene na spesies oor te dra wat dit nie besit nie. Dié vorm van gewas-verbetering mag soms gekompliseer word deur die gelyktydige oordrag van *Gc*-gene wat met die voordelige gene geassosieer is. Gametosied-gene gaan soms gepaard met ernstige, nadelige effekte soos steriliteit, saadverrimpeling, chromosoombreuke en hibried-nekrose (Marais en Pretorius, 1996). Marais en Pretorius (*op cit.*) het probeer om 'n *Gc*-geen(e) wat skynbaar onlosmaaklik met 'n stamroesweerstandsgeen (verhaal vanaf *Ae. speltoides*) segregeer het, deur mutagenese te inaktiveer. Hulle het twee benaderings hiervoor gevolg, naamlik: MNH

(N-nitrose-N-metiel-urea) behandeling van sade en die bestraling (gammastrale) van plante, homosigoties vir die *Gc*-geen (*Gc/Gc*), tydens megasporogenese. Hoewel toetskruis-nageslag met bo-gemiddelde vrugbaarheid en potensieel onaktiewe *Gc*-gene verhaal is, was die effekte nie blywend nie (Marais 2007, persoonlike mededeling).

1.10. Transponeerbare genetiese elemente

1.10.1. Inleiding

DNS-fragmente wat instaat is om hulself uit hul posisies in die genoom te sny en dan weer in ander posisies te integreer, of wat duplikaat kopieë van hulself kan maak en die nuwe kopieë elders in die genoom kan laat invoeg, staan as transponeerbare-elemente (TEe) bekend. Sedert die aanvang van grootskaalse DNS volgorde-bepaling, het dit bekend geword dat TEe nie 'n raar verskynsel is wat net in sommige genome voorkom nie, maar dat dit die grootste komponent van genetiese materiaal in baie eukariotiese genome uitmaak. Transponeerbare-elemente beslaan ten minste 45% van die mensgenoom (Lander *et al.*, 2001) en tussen 50% en 80% van sommige grasspesie-genome (SanMiguel *et al.*, 1998; Vicient *et al.*, 1999; Meyers *et al.*, 2001).

Transponeerbare-elemente is eerste in mielies deur Barbara McClintock ontdek. Sy het getoon dat TEe die oorsaak van areas van gewysigde pigmentasie in mutante mielie-pitte is (McClintock, 1951). Sy het in 1983 die Nobel-prys vir haar werk in verband met TEe ontvang, nadat TEe ook in die genome van *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans* en mense aangetoon is (Berg en Howe, 1989).

Aktiewe TEe maak slegs 'n klein breukdeel van die volle getal TEe in die genome van mielies, asook meeste multisellulêre organismes, uit. Daarteenoor word die genome van hoër eukariote deur duisende en selfs miljoene, skynbaar onaktiewe, TEe beslaan (Feschotte *et al.*, 2002).

Die TEe wat in die genome van eukariote aangetref word, word in twee klasse opgedeel. Die twee klasse word onderskei op grond van watter transponerings-tussenganger teenwoordig is, nl. RNS (Klas-1) of DNS (Klas-2). Boodskapper-RNS

wat vanaf die TE getranskripteer word dien as die transponerings-tussenganger vir die klas-1 elemente teenoor die klas-2 elemente waar die element self dien as die transponerings-tussenganger. Elke groep van TEE bevat beide outonome asook nie-outonome elemente. Die outonome elemente besit oop-leesrame wat kodeer vir al die produkte wat benodig word vir transponering. Die nie-outonome elemente wat wel instaat is om te transponeer, besit nie enige merkbare koderings-vermoë nie, maar wel die *cis*-volgordes wat nodig is vir transponering. Nie-outonome elemente benut die produkte van gene in outonome elemente om na nuwe chromosoomposisies te beweeg. Die beweging en integrasie van die meerderheid TEE lei tot die duplikasie van 'n kort genomiese volgorde by die posisie van integrasie. Hierdie duplikasie volgordes kan wissel in grootte en/of volgorde tussen transponeerbare-element-families en superfamilies.

1.10.1.1. Klas-1 transponeerbare-elemente

Die klas-1 TEE word verder in twee groepe ingedeel op grond van hul struktuur asook hul transponerings-meganisme (Feschotte *et al.*, 2002). Die twee groepe is onderskeidelik die lang-terminale-herhaling (LTR) retrotransposons en die nie-lang-terminale-herhaling (nie-LTR) retrotransposons. Die LTR-retrotransposons besit lang terminale herhalings (LTRs) wat in 'n 5'-3' rigting voorkom. Die aktiewe elemente besit ten minste twee gene, naamlik *gag* en *pol*. Dié gene is gesetel in die gebied tussen die twee LTR-volgordes en kodeer vir die proteïene verantwoordelik vir die transkripsie en integrasie van die LTR-retrotransposons. Die meeste, of al hierdie koderende volgordes, ontbreek in die nie-aktiewe elemente (Jin en Bennetzen, 1989; Witte *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002). Die nie-aktiewe elemente se interne area kan varieer in grootte, en verskil van die interne volgorde van die aktiewe elemente (Jiang *et al.*, 2002).

Die nie-LTR-retrotransposons word verdeel in lang-verspreide-nukleêre-elemente (LINEs) en kort-verspreide-nukleêre-elemente (SINEs). Die LINEs en SINEs se koderende areas sluit in: *ORF1* (oop-leesraam 1) wat kodeer vir 'n proteïen soortgelyk aan die *gag*-proteïen (nukleokapsied proteïen rondom RNS van 'n retrovirus); *En*, wat kodeer vir 'n endonuklease en *RT* wat kodeer vir 'n terugtranskriptase. Beide LINEs en SINEs eindig gewoonlik in 'n eenvoudige poli-A herhalende volgorde. Die SINEs wat

tot op hede beskryf is besit almal 'n interne RNS *pol III* (polimerase III) promotor wat naby die 5'-beginpunt van die elemente geleë is. Dit is tans nog onbekend wat die oorsprong van die 3'-helfte van die SINEs is, maar dit is wel bekend dat die laaste gedeelte van die 3'-kant homologie toon met die 3'-stert van die LINEs wat in dieselfde genoom voorkom. Ogiwara *et al.* (1999) het voorgestel dat dit die SINEs toelaat om die transponerings-gereedskap van die LINEs te gebruik vir hul eie transponering.

1.10.1.2. Klas-2 transponeerbare-elemente

Die klas 2 TEE, ook bekend as DNS-transposons, besit terminale-inverse-herhalings (TIRs) en teiken-area duplikasies van gekonserveerde lengte in die element se superfamilies (Feschotte *et al.*, 2002). Voorbeelde hiervan is die 8 bp volgorde van *hAT* (transposon superfamilie) en die TA-volgorde van *Tc1/mariner* (transposon superfamilie).

Dié klas van elemente transponeer by wyse van 'n DNS-tussenganger waar die element self uitgesny word en êrens anders in die genoom by 'n teiken-area geïntegreer word (Berg en Howe, 1989; Craig *et al.*, 2002). Die nie-aktiewe elemente van 'n familie het hul oorsprong uit 'n aktiewe lid en word gekenmerk deur 'n delesie van die interne volgorde van die aktiewe lid wat hulle sodoende onaktief laat.

1.10.2. Transponeerbare-elemente in plante

Hierdie afdeling is grotendeels gebaseer op 'n oorsigartikel deur (Feschotte *et al.*, 2002).

Daar is twee soorte TEE wat teen hoë kopiegetalle in die genome van plante voorkom, naamlik: die miniatuur-inverse-herhaling-transponeerbare-elemente (MITEs = 'miniature inverted repeat transposable elements') en die lang-terminale-herhalings (LTR)-retrotransposons (soos reeds bespreek). LINEs en SINEs word ook in plantgenome aangetref, maar slegs in die genome van sekere spesies waar dit in hoë kopiegetalle voorkom (Leeton en Smyth, 1993; Yoshioka *et al.*, 1993).

Plantgenome word as evolusionêre baie dinamies beskou en dit is grootliks te wyte aan

die aktiwiteit van die TEE daarin vervat. Die dinamiek en genoom-evolusie op beide die interspesifieke en intraspesifieke vlakke word egter nie deur die aktiewe elemente veroorsaak soos verwag sou word nie, maar wel deur die hoë-kopiegetal nie-transposisioneel-aktiewe elemente.

Jare se navorsing op die komplekse en diverse mutante fenotipes wat deur die invoeging en uitsnyding van klas-2 elemente in plantgene veroorsaak word, het 'n wye verskeidenheid van maniere blootgelê waarvolgens TEE geen-regulering kan wysig. Gene en regulatoriese areas kan sogenaamde 'transposon-voetspore' ('n paar ekstra basispare in die volgorde) oorhou, wat gewoonlik agterbly nadat die element uitgesny is. Daar is voorbeelde van sekere nie-aktiewe elemente bv. MITEs (Bureau en Wessler, 1992; 1994; Bureau *et al.*, 1996) wat funksioneer soos introns, maar nie uitgesny word nie en dan die oop-leesrame van gene versteur. Weefsel-spesifieke patrone van uitdrukking kan ook gewysig word wanneer elemente ingevoeg word in promotors of ander regulatoriese volgordes. Hierdie twee voorbeelde is dus maniere waarop TEE geen-regulering kan wysig (Wessler, 1988; McDonald, 1995; Kidwell en Lisch, 1997).

MITEs en LTR-retrotransposons het 'n groot effek gehad op die organisasie en evolusie van plantgenome vanweë hul ligging in hierdie genome (Wessler *et al.*, 1995). MITEs is klein nie-aktiewe elemente wat hoofsaaklik in die nie-koderende areas van grasgene voorkom (Bureau en Wessler, 1992; 1994; Bureau *et al.*, 1996). Die voorkoms van MITEs in die geen-ryke areas van plantgenome is verder bevestig nadat die volledige genoom-volgorde van *Arabidopsis* en die gedeeltelike genoom-volgorde van rys (Jiang en Wessler, 2001; Turcotte *et al.*, 2001) bepaal is.

MITEs word meestal in areas naby gene aangetref. Daar is verskeie voorbeelde van MITE-invoegingspolimorfismes in die promotors, introns of 3' aangrensende volgordes van ortoloë en paraloë gene (Bureau en Wessler, 1992; 1994; Unsal en Morgan, 1995; Bureau *et al.*, 1996; Casacuberta *et al.*, 1998; Izsvak, *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). MITEs is dus volgens Feschotte *et al.* (2002) 'n belangrike faktor in die daarstelling van strukturele alleliese diversiteit.

Gedurende die laaste dekade het dit bekend geword dat alhoewel die MITE-tipe TEE algemeen in of naby plant-gene voorkom, dit die LTR-retrotransposons (kom algemeen

in nie-koderende areas voor) is wat die grootste deel van die meeste plantgenome uitmaak (Kumar en Bennetzen, 1999). LTR-retrotransposons is vir die eerste keer in plante ontdek nadat dit bekend geword het dat hulle die bron van beide spontane sowel as geïnduseerde mutasies in beide mielies en tabak is (Johns *et al.*, 1985; Grandbastien *et al.*, 1989; Varagona *et al.*, 1992). LTR-retrotransposons kom voor as lae tot matig herhalende element families (Grandbastien *et al.*, 1989; Hirochika *et al.*, 1996; Marillonnet en Wessler, 1998; Meyers *et al.*, 2001). Dit is egter sedert die 1980s bekend dat beide die LTR- en die nie-LTR-retrotransposons hoë kopiegetalle in plantspesies met groot genome kan bereik (Kumar en Bennetzen, 1999). Verskeie studies het onlangs gevind dat die differensiële amplifikasie van LTR-retrotransposons hoofsaaklik verantwoordelik is vir die ‘C-waarde-paradoks’ wat waargeneem word in die gras-gewasse wat van landboukundige belang is (Feschotte *et al.*, 2002). Die ‘C-waarde-paradoks’ behels dat ’n toename in die DNS-inhoud van ’n organisme nie noodwendig verband hou met ’n verhoogde kompleksiteit van die organisme nie (Thomas, 1971). Die ‘C-waarde-paradoks’ geld vir beide plant- en dier-spesies, maar die basis daarvoor kon tot dusver nog net vir lede van die gras-familie getoon word. Vir die gras-familie is daar gevind dat die deel van die genoom wat deur LTR-retrotransposons bygedra word, toeneem met genoomgrootte. So het rys die kleinste gekarakteriseerde grasgenoom (~ 15% LTR-retrotransposons) (Jiang en Wessler, 2001) terwyl die mieliegenoom uit ~ 50-80% retrotransposons bestaan (SanMiguel en Bennetzen, 1998; Meyers *et al.*, 2001) en die garsgenoom uit meer as 70% retrotransposons bestaan (Vicient *et al.*, 1999).

1.10.2.1 Rol van transponeerbare elemente in genoomevolusie

Twee studies in die gras-familie het lig gewerp op die sogenaamde ‘dinamiese genoom’ begrip. In die eerste studie deur SanMiguel *et al.* (1996) is die 280-kb area rondom die mielie *adh1*-(alkohol dehidrogenase 1)-geen ondersoek, en is gevind dat geneste LTR-retrotransposons die grootste gedeelte van die volgorde uitmaak. Dié saamgroepering van LTR-retrotransposons in die intergeniese areas het geblyk om ook reflekerend van die situasie in die res van die genoom te wees. ’n Daaropvolgende studie deur SanMiguel en Bennetzen (1998) het getoon dat kort ontploffings in LTR-retrotransposon-aktiwiteit die mielie-genoom oor die laaste ses miljoen jaar laat verdubbel het. Die navorsing het vir die eerste keer getoon dat TEE die struktuur van ’n

genoom vinnig kan verander. 'n Tweede studie gedoen deur Kalendar *et al.* (2000) het 'n treffende voorbeeld verskaf van transponeerbare-element-bemiddelde genoom-herstrukturering in wilde gars, *Hordeum spontaneum*, populasies. In dié geval geskied genoom-herstrukturering deur die amplifikasie van die *BARE-1* LTR-retrotransposon en lei dit tot merkbare intraspesifieke genoom-grootte variasie. Wanneer verskillende populasies van wilde gars aan verskillende vlakke van droogte-stremming blootgestel is, het die kopie-getal van die *BARE-1* LTR-retrotransposon merkbaar gewissel tussen 8,300 en 22,100, wat ooreengestem het met 'n variasie van 1.8% tot 4.7% van genomiese DNS (Kalendar *et al.*, 2000). Hierdie navorsing het gedui op 'n wederkerige verwantskap tussen *BARE-1* LTR-retrotransposon kopie-getal, gasheer genoom-grootte en plaaslike omgewingskondisies, en het gesinspeel op 'n moontlike meganistiese verband tussen die amplifikasie van 'n spesifieke transponeerbare-element en die aanpasbare evolusie van die gasheer (Feschotte *et al.*, 2002).

1.10.3. Onderlinge wisselwerking tussen transponeerbare-elemente en die gasheergenoom

1.10.3.1. Belang van chromosoom-herrangskikking in genoom-evolusie

Daar word lank reeds geglo dat chromosoom-herrangskikking een van die hoof meganismes is wat aanleiding gee tot plant-genoom evolusie. Volgens Goldschmidt (soos aangehaal deur Grant, 1981) het elke segmentele rangskikking sy eie 'patroon-effek' tot gevolg en enige chromosomale herrangskikking is 'n bron van nuwe eienskappe. Indien betekenisvolle chromosomale herrangskikking geskied, maar nie van só 'n aard is dat dit steriliteit (Lewis en Raven, 1958) van die organisme veroorsaak nie, kan dit aanleiding gee tot reprodutief-geïsoleerde genomiese vorms wat as basis dien vir voortdurende spesiasie. Die meganismes wat kariotipe herrangskikking bewerkstellig en dan moontlik aanleiding gee tot spesiasie in natuurlike plantpopulasies is nog nie volledig uitgeklaar nie (Raskina *et al.*, 2004a). Dit is egter reeds bekend, na aanleiding van navorsing gedoen op *Drosophila*-genome, dat TEE betekenisvolle genomiese veranderings kan teweegbring deur: die skep van nuwe mutasies; wysiging van geen-uitdrukking; die onderhoud van normale telomere en hul funksies (*Drosophila*); die bevordering van chromosoom-afwykings soos translokasies, inversies, delesies, duplikasies en die vorming van chromosoom-fragmente (Danilevskaya *et al.*, 1994; Gray, 2000; Kidwell en Holyoake, 2001). Daar is verder

ook voorgestel dat die breekpunte van groot chromosomale herrangskikkings soos inversies en translokasies in plante ook met TEE geassosieer is, alhoewel dit nog nie formeel bewys is nie (McClintock, 1946; Kunze *et al.*, 1997; Bennetzen, 2000).

1.10.3.2. Betrokkenheid van transponeerbare-elemente by chromosoom-herrangskikkings

In twee afsonderlike studies (Raskina *et al.*, 2004a; Altinkut *et al.*, 2006) is daar spesifiek gekyk na die algemene effekte van TEE op genoom- samestelling van wilde grasspesies en die moontlike evolusionêre gevolge hiervan.

Die eerste studie het gefokus op die aktiwiteit en die moontlike betrokkenheid van die *En/Spm* (*Enhancer/Suppressor-mutator*)-eenderse-transposons in die herrangskikking/modifikasie van chromosome tydens meiose in 'n klein, geïsoleerde, perifere populasie van *Ae. speltoides* (= *Aegilops speltoides* Tausch) en die tweede studie van Altinkut *et al.* (2006) is die navorsing van Raskina *et al.* (2004a) uitgebrei deur intra- en interspesifieke ooreenkomste en/ of verskille in die chromosomale verspreidings-patrone van die *Ac*-eenderse-transposons (deel van die hAT familie) in uiteenlopende ekologiese nisse van drie Triticeae spesies naamlik: *Ae. speltoides*, *T. urartu*, en *Hordeum spontaneum* (wilde gars), te ondersoek.

Die '*Enhancer/Suppressor-mutator*' (*En/Spm*)-transposons is klas-2 TEE. Dié TEE is bekend daarvoor dat hulle aan gene gekoppel is en dié gene se regulering/uitdrukking mag beïnvloed. Die transponering van die *En/Spm*-transposons word deur wisselwerkende, outoregulatoriese en/of epigenetiese meganismes beheer en funksioneer dus relatief onafhanklik van hul chromosomale beperkinge (Fedoroff, 1999). Al die *En/Spm*-transposons besit 'n geen wat kodeer vir 'n transposase (TPase). Die transposases besit verskeie gekonserveerde domeine wat deur fluoresserende *in situ* hibridisasie (FISH) opgespoor kan word. Dit is dan tegnies moontlik om al die chromosomale posisies van die *En/Spm*-transposons op te spoor deur die hibridisasie van die TPase-fragmente na amplifikasie van die genomiese DNS van 'n spesie (Staginnus *et al.*, 2001). Die navorsers van die eerste studie (Raskina *et al.*, 2004a) het dus die gedrag van die *En/Spm*-transposons tydens mikrosporogeenese in 'n klein *Ae. speltoides* populasie met behulp van FISH nagegaan. Hulle het 'n wye verskeidenheid

van chromosomale afwykings, soos deur Fedoroff (1999) beskryf, gemonitor ten einde aaneenlopende transponeerbare-element-aktiwiteit te kan voorspel. Raskina *et al.*, 2004a het ook rDNS as merkers gebruik vir die bepaling van die ligging van *En/Spm*-transposon-klosse. Normaalweg word daar in *Ae. speltoides* een 5S rDNS lokus op chromosoom 5 en twee 45S rDNS loci op chromosome 1 en 6 aangetref. Hulle het egter tydens die studie waargeneem dat al die plante wat ondersoek is, 'n ekstra 45S rDNS lokus op chromosoom 5 in beide die kiemlyn- en somatiese-selle besit het. Verder het hulle ook waargeneem dat 'n groot gedeelte van een van die "normale" 45S rDNS loci weg was. Hulle het voorgestel dat dit die resultaat van 'n deleisie en/of 'n translokasie na 'n homoloë chromosoom of na chromosoom 5, waar die 45S rDNS nie normaalweg voorkom nie, kon gewees het.

Met gebruik van FISH het hulle bewys dat die *En/Spm*-transposons, hoofsaaklik tydens meiose, komplekse met die 5S rDNS loci vorm. Hulle data het aansluiting gevind by vroeëre veronderstellings dat TEe moontlik werktuie is vir genoom-herrangskikking tydens meiose. Die data sluit ook aan by die voorstel van McClintock (1946) dat TEe chromosome kan breek en die asentriese-fragment van die res van die chromatied kan laat dissosieer. Die klosse wat deur die *En/Spm*-transposons in sogenaamde translokasie 'hotspots' gevorm word, getuig van hul betrokkenheid by die ontstaan van groot chromosomale herrangskikkings.

Raskina *et al.* (2004a) het voorgestel dat hierdie intraspesifieke prosesse 'n bepaalde evolusionêre waarde het, siende dat dit reeds bekend is dat die evolusie van diploïede en poliploïede koring-spesies saamval met merkbare herrangskikking van rDNS-areas (Badaeva *et al.*, 1996, Maestra en Naranjo, 2000).

Raskina *et al.* (2004a) het hul navorsing as volg opgesom: (i) die *En/Spm*-transposons se verskillende, sel-spesifieke chromosomale verspreidings-patrone getuig van hul meiotiese aktiwiteit, (ii) die gedeeltelike voorkoms van mobiele rDNS areas in die genoom van *Ae. speltoides* kan verband hou met die meiotiese aktiwiteit van *En/Spm*-transposons en, (iii) *En/Spm*-transposons kan apart of saam met rDNS, klosse vorm in chromosomale-'hotspots'. Groot chromosomale-herrangskikkings vind in hierdie posisies plaas en dit impliseer hul betrokkenheid in kariotipe hermodelering.

1.10.3.3. Rol van transponeerbare elemente in mikro evolusionêre gebeurtenisse

Volgens Timofeeff-Ressovsky *et al.* (1977) kan enige veranderinge aan die genotipiese-struktuur van 'n populasie as 'n mikro-evolusie-gebeurtenis beskou word. Daar word lank reeds gespekuleer oor die invloed wat TEE op verandering in genotipiese-struktuur van 'n populasie het. Een van die mees effektiewe maniere om die vraag te beantwoord of TEE, en in besonder klas-2 elemente, 'n invloed op mikro-evolusie-gebeurtenisse het, is om vergelykende studies van die chromosomale verspreiding van TEE in natuurlike plant-populasies van naverwante spesies te doen (Altinkut *et al.*, 2006). In die studie van Altinkut *et al.* (2006) is die navorsing van Raskina *et al.* (2004a) uitgebrei deur intra- en interspesifieke ooreenkomste en/ of verskille in die chromosomale verspreidings-patrone van die *Ac*-eenderse-transposons (deel van die hAT familie) in uiteenlopende ekologiese nisse van drie Triticeae spesies naamlik: *Ae. speltoides*, *T. urartu*, en *Hordeum spontaneum* (wilde gars), te ondersoek. Sterk bewyse is gevind dat aaneenlopende intrapopulasie aktiwiteit van beide die hAT- en CACTA-transponeerbare-element families (Wright *et al.*, 2001; Raskina *et al.*, 2004b) mag lei tot die splitsing van genoom-transformasie in populasies in uiteenlopende omgewings.

Volgens Altinkut *et al.* (2006) verskaf die chromosomale verspreidings-patrone van *Ac*-eenderse-transposons in populasies uit ekologies-verskillende omgewings 'n aanduiding van die rol van klimaatsfaktore in die dinamiek van sodanige transposons. Die navorsers het wilde gras populasies van twee verskillende reënvalstreke ondersoek. Die een gebied word gekenmerk deur hoë humiditeit en 'n nat winter-seisoen en die ander deur lae humiditeit en lae reënval. Die navorsers het wel verskille tussen populasies van die twee gebiede gevind. Die fisiese ondersoek van die chromosomale-verspreiding van die *Ac*-eenderse-transposons het getoon dat die struktuur van 'n populasie uit die hoë reënval streek chaoties word in die lae reënval streek. Veranderinge in die chromosomale verspreidings-patrone van die *Ac*-eenderse-transposons dui op hul heraktivering en herrangskikking. Die resultate sluit weereens aan by die bevindinge van Raskina *et al.* (2004a) rakende 'n verneme rol vir transposons in spesiasie-verwante chromosomale-veranderinge. Dié waarnemings bevestig ook die bevindinge van McClintock (1947, 1948, 1951) dat *Ac*-eenderse-transposons dié transposons is wat die breking van chromosome bevorder.

Opsommend, bevestig die data dus dat chromosomale-herrangskikkings die primêre dryfkrag agter spesiasie (White, 1978; King, 1993; Spirito, 2001), en veral spesiasie in plante (Levin, 2002), is. Die ekologie-afhanklike aktivering van *Ac*-eenderse-transposons het moontlik 'n belangrike rol in spesiasie, veral in populasies wat hulle in ekologies-vreemde toestande bevind (Altinkut *et al.*, 2006).

1.10.4. Onderlinge wisselwerking tussen transponeerbare-elemente in die gasheer-genoom

Hierdie afdeling is grotendeels gebaseer op 'n oorsig artikel deur (Leonardo en Nuzhdin, 2002).

Studies van TEE het meesal ten doel om hul invloed op die fiksheid van die gasheer-genoom te verstaan, en tweedens, om die populasie-dinamiek van die verskillende TEE in hul gasheer-genome te verstaan (Leonardo en Nuzhdin, 2002). Elkeen van die klasse van elemente binne die gemeenskap van TEE in die gasheer-genoom, het dieselfde doelwit, naamlik voortplanting. Die maniere hoe hierdie doel bereik word, asook die verskillende invloede wat TEE op die fiksheid van die gasheer-genoom het, verskil egter van mekaar (Eickbush, 1994).

Die voorkoms-frekwensie van TEE in gasheer-populasies hang van twee tipes seleksiedrukke af. Eerstens is daar seleksiedruk van binne die gasheer (soos byvoorbeeld die kompetisie tussen TEE). Die tweede tipe seleksiedruk funksioneer tussen gasheer wat verskillende soorte en kopie-getalle van TEE besit (Leonardo en Nuzhdin, 2002).

Twee verskillende hipoteses, wat nie onderling uitsluitend is nie, is voorgestel om die meganismes van seleksie teen TEE op gasheer-vlak te verduidelik. In die eerste geval is TEE skadelik deurdat hulle binne gene kan invoeg en sodoende die gene ontwig en nie-funksioneel laat (sogenaamde 'geen-ontwrigtings-model') (Finnegan, 1992). Tweedens; die transkripsie van TEE en vertaling van die transponeerbare-element-koderende proteïene kan 'n swaar las op die gasheer plaas deurdat die transkripte en proteïene skadelike effekte soos chromosoom-breking en die ontwrigting van algemene sellulêre prosesse kan veroorsaak (sogenaamde 'transponeerbare-element-produk-uitdrukkings-model') (McDonald *et al.*, 1997).

Reproduksie van TEE (die kopiëring en transponering van TEE) kan positief of negatief

beïnvloed word deur die teenwoordigheid van ander TEE in hul onmiddellike omgewing (Leonardo en Nuzhdin, 2002). Leonardo en Nuzhdin (2002) het van die algemene beginsels van gemeenskaps-ekologie en evolusionêre-ekologie, soos deur Pianka (2000) uiteengesit, gebruik gemaak om die interaksies tussen TEE te verduidelik. Die populasie-groottes sowel as die samestelling van transponeerbare-element-families kan potensieel deur twee tipes interaksies beïnvloed word. Die eerste behels die fisiese interaksies tussen TEE en die tweede interaksie vind plaas wanneer hulle op mekaar inwerk deur middel van die deel van hulpbronne (Leonardo en Nuzhdin, 2002). Die verskillende interaksies tussen TEE kan die vorm neem van parasitisme (prosesse waar een element baat vind ten koste van 'n ander), kompetisie (prosesse waar beide elemente negatief beïnvloed word deur die teenwoordigheid van albei), of samewerking (prosesse waar elemente positief beïnvloed word deur die teenwoordigheid van albei). Al drie die prosesse is vorms van simbiose en word gebruik om die gekompliseerde wisselwerking tussen organismes wat saam 'n omgewing deel, te verduidelik (Leonardo en Nuzhdin, 2002).

Transponeerbare-elemente word in die algemeen gesien as genomiese parasiete, maar parasitisme kan ook onderlangs tussen verskillende soorte TEE plaasvind. In hierdie gevalle hang transponering van die een element heeltemal af van die teenwoordigheid van 'n ander element, en die transponering van die afhanklike element is dan ten koste van die ander. 'n Voorbeeld van só 'n parasitiese verhouding kan gevind word tussen LINEs en SINEs (Malik en Eickbush, 1998). SINEs kan glad nie sonder die teenwoordigheid van LINEs repliseer nie, maar die teenwoordigheid van SINEs veroorsaak 'n drastiese afname in die replikasie van LINEs. Die SINEs besit 'n sterker interne promotor as die van LINEs, sowel as 'n bindingsplek vir die LINE-gekodeerde transposase in hul 3'-kant (lg. is afkomstig van LINE-volgordes). Hierdie eienskappe stel die SINEs in staat om op die LINEs te parasiteer deur van hul transposases gebruik te maak, en in die prosesse hulle uit te kompeteer vir die vorming van nuwe transposisies (Shedlock en Okada, 2000).

Volgens Pianka (2000) kan kompeterende interaksies tussen organismes breedweg in twee kategorieë verdeel word, naamlik (i) kompetisie vir 'n hulpbron (verterend/ontginnend of vooruitlopend wanneer spasie beperkend is en die organisme wat eerste

daar is, voorkeur kry) en (ii) die waar daar addisionele vyandige interaksies tussen die organismes is (inmengende kompetisie).

Die kompetisie vir hulpbronne tussen TEE kan plaasvind wanneer: (i) daar 'n beperking is op die metaboliese komponente wat nodig is vir transponering; (ii) daar 'n beperking van spasie in die genoom is of 'n beperking ten opsigte van beskikbare teiken-volgordes, (iii) daar 'n beperking is ten opsigte van die aantal transponering-geïnduseerde herstel-gebeure wat 'n gasheer in een generasie kan behartig en (iv) die algemene kostes/nadele verbonde aan verlaagde gasheer-fiksheid hoër word. Die algehele fiksheid van die gasheer verlaag namate die totale aantal TEE toeneem (Nuzhdin en Petrov, 2002; Pasyukova *et al.*, 2002).

In sekere gevalle waar TEE kompeteer vir die gebruik van hulpbronne, vind sogenaamde 'sagte seleksie' (proses waar die fiksheid van 'n transponeerbare-element van die eienskappe van sy mededingers afhang) plaas (Leonardo en Nuzhdin, 2002). Leonardo en Nuzhdin (2002) het voorgestel dat vyandige interaksies tussen TEE ("kruis-onderdrukking") 'n belangrike krag is wat inwerk om die onbeheersde toename in transponeerbare-element-getalle te voorkom en sodoende die nadelige effekte wat dit op die gasheer mag hê, te verhoed.

Samewerkende interaksies tussen TEE word gehandhaaf deur bedrieërs (transposons wat probeer voordeel trek uit die samewerking van ander, maar nie self bydra tot die samewerking nie) tot 'n minimum te beperk.

Die transponering van retrovirus-agtige TEE vereis die werking van verskeie proteïene naamlik: gag, terugtranskriptase en RNase H (endoribonuklease wat die fosfodiester bindings van RNS hidroliseer). Dié proteïene word gekodeer deur 2 tot 3 oop-leesrame wat in een transkrip getranskripteer word. Sommige families TEE vorm die verskillende proteïene deur 'n leesraamverskuiwing en/of proteïen kliewing, maar ander TEE vorm die verskillende proteïene deur die splitsing van die transkrip (Arkhipova *et al.*, 1995). Die splitsing-van-die-transkrip-meganisme vereis dat samewerking tussen die verskillende transponeerbare-element-families wat hierdie meganisme toepas, plaasvind, maar dit skep ook 'n situasie waar kondisies gunstig is vir die evolusie van bedrieërs (Leonardo en Nuzhdin, 2002).

Die vorming van virus-agtige-partikels (VLPs) is 'n proses waarin samewerking van *copia*-familie-transponeerbare-elemente vereis word. VLPs word gevorm van twee volle lengte transkripte (plus die proteïene wat vanaf dié en ander transkripte vervaardig word) asook 'n proteïen wat van 'n derde gesplitste transkrip vervaardig word (Yoshioka *et al.*, 1990).

Die beste voorbeeld van samewerking tussen TEE is dié van die *Het-A*-element. Die *Het-A*-element is 'n nie-LTR-retrotransposon wat homself binne telomere invoeg (Leonardo en Nuzhdin, 2002). Die *Het-A*-elemente word een-vir-een by die eindpunte van chromosome gevoeg, met hul 3'-kante wat na die binnekante van die chromosome wys. Die promotors van nie-LTR-retrotransposons is gewoonlik stroomaf van die transponerings-inisiasiepunt geleë, binne die 5'-nie-vertaalde area. Daar is bevind dat die 5'-nie-vertaalde area baie min tot geen promotor-aktiwiteit toon. Die 3'-kant toon egter sterk promotor-aktiwiteit wat verder versterk kan word deur die 5'-nie-vertaalde area (Danilevskaya *et al.*, 1997). Elke *Het-A*-element gebruik dus die promotor van die stroomop-aangrensende element as eksterne promotor, in plaas daarvan dat elke element sy eie promotor het. Elke nuwe element wat by die eindpunt van die chromosoom gevoeg word beheer dus die transponering van die element net na hom, maar word self nie getransponeer totdat daar nog 'n element net voor hom ingevoeg word nie.

1.11. Moontlike bewyse vir gametosied-gene as transponeerbare-elemente

Volgens Nasuda *et al.* (1998) funksioneer *Gc*-gene tydens seldeling in die manlike gametofietselle in koring. In die studies van Raskina *et al.* (2004a) en Altinkut *et al.* (2006) is gevind dat TEE tydens meiose en met die vorming van gamete in die wilde grasspesie *Ae. speltoides*, funksioneer. Die feit dat *Gc*-gene en TEE in dieselfde tyd en ruimte funksioneer mag daarop dui dat *Gc*-gene dalk ook transponeerbare elemente is.

Nasuda *et al.* (1998) en verskeie ander navorsers (Tsujimoto en Tsunewaki, 1985b; Endo, 1987, 1990) het bewys en bevestig dat *Gc*-gene chromosoom-abnormaliteite soos breuke en herrangskikkings tot gevolg het. In studies deur Raskina *et al.* (2004a en b) en Altinkut *et al.* (2006) is bewys dat TEE ook chromosoom-abnormaliteite soos

breuke en herrangskikkings tot gevolg het. Dit kan as verdere aanduiding dien dat *Gc*-gene moontlik TEE is.

Gametosied-gene word nie net tot plante beperk nie, maar is ook in swamme (Tsujimoto en Tsunewaki, 1985b) en die vrugtevlug *Drosophila melanogaster* (Tsujimoto en Tsunewaki, 1985a; 1985b; Crow, 1979) waargeneem. Transponeerbare-elemente is ook reeds in die genome van 'n wye reeks eukariote gevind, naamlik: mielies (McClintock, 1951), sommige grasspesies (SanMiguel *et al.*, 1998; Vicient *et al.*, 1999; Meyers *et al.*, 2001), die mens (Lander *et al.*, 2001), *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* en *Caenorhabditis elegans* (Berg en Howe, 1989).

Volgens Raskina *et al.* (2004a en b) en Altinkut *et al.* (2006) het die chromosoom-herrangskikkings wat deur TEE veroorsaak word, 'n moontlike evolusionêre rol. Omdat *Gc*-gene ook chromosoom-herrangskikkings tot gevolg het, kan dit moontlik ook op 'n evolusionêre rol dui.

1.12. Molekulêre merkersisteme in genoom-analise van plante

Molekulêre merkers word as eenvoudige Mendeliese-eienskappe oorgedra. Weens die feit dat hulle maklik getipeer kan word, word hulle lank reeds gebruik in: die studie van oorerflikheid en veranderlikheid, die konstruksie van koppelings-kaarte, en die diagnose van individue of lyne wat bepaalde gekoppelde gene besit. Merker-tipes is uiteenlopend van aard en omsluit fenotipiese-, biochemiese- (ensiem) asook DNS-gebaseerde merkersisteme. Die benutbaarheid van fenotipiese- en biochemiese-merkers word egter gekortwiek deur: (i) hul lae graad van polimorfisme wat die kans om hul in kruisings na te spoor beperk; (ii) hul lae frekwensie voorkoms (yl-verspreiding deur die genoom) wat die digtheid van die kaarte wat hiermee geskep kan word beperk asook (iii) hul omgewings-veranderlike uitdrukking, wat die karakterisering van genotipes kompliseer. Bogenoemde beperkinge het daartoe gelei dat fenotipiese- en biochemiese-merkers grootliks deur DNS-gebaseerde merkersisteme vervang is. DNS-gebaseerde metodes genereer 'vingerafdrukke' oftewel 'molekulêre merkers', wat eiesoortige DNS-fragment-patrone tot gevolg het. Die fragmente kan dan op agarose of poliakriëlamied jelle geskei word (elektroforese) en met behulp van fluoressensie-merking

waargeneem kan word. 'n Molekulêre merker is dus 'n nukleotiedvolgorde wat ooreenstem met 'n spesifieke ligging in die genoom. Ten einde bruikbaar te wees moet molekulêre merkers polimorfies genoeg wees sodat hul patroon van oorerwing maklik gevolg kan word.

Die volgende afdelings is grotendeels gebaseer op inligting verstrekk deur Reiter (2001), Brown (2002) en Schulman *et al.* (2004)

1.12.1. DNS-gebaseerde merkersisteme

Slegs 'n paar van die talle merkersisteme wat tans gebruik word om plantgenome te karteer sal hier bespreek word.

1.12.1.1. Restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLPs)

Restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLPs) was die eerste DNS merkertipe wat ontwikkel is. Dit het spoedig wye toepassing gevind het en was die grondslag vir die ontwikkeling van die eerste hoë-digtheid genetiese kaarte van koring (Botstein *et al.*, 1980).

DNS molekules word altyd by spesifieke herkenningsetels deur restriksie-ensieme gesny, wat veroorsaak dat snyding van 'n spesifieke DNS monster met dieselfde ensiem altyd dieselfde stel fragmente sal teweegbring (Brown, 2002). In genomiese DNS is restriksie-ensiem snyplekke polimorfies. Elke snyplek manifesteer dus as twee allele; die een alleel verteenwoordig die situasie waar die ensiem wel in staat is om die snyplek te herken en die tweede alleel verteenwoordig die geval waar die herkenningsetel 'n verandering ondergaan het en die ensiem nie meer die setel kan herken en sny nie. Die uiteinde van laasgenoemde is dat die twee naasliggende restriksie-fragmente gekoppel bly, wat tot 'n lengte-polimorfisme lei.

RFLPs kan op een van twee maniere gevisualiseer word. Die een metode behels die gebruik van Southern-klad hibridisasie met 'n gemerkte peiler wat die restriksie-setel oorspan. Die ander, en meer populêre manier, behels die gebruik van PCR-amplifikasie met inleiers wat ontwerp is om aan weerskante van die snyplek te bind. Die

amplifikasie-produk word dan met die restriksie-ensiem gesny en op 'n agarose jel ge-elektroforeer en daarna gevisualiseer (Brown, 2002).

1.12.1.2. Volgorde-onafhanklike PKR-metodes

(a) Lukraak-geamplifiseerde-polimorfiese-DNSe (RAPDs)

Lukraak-geamplifiseerde-polimorfiese-DNSe (RAPDs) (Williams *et al.*, 1990) word geamplifiseer met gebruik van 'n enkele, kort, volgorde-onafhanklik-ontwerpte inleier van ongeveer 10 basispare in lengte. Die 10 basispaar oligonukleotied inleiers is universeel en kan vir enige spesie van belang aangewend word. Die amplifikasie-reaksie vind gewoonlik teen 'n lae bindingstemperatuur (T_m ; in die orde van 35-37°C), plaas. Die amplifikasie-produkte word dan volgens grootte in 'n agarose jel geskei. Indien dieselfde inleiervolgorde vir verskillende spesies gebruik word, word daar 'n unieke bandpatroon vir elkeen waargeneem. Dis ook moontlik om verskille in bandpatrone tussen genotipes van dieselfde spesie waar te neem. Die fragmentpatrone is oorwegend dieselfde buiten dat 'n toevallige fragment in een individu teenwoordig mag wees, maar afwesig in 'n ander. Williams en kollegas (1990) het bevind dat dié fragment-polimorfismes oorerflik is en 'n nuwe genetiese merkerklas vorm. Die frekwensie waarteen polimorfismes waargeneem word, is afhanklik van die spesie wat bestudeer word (Tingey *et al.*, 1992). Volledige genetiese kaarte kan geskep word, deur gebruik te maak van 'n stel arbitrêre inleiervolgordes (Carlson *et al.*, 1991; Reiter *et al.*, 1991).

RAPD-polimorfismes word gewoonlik gevorm deur 'n enkel basis-verandering by een van die inleier bindingsetels of 'n invoeging/delesie gebeurtenis binne die amplifikasie-fragment (Williams *et al.*, 1990; Parks *et al.*, 1991). RAPDs word gewoonlik as dominante merkers beskou alhoewel ko-dominante merkers ook voorkom.

'n Nadeel van RAPD-merkers behels die feit dat dit moeilik is om tussen fragment-allele te onderskei. Wanneer verskillende rasse met dieselfde 10 basispaar inleier geamplifiseer word, word daar verskeie fragmentpatrone met dieselfde profiel waargeneem. Dit is egter moeilik om te bepaal of die fragmente met dieselfde grootte vanaf dieselfde DNS-volgorde geamplifiseer is en sodoende allele van mekaar is. Dié probleem met alleel-identifikasie skep kommer wanneer RAPD-merkers gebruik word

vir populasiegenetika studies of vir sekere tipes merker-bemiddelde seleksie (Reiter, 2001). 'n Verdere probleem is swak herhaalbaarheid van RAPD-profiel. Volgorde- onafhanklike PKR-metodes word oor die algemeen as minder herhaalbaar beskou omdat: (i) daar verskeie fragmente geamplifiseer word wat kompeteer vir dieselfde ensiem en substraat, (ii) die lae bindingstemperatuur waarteen die PKR-reaksies geskied tot nie-spesifieke binding van die inleier en substraat lei. Hierdie probleme kan egter voorkom word deur amplifikasiekondisies en konsentrasies van die reaksiekomponente te optimaliseer (Tingey *et al.*, 1992).

(b) Geamplifiseerde-fragment-lengte-polimorfismes (AFLPs)

Met gebruik van die AFLP-tegniek (Vos *et al.*, 1995) word genomiese-DNS eers met een of meer restriksie-endonukleases verteer waarna passtukke met bekende volgordes aan die verteerde genomiese-DNS geheg word. Na hegting word PKR-amplifikasie met behulp van inleiers wat spesifiek vir die passtukke is, uitgevoer. Die inleier-volgordes besit egter ook een of meer addisionele basisse aan die 3'-kant wat amplifikasie-selektiwiteit verleen deur die aantal passtuk/DNS-template te beperk. Oorspronklik is die amplifikasie-produkte waargeneem deur een van die inleiers met 'n radioaktiewe merker te merk en in 'n poli-akrielamied jel te skei (Vos *et al.*, 1995). Fluoresensie-gebaseerde merkers wat met gebruik van geoutomatiseerde volgordebepalingstoerusting (*Applied Biosystems*) waargeneem kan word, word nou meer algemeen gebruik. In organismes met komplekse genome (soos plante) word twee amplifikasie-reaksies uitgevoer. Die eerste (pre-amplifikasie) reaksie behels die gebruik van inleiers wat selektiewe of nie-selektiewe volgordes mag besit. Die tweede (selektiewe) reaksie word uitgevoer deur die verdunde produk van die eerste reaksie as templaar te gebruik vir amplifikasie met inleiers wat selektiewe volgordes besit. Deur gebruik te maak van sagteware wat die sein-intensiteit van fragmente lees, kan kof-dominante AFLP-polimorfismes geïdentifiseer word (*KeyGene*). Vir die doel word positiewe seine van homosigotiese en heterosigotiese individue kwantitatief gedifferensieer.

Die AFLP-tegniek is reeds vir 'n wye verskeidenheid toepassings aangewend. Hoë digtheid genetiese-kaarte is vir talle plantspesies, byvoorbeeld swartbekboontjies (*Vigna unguiculata*), mielies (*Zea mays*) en rog geskep (Mendendez *et al.*, 1997; Vuylsteke *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1998) terwyl AFLPs ook gereeld vir kwantitatiewe-

kenmerk-lokus (QTL-) kartering (Nandi *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1997) en vingerafdruk-studies (Hill *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996) aangewend word.

Net soos met RAPDs, is alleel-identifikasie ook in die geval van die AFLP-tegniek problematies. Waargenome fragmente kan as allele beskou word wanneer die nageslag van eksperimentele populasies slegs een voorouerlike oorsprong vir 'n waargenome alleel het. Fragmente van dieselfde grootte kan nie noodwendig as allele beskou word indien die oorsprong van die allele onbekend is nie.

Die herhaalbaarheid van AFLPs is beter as die van RAPDs. Dit is waarskynlik vanweë die gebruik van inleiers wat presies komplementêr is met die passtuk/DNS template asook die gebruik van amplifikasie-kondisies wat spesifieke paring van die inleiers en templaats tot gevolg het. Akkurate reagenskonsentrasies in die PCR-reaksie, gepaard met noukeurige toepassing van die metodiek kan dus tot konsekwente resultate lei.

1.12.1.3. Volgorde-afhanklike PCR-metodes

Volgorde-afhanklike PCR-metodes is meer herhaalbaar as volgorde-onafhanklike PCR-metodes. Hulle verskaf dikwels ko-dominante merkers waarvan die allele maklik onderskeibaar is. Al dié eienskappe maak volgorde-afhanklike merkers veral geskik vir merker-bemiddelde seleksie in planteteelprogramme (Reiter, 2001).

(a) Eenvoudige-volgorde-herhalings (SSRs) (Mikrosatelliete)

Hierdie tipe merkers staan onder verskeie benamings bekend, insluitend: eenvoudige tandem herhalende volgordes (STRs), mikrosatelliete en eenvoudige volgorde herhalings (SSRs).

Mikrosatelliete is tandem herhalende DNS-motiewe wat alomteenwoordig voorkom. Die herhalende motiewe bestaan uit di-, tri-, tetra- of meer foutlose, herhalende nukleotiedvolgordes (Tautz en Renz, 1984). 'n Gegewe herhalende volgorde kan aansienlik in lengte varieer. Die lengte-variasie manifesteer dan as verskillende allele, met ander woorde allele verskil ten opsigte van die aantal eenhede van die herhalende motief. Variasie in die aantal herhalende motiewe vorm die basis van die hoë graad van polimorfisme wat met hierdie tipe merkers waargeneem word. Lengtevariasies ontstaan

vanweë replikasieglyding waartydens kopieë van die herhalende motief weggelaat word of addisionele kopieë ingevoeg word (Edwards *et al.*, 1992). Die lengtevariasies mag egter ook uit ongelyke oorkruising voortspruit. Edwards en kollegas (1992) het verder bevind dat verskillende SSR-loci verskillende mutasie-tempos het.

SSR-merker metodieke word ontwerp deur eers 'n SSR-lokus te kloner en die volgorde daarvan te bepaal waarna daar dan geskikte inleiers afgelei word. Genomiese biblioteke word gesif vir klone wat SSR-volgordes besit deur gebruik te maak van oligonukleotied peilers wat komplementêr aan die herhalende motief is. Daarna word die positiewe klone se volgordes bepaal en inleiers wat komplementêr is aan die unieke volgordes wat die SSR-volgordes begrens, word gesintetiseer. Hierdie inleiers kan nou vir amplifikasie van die SSR-merker gebruik word. Die amplifikasie-produkte kan volgens grootte in agarose of poli-akriëlamied jelle geskei word. Die amplifikasie-produkte kan ook met fluoresserende merkers gemerk word en dan met fluoressensie opsporings-sisteme waargeneem word (*Applied Biosystems, LiCor*).

In vergelyking met volgorde-onafhanklike merkersisteme is die SSR-merkersisteme baie herhaalbaar en met sorgvuldige inleier-ontwerp kan konsekwente resultate behaal word.

(b) Enkelnukleotied-polimorfismes (SNPs)

Enkelnukleotied veranderings verteenwoordig verreweg die meeste polimorfismes wat in genome voorkom. Baie aandag is in die afgelope jare geskenk aan die ontginning van enkelnukleotied-polimorfismes (Nikiforov *et al.*, 1994; Marshall, 1997) en die ontwikkeling van volgorde-afhanklike-opsporing-sisteme vir SNPs. SNPs is nuttig as merkersisteme weens hul oorfloedigheid, asook die feit dat hulle in areas wat uitgedruk sowel as areas wat nie uitgedruk word nie, voorkom. Wang *et al.*, (1996) het gevind dat SNPs teen 'n frekwensie van 1 per kilobasis-area in mense voorkom.

Verskeie metodes is ontwikkel om SNPs te benut, insluitend: alleel-spesifieke amplifikasie, enkel-string konformasie polimorfisme (SSCP), denatureringsgradiënt-jel-elektroforese en oligonukleotied skyfie-gebaseerde hibridisasie.

(c) *Volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde-areas (SCARs)*

Hierdie tipe merkers vorm deel van die volgorde-afhanklike merker-klas wat ontwikkel is uit volgorde-onafhanklike merkerloci (Paran en Michelmore, 1993). SCARs kan ontwikkel word deur bv. RAPD amplifikasie-produkte te kloner, die volgorde te bepaal en dan volgorde-afhanklike inleiers te ontwerp wat PCR-produkte uniek aan elke merkerlokus, amplifiseer. Die vlak van polimorfisme wat waargeneem word hang van die SCAR-lokus wat bestudeer word, af. SCAR-merkers kan as dominante of ko-dominante merkers geklassifiseer word. Die klassifikasie hang weereens van die lokus wat bestudeer word, af (Paran en Michelmore, 1993).

1.12.2. LTR-retrotransposons as molekulêre merkers

Retrotransposons kom wydverspreid in die meeste eukariotiese genome voor en versprei by 'n wyse van 'n proses van transkripsie, terug-transkripsie, en die invoeging van nuwe kopieë sonder die uitsny van vorige kopieë. Indien die nuut-geïntegreerde retrotransposon-kopieë in daardie selle voorkom wat oorsprong aan gamete gee, kan dit na die nageslag oorgedra word. Die groot aantal somatiese delings wat die differensiasie van kiemselle voorafgaan het daartoe gelei dat retrotransposons een van die hoof genoomkomponente in plante geword het (Schulman, *et al.*, 2004). Retrotransposons vorm die hoof-klas van herhalende DNS-volgordes in plante met groot genome en kan 40-60% van die totale genoom uitmaak (Pearce *et al.*, 1996; SanMiguel *et al.*, 1996; Shirasu *et al.*, 2000). Die hoof retrotransposon-families word verspreid oor die chromosome van plantspesies aangetref. In sommige gevalle is gevind dat die verhoging in kopie-getal grootliks bygedra het tot die uitbreiding van plant-genome (Suoniemi, *et al.*, 1996; Kumar, *et al.*, 1997; Heslop-Harrison, *et al.*, 1997; SanMiguel en Bennetzen, 1998; Vicient, *et al.*, 1999). Omdat retrotransposons wydverspreid voorkom; maklik waarneembare genoom-veranderings tot gevolg het; bekende voorvaderlike volgordes het; en ook gekonserveerde streke besit waarvoor PCR-inleiers ontwerp kan word, kan hulle potensieel kragtige merkersisteme daarstel. Direkte vergelykings tussen retrotransposon-gebaseerde merkermetodes en AFLP-merkermetodes het getoon dat die retrotransposon merkers tot 25% meer polimorfies kan wees (Waugh *et al.*, 1997; Yu en Wise, 2000).

Tans is daar vier hoof retrotransposon-gebaseerde-merkermetodes wat gebruik word, naamlik: Volgorde-spesifieke-geamplifiseerde-polimorfisme (SSAP), Inter-Retrotransposon-geamplifiseerde-polimorfisme (IRAP), Retrotransposon-Mikrosatelliet-geamplifiseerde-polimorfisme (REMAP) en Retrotransposon-gebaseerde-invoeging(“insertion”)-polimorfisme (RBIP). SSAP, IRAP en REMAP is multipleks-metodes wat onbekende-volgorde-fragmente genereer, maar RBIP amplifiseer enkel-loci soos in die geval van mikrosatelliet-gebaseerde merkersisteme (Schulman, *et al.*, 2004).

1.12.2.1. Volgorde-spesifieke-geamplifiseerde-polimorfisme (SSAP)

Volgorde-spesifieke-geamplifiseerde-polimorfisme (SSAP) (Figuur 2A) is vir die eerste keer formeel deur Waugh *et al.* (1997) beskryf, hoewel daar verskeie variasies van die tegniek bestaan wat van verskillende oorsprong is (Vogel en Morgante, 1992; Korswagen, *et al.*, 1996; Van den Broeck, *et al.*, 1998; Ellis, *et al.*, 1998). Die beginsel waarop SSAP berus, kan beskryf word as ’n aanpassing van die AFLP-merkermetode (Vos *et al.*, 1995) en/of ’n variant van die geankerde PCR-metode (Korswagen, *et al.*, 1996). Die SSAP-metode, soos beskryf deur Waugh en medewerkers (1997), stem in twee opsigte ooreen met die AFLP-metode, naamlik: twee verskillende restriksie-ensieme word gebruik vir die daarstelling van die templaet vir die spesifieke-inleier PCR asook die gebruik van selektiewe basisvolgordes tydens die skep van die passtuk-inleiers.

1.12.2.2. Inter-Retrotransposon-geamplifiseerde-polimorfisme (IRAP)

Die beginsel waarop Inter-Retrotransposon-geamplifiseerde-polimorfisme (IRAP) (Figuur 2B) funksioneer berus op die opsporing van twee retrotransposons (oftewel hul LTRs) wat naby genoeg aan mekaar geleë is dat die area tussenin geamplifiseer kan word. Slegs intakte genomiese-DNS en ’n PCR-termo-sirkuleerder plus reagentiese word benodig vir amplifikasie. Geen restriksie-ensiem vertering of passtuk-ligasie reaksies word benodig soos in die geval van die AFLP- en SSAP-metodes nie. Die amplifikasie-produkte word geëlektroforeer in ’n lae konsentrasie agarose jel aangesien die produkgroottes kan wissel van minder as 100 basispare tot ’n paar kilobasispare in grootte (Schulman, *et al.*, 2004). Die IRAP-metode, soos beskryf deur Kalendar *et al.*

(1999), is reeds aangewend vir die daarstelling van genetiese kaarte vir koring (Boyko, *et al.*, 2002) en gars (Manninen, *et al.*, 2000) asook die bestudering van genom-evolusie in verskillende grasspesies (Vicent *et al.*, 2001). Die metode is effektief vanweë die feit dat die garsgenoom (Panstruga, *et al.*, 1998; Shirasu, *et al.*, 2000) nes ander grasgenome in geen-ryke eilande georganiseer is wat deur areas van herhalende-DNS omring word. Dié herhalende-DNS word deur groot areas van retrotransposons beslaan. Hierdie retrotransposons kom gewoonlik in 'n geneste vorm in gars, mielies en ander grasspesies (SanMiguel, *et al.*, 1996; Shirasu, *et al.*, 2000; Vicent *et al.*, 2001) voor. Dus, die een retrotransposon mag binne-in 'n ander ingevoeg wees. IRAP-amplifikasie-produkte kan dus afkomstig wees van enkel naby geleë LTRs en vollengte elemente wat onderbreek word deur nie-retrotransposon DNS, sowel as geneste retrotransposons. Die IRAP-metode word reeds aangewend om die genome van grasse (Vicent, *et al.*, 2001) en ander eensaadlobbige plante (Price, *et al.*, 2003) te bestudeer en kan volgens Schulman *et al.* (2004) ewe nuttig gebruik word vir studie van ander genome wat soortgelyke strukture het.

1.12.2.3. Retrotransposon-Mikrosatelliet-geamplifiseerde-polimorfisme (REMAP)

Retrotransposon-Mikrosatelliet-geamplifiseerde-polimorfisme (REMAP) (Figuur 2C) funksioneer op dieselfde basis as IRAP, buiten dat REMAP polimorfismes opspoor in die teenwoordigheid van retrotransposons (LTRs) wat naby genoeg aan mikrosatelliete geleë is vir PCR-amplifikasie om plaas te vind. Omdat mikrosatelliete alomteenwoordig is in eukariotiese genome en reeds as molekulêre merkers gebruik word, het Kalendar *et al.* (1999) ondersoek ingestel of daar 'n assosiasie tussen mikrosatelliete en retrotransposons is, en of hiérdie assosiasie gebruik kan word om nuwe molekulêre merkers te skep. Hulle het gevind dat talle polimorfiese fragmente gegenereer kan word met gebruik van inleiers gebaseer op, onderskeidelik, die *BARE-1* retrotransposons en mikrosatelliete in die garsgenoom. Hierdie bevinding is met 'n onafhanklike studie bevestig (Ramsay *et al.*, 1999). Die REMAP-metode amplifiseer die area tussen LTR-inleiers wat na buite wys en mikrosatelliet-loci met 'n paar herhalende volgordes sowel as een of twee nie-herhalende nukleotiede aan die 3' kant wat as anker vir die inleier kan dien. Die anker verleen spesifisiteit aan die PCR-amplifikasie. Indien dit weggelaat sou word, sou die herhalende volgordes van die mikrosatelliet-inleier veroorsaak dat dit aan verskeie loci in enige mikrosatelliet bind.

Die REMAP-metode word soos die IRAP-metode op onverteerde genomiese-DNS uitgevoer, wat dit vinnig en koste-effektief maak. REMAP is reeds aangewend vir die studie van genoom-evolusie in wilde gars (Kalendar *et al.*, 2000) asook vir die kartering van 'n hoof-weerstandsgene in gars (Manninen *et al.*, 2000).

1.12.2.4. Retrotransposon-gebaseerde-invoeging-polimorfisme (RBIP)

Retrotransposon-gebaseerde-invoeging-polimorfisme (RBIP) (Figuur 2D) is 'n eenvoudige metode om vir die aanwesigheid van retrotransposons te toets. Die PCR maak gebruik van inleiers aan weerskante van die retrotransposon invoeging-setel sowel as inleiers gebaseer op die retrotransposon se volgorde (Schulman, *et al.*, 2004). Wanneer daar slegs van die inleiers aan weerskante van die invoeging-setel gebruik gemaak word, sal die sogenaamde “leë” setel waargeneem word. Dit is omdat retrotransposon-invoegings duisende basispare in grootte is en daar dus geen produk met die inleiers aan weerskante van die invoeging-setel gevorm word wanneer die invoeging-setel wel beset is nie. Daar sal slegs produk met die transposon inleier gevorm word. Die hoof-eienskap wat die RBIP-metode van die res van die retrotransposon-gebaseerde merkermetodes onderskei is dat dié metode 'n enkel lokus, ko-dominante merkertegniek is. Wanneer slegs 'n paar monsters geamplifiseer word, kan die produkte met gewone agarose jel-elektroforese waargeneem word. Beide die retrotransposon-aanwesige en -afwesige reaksies word in dieselfde reaksie-buis uitgevoer. Die grootte van die PCR-produk dui die tipe alleel (“beset” of “leeg”) aan. Die enigste nadeel verbonde aan die RBIP-metode is dat vooraf-kennis van die basisvolgordes aan weerskante van die retrotransposons nodig is vir die ontwerp van die aangrensende inleiers.

Dis moontlik om die RBIP-metode te outomatiseer. Indien groot hoeveelhede monsters ontleed moet word, kan daar van 'n druppel-klad (“dot blot”)-gebaseerde analiese-sisteem gebruik gemaak word i.p.v. gewone agarose jel-elektroforese wat veel langer neem (Flavell *et al.*, 1998). Amplifikasie van die twee allele vind in aparte buise plaas. Die amplifikasie-produkte word dan saam op 'n nylon-membraan geklad en met 'n lokus-spesifieke peiler gepeil. Deur gebruik te maak van 'n robot kan duisende plantmonsters gelyktydig geklad en ontleed word. Die data wat dan gegenereer word, word met tegnologie wat vir die tipering van mikroreekse ('microarrays') (DeRisi, *et*

al., 1997) ontwikkel is, geanaliseer (Flavell *et al.*, 2003). Sodoende word die proses ten volle geoutomatiseer.

1.13.Diversiteits-reekse-tegnologie (DArT)

Die volgende afdeling is gebaseer op 'n oorsig artikel deur (Kilian *et al.*, 2005) sowel as inligting bekom op die DArT webtuiste(<http://www.diversityarrays.com/>).

Die volledige nukleotied-volgorde van die genoom is reeds bepaal vir elkeen van verskeie spesies, byvoorbeeld die vrugtevlug (*Drosophila melanogaster*), die mens asook die bruin Noorweegse rot (Adams *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2001; Gibbs *et al.*, 2004). Die waarde van volgorde-bepaling word egter beperk indien daar nie ook uitgebreide kennis aangaande die diversiteit van die betrokke genoom is nie (Kilian *et al.*, 2005). Verskeie merkersisteme vir die tipering van DNS, insluitend: SSRs, AFLPs en RFLPs word tans hiervoor gebruik. Hierdie tiperingsmetodes het egter 'n lae verwerkingskapasiteit en die gebruik daarvan is nie koste-effektief nie. Die identifikasie van SNP-merkers bied 'n oplossing omdat dit 'n feitlik onuitputbare bron van merker-loci daarstel. Die ontwikkeling van die DNS-skyfie ("DNA Chip") het daartoe gelei dat die verwerkingskapasiteit vir diversiteitsbepaling verhoog word, deurdat duisende SNP-merkers nou gelyktydig op een skyfie ontleed kan word.

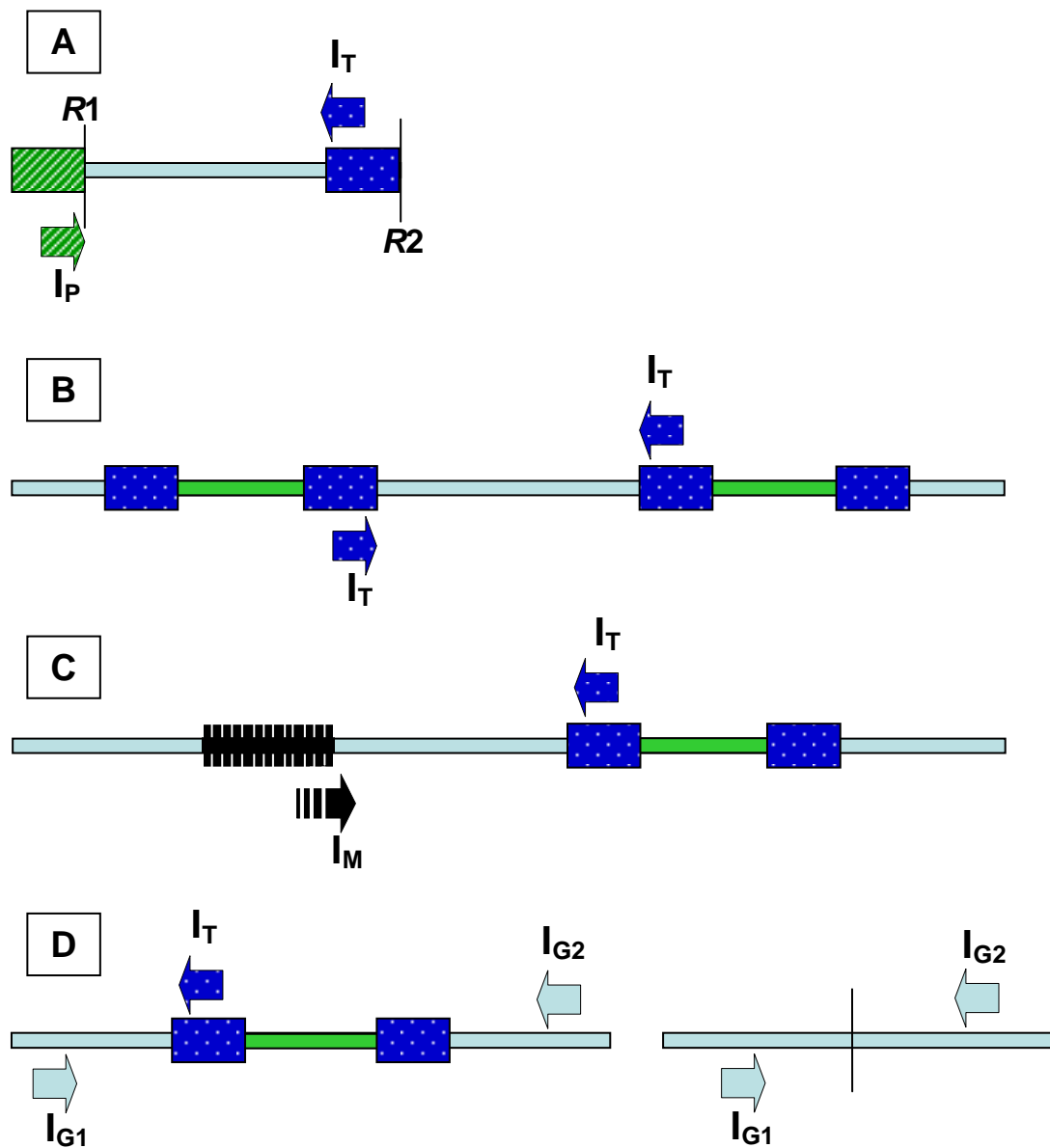
Die gebruik van SNP-merkers vir diversiteitsbepaling het nog min aftrek gekry in die geval van plante, veral daardie plante wat nie van groot ekonomiese belang is nie. Dit is moontlik te wyte aan koste-oorewegings en 'n tekort aan volgorde-inligting (Kilian *et al.*, 2005). Nuut-ontwikkelde tegnologie soos Diversiteits-reekse-tegnologie (DArT) bied 'n alternatief vir SNP-merker-tegnologie deurdat dit ook 'n hoë verwerkingskapasiteit daarstel, maar geen vooraf-kennis van genoomvolgorde benodig nie.

DArT is ontwikkel as 'n praktiese en koste-effektiewe manier om heel-genoom vingerafdruk-bepaling te doen (Jaccoud *et al.*, 2001). Dit is gebaseer op die parallelle ontwikkeling en benutting van honderde merkers wat verspreid deur die genoom voorkom. Daar word nie gepoog om die merkers verder te karakteriseer nadat hulle geïdentifiseer is nie.

Die eerste stap in die ontwikkeling van 'n DArT ontleding is die identifikasie van geskikte, genoomwye merkers wat geskik sal wees vir die gewas/populasie wat ontleed gaan word. Hiervoor word 'n versameling gemaak van DNS-monsters wat verteenwoordigend is van die kiemplasma wat ondersoek gaan word, byvoorbeeld die ouers van 'n kruising (of genotipes verteenwoordigend van die broodkoring genepoel, ens.). Die kompleksiteit van die DNS poel moet nou volgens gedefinieerde (herhaalbare) kriteria verminder word. Vir die doel word die verteenwoordigende DNS met restriksie-ensieme gesny en passtukke vir selektiewe amplifikasie word deur ligasie aan die fragmente geheg. 'n Fraksie (0.1-10%) van die genoom (sg. genomiese verteenwoordiging) word na selektiewe amplifikasie in vektore gekloneer en in *E. coli* selle ingesluit om 'n fragment-biblioteek te maak. Fragmentklone word vervolgens gebruik vir die opstel van mikroreekse (ontdekkingsreekse = 'discovery arrays') deur dit op glasskyfies te orden. Die ontdekkings-mikroreekse word nou gebruik om vas te stel watter klone polimorfies is in die teikenpopulasie. Genomiese verteenwoordiging van 'n uiteenlopende reeks genotipes uit die teikenpopulasie word getoets deur dit te hibridiseer op die mikroreekse. Na ontleding van die hibridisasiepatrone word 'n paneel van merkerfragmente gekies wat wel polimorfisme tussen genotipes opspoor.

Die geïdentifiseerde, polimorfiese klone word nou gebruik vir die konstruksie van nuwe mikroreekse (tiperingsreekse = "typing arrays") wat geskik sal wees vir diversiteitsbepaling in die teikenorganisme. Monsters wat ontleed moet word, word onderwerp aan dieselfde kompleksiteits-vermindering prosedure en 'n genomiese verteenwoordiging word vir elke monster bekom. Hierdie genomiese verteenwoordigings, wat met fluoresserende merkers gemerk is, word getoets teen die tiperingsreeks en die aan-/afwesigheid van polimorfiese fragmente word geregistreer. Die individuele monsters sal slegs hibridiseer met ooreenstemmende fragmente op die genotiperingsreeks en unieke hibridisasie patrone toon.

DArT is reeds suksesvol aangewend vir 16 verskillende plantspesies waaronder koring (*T. aestivum*). 'n DArT-reeks vir *T. aestivum* is deur die ontwikkelaars daargestel en is beskikbaar by die *Triticarte* genotiperingsdiens (<http://www.triticarte.com.au/>).



Figuur 2: Retrotransposon-gebaseerde merkermetodes. (A) SSAP: R1, R2 – restriksie-ensiem snyplekke; groen blokkie en pyl = genomiese DNS passtuk en passtukinleier (I_P); blou blokkie en pyl = transposon DNS en inleier (I_T). (B) IRAP: amplifiseer inter-transposon areas; I_T = transposoninleier. (C) REMAP: amplifiseer area tussen ’n mikrosatellietdomein (swart) en ’n transposon; I_M = mikrosatelliet-inleier; I_T = transposoninleier. (D) RBIP: Individuele, invoegings-areas polimorfies vir retrotransposon invoegings kan allelies onderskei word. Links – transposon ingesluit; regs – transposon uitgesluit; I_T = transposoninleier; I_{G1} = gasheerinleier 1; I_{G2} = gasheerinleier 2 (Gebaseer op ’n figuur van Schulman *et al.*, 2004).

1.14. Agtergrond en oogmerke van hierdie studie

1.14.1. Agtergrond en uiteensetting

Antonov en Marais (1996) het 'n aantal wilde spesies met gewone koring gekruis om sodoende roes-weerstandsgene na gewone koring oor te dra. Een van die wilde spesies was 'n *Ae. speltoides* (var. *ligustica*, aanwins-691) lyn wat van Israel ingevoer is. *Ae. speltoides* is as die manlike ouer met koringkultivar 'Chinese Spring' (CS) gekruis.

F₁-plante is herhaaldelik na koring teruggekruis met gelyktydige seleksie vir blaarroes weerstand. Na die 4^e terugkruising is 'n translokasie na die kort arm van chromosoom 3A verhaal, wat drie gene vir onderskeidelik blaar-, stam- en streeproesweerstand dra (Figuur 3). Die translokasielyn is S13 genoem en die tydelike simbole *LrS13* (blaarroes), *SrS13* (stamroes) en *YrS13* (streeproes) is aan die drie weerstandsgene toegeken (Marais 2007, persoonlike mededeling). Dié weerstandsgene is egter gevind om geassosieerd te wees met gametosied-(*Gc*-) gene wat ook op die translokasie voorkom. Die *Gc*-gene veroorsaak baie hoë vlakke van hibriednekrose, steriliteit, saadverrimpeling, swak planttipe en 'n hoë mutasietempo. Weens die feit dat die *Gc*-gene onlosmaaklik van die weerstand segregeer, kon die weerstand nie kommersieel gebruik word nie. Marais (2007; ongepubliseerde data) het na meiotiese paringsverstoring vier, vermoedelik verkorte vorms van die translokasie herwin wat skynbaar verminderde *Gc*-uitdrukking toon (Figuur 3). Die plante is geselekteer op grond van laer vlakke van hibriednekrose, verbeterde vrugbaarheid en saadkwaliteit. Drie van die vier, vermoedelik verkorte vorms het bykomende nadelige effekte soos die broos-aar (beskry deur Nalam *et al.*, 2006) fenotipe getoon. Hierdie vier lyne (onderskeidelik: 04M127-1 tot -4) vorm deel van 'n totaal van 131 families wat uit bestande F₁-plante verhaal is.

1.14.2. Oogmerke van studie

Die doelwitte van die huidige studie was as volg:

- (i) Om die oorspronklike S13 translokasie en die vier vermoedelik gerekombineerde (verkorte) S13-translokasies met molekule merkers te bevestig, te karakteriseer en terselfdertyd te bepaal watter hiervan die kleinste

hoeveelheid *Ae. speltoides* chromatiën oorgehou het. Vir die doel sou dit nodig wees om gepaste molekulêre merkers (bestaande, gekarteerde merkers sowel as nuwe merkers) op chromosoomarm 3AS te identifiseer en die potensiële rekombinante hiermee te tipeer.

- (ii) Om gepaste merkers te identifiseer ten einde die toetskruispopulasie (waaruit die vier potensiële rekombinante geselekteer is) vir verdere rekombinante te sif.
- (iii) Vir elk van die gerekombineerde translokasies moes 'n fisies-genetiese kaart opgestel word wat die posisies van die drie weerstandsgene en 'n *Ae. speltoides* geen wat broos are veroorsaak, verhoudelik tot die molekulêre merkers aandui. Die kaart moes dien om die nuttigste rekombinant(e) te vind en 'n strategie te implementeer waarmee dit selfs verder verkort kon word.
- (iv) Al die gerekombineerde translokasies het steeds *LrS13* besit. Dit was egter nodig om te bepaal of hulle na rekombinasie nog steeds die gene *SrS13* en *YrS13* besit het.

2. MATERIAAL EN METODEDES

2.1. Verloop van studie

Die raamwerk waarvolgens hierdie studie uitgevoer is word in Figuur 3 uiteengesit.

Die eerste faset (a) daarvan was die identifikasie van geskikte mikrosatelliet-merkers spesifiek vir die kort- en lang-arm (proksimale gedeelte) van chromosoom 3A van *T. aestivum*. Omdat mikrosatellietmerkers grotendeels genoomspesifiek is, word daar normaalweg nie homoeoallele in *Ae. speltoides* geamplifiseer nie, sodat die koring mikrosatelliete dus as negatiewe merkers vir die S13 translokasie aangewend moet word. Die resessiewe nul-allele wat met die translokasie geassosieer is, is slegs sigbaar in hemi- of homosigote vir die translokasie. Al die lyne wat met mikrosatellietloci getipeer is, was dus monosomies 3A of monotelo 3AL disomies of hulle was translokasiehomosigote. Die mikrosatelliet-merkers is egter by uitstek geskik om die grootte en ligging van die translokasie op chromosoom 3A te bepaal aangesien die gepubliseerde mikrosatellietkaarte betreklik goed ontwikkel is; die inleierinligting geredelik bekombaar is en die mikrosatelliet ontledingsmetodiek relatief eenvoudig en goedkoop is.

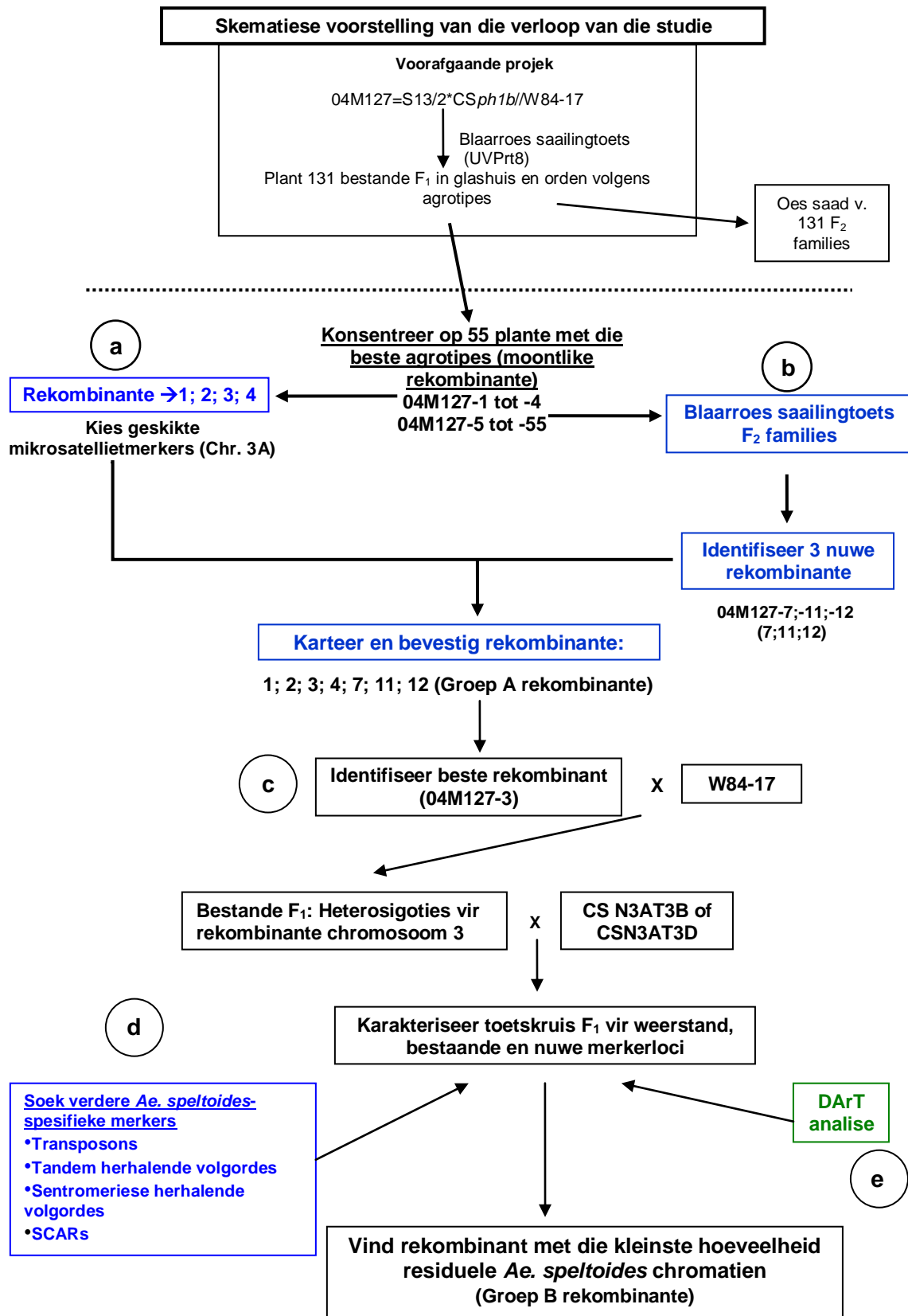
Die tweede fase van dié studie was 'n soektog na verdere gerekombineerde vorms tussen die 131 toetskruis F_1 -verhaalde F_2 -families wat in die homoeoloë paringsinduksie-eksperiment gegenerer is (Marais, 2007 persoonlike mededeling). 'n Verdere stel van vyftig families (04M127-5 tot -55 wat tekens van moontlike verlaagde *Gc*-aktiwiteit getoon het) is gekarakteriseer in terme van weerstand en mikrosatellietloci (Figuur 3b). Nog drie rekombinante is gevind en is ook volledig gekarakteriseer vir al die mikrosatellietloci. Die data van al sewe rekombinante is daarna gebruik om die kortste een te identifiseer.

In die derde fase (Figuur 3c) is die kortste rekombinant met die blaarroesvatbare teellyn, W84-17, gekruis ten einde vas te stel of verdere verkorting deur middel van normale meiotiese rekombinasie bewerkstellig kon word. Die bestande F_1 -plante is getoetskruis met CS nullisomies 3A tetrasomies 3B/D plante. Ongeveer 100 toetskruis

F₁ hemisigote is verkry en is gekarakteriseer in terme van weerstand. Al die bestande plante asook 'n proporsie van die vatbare plante is gekarakteriseer vir teenwoordigheid van al die mikrosatellietloci. Omdat die mikrosatelliet-loci slegs beperkte inligting kon gee rakende die kortste translokasies, was dit nodig om verdere merkers te probeer vind waarmee die rekombinasiebreekpunte gekarteer kon word.

In 'n poging om addisionele merkers in die translokasiegebied op te spoor (Figuur 3d) is inligting rakende *Ae. speltoides* spesifieke transponeerbare elemente, *Ae. speltoides* spesifieke tandem en sentromeriese herhalende volgordes en amplifikasie-metodes ingesamel. Benewens die moontlikheid dat hierdie volgordes/merkers nuttig gebruik sou kon word vir die opstel van 'n fisiese kaart, is daar gehoop dat die transposon-gerigte volgordes lig sou werp op die aard/licging van die *Gc*-faktor(e) aangesien *Gc*-gene waarskynlik transponeerbare element setels verteenwoordig. Verskeie SCAR-merkers (Eksteen, 2008) wat spesifiek is vir die S13-translokasie is kon ook bekom word.

DArT was die laaste merkertipe wat benut is vir die karakterisering van rekombinante (Figuur 3e). Hierna is al die merkerdata geïntegreer in 'n fisies-genetiese kaart in 'n poging om die kortste rekombinant te identifiseer.



Figuur 3: Hierdie skematiese voorstelling gee 'n uitleg van die verloop van die studie. Die dele wat bokant die stippellyn voorgestel word, het hierdie studie voorafgegaan. Die dele wat met letters aangedui word, verwys na die fases waarin die studie afgehandel is.

2.2. Plantmateriaal

Die plantmateriaal wat in die studie gebruik is (Tabel 1), het die volgende ingesluit: (a) Die wilde spesie-bron en die koringouers Chinese Spring en W84-17 wat in al die kruisings gebruik is. Die koringouers is beide vatbaar vir die blaarroespatotipe UVPrt8 wat deurgaans in die studie gebruik is om te toets vir die teenwoordigheid van die translokasie. (b) Die oorspronklike S13 translokasie wat die drie weerstandsgene met tydelike simbole, *LrS13*, *YrS13* en *SrS13*, besit. (c) Vier vermoedelik verkorte S13-translokasies (04M127-1 tot -4) wat deur Marais (2007; persoonlike mededeling) uit 'n allosindetiese rekombinasie-eksperiment geselekteer is op grond van hul agronomiese voorkoms en vrugbaarheid. Die twee variante van 04M127-3 (Tabel 1) verskil ten opsigte van hul blaarroesweerstand. Translokasie 04M127-3a produseer 'n ; tot ;1⁻ infeksietipe (IT) na saailingbesmetting met die blaarroespatotipe UVPrt8. Die ; tot ;1⁻ infeksietipe is die tipiese weerstandsreaksie van *LrS13*. Lyn 04M127-3f daarenteen produseer 'n 2 tot 2⁺ infeksietipe onder dieselfde omstandighede. Daar is vermoed dat lyn 04M127-3f nie *LrS13* dra nie maar eerder die twee komplementêre weerstandsgene *Lr27* (ex 3BS, Inia 66) en *Lr31* (ex 4BS, CS) wat in die agtergrond van die kruising segregeer. Elk van *Lr27* en *Lr31* is oneffektief op sy eie, maar wanneer hulle saam voorkom komplementeer hulle om weerstand daar te stel. Lyn 04M127-3f is by die paneel ingesluit om te bevestig dat daar wel geen *Ae. speltoides*-verhaalde chromatien in die lyn voorkom nie. (d) Benewens die vier rekombinante is nog 51 F₂ families uit kruising 04M127 beskikbaar gestel. Hierdie families verteenwoordig daardie plante met die naas-beste agrotipes waartussen daar moontlik nog verdere rekombinante kon wees. Uit hierdie groep is daar uiteindelik met die gebruik van molekulêre merkers nog drie verkorte vorms (hierdie studie) verhaal. Die nommers van hierdie rekombinante is onderskeidelik 04M127-7, 04M127-11 en 04M127-12. (e) Vyf-en-dertig blaarroesbestande plante uit die toetskruis F₁: 04M127-3/W84-17//CSN3AT3B/D. (f) Vier-en-sestig blaarroesvatbare plante uit die toetskruis F₁: 04M127-3/W84-17//CSN3AT3B/D. (g) Vier CS aneuploïede lyne; CSN3AT3B (CS nullisomies 3A, tetrasomies 3B), CSN3AT3D (CS nullisomies 3A, tetrasomies 3D), CSDT3AS (CS ditelosomies 3AS), CSDT3AL (Chinese Spring ditelosomies 3AL) is ook in die studie benut. Die lyne is gebruik om: (i) Die chromosoomarmligging van alle merkers wat in die studie gebruik is te bevestig. (ii) Met S13-rekombinante te kruis ten einde

hemisigote vir die translokasiechromosoom daar te stel wat geskik is vir mikrosatellietontleding.

Tabel 1: Plantmateriaal wat in hierdie studie benut is.

Genotipe	Beskrywing
<i>Ae. speltoides</i>	<i>Ae. speltoides</i> (var. <i>ligustica</i>)-691 (bestand teen alle plaaslike blaar-, stam- en streeproespatotipes)
W84-17	Gewone heksaploïede koring-teellyn; vatbaar vir blaarroespatotipe UVPrt8
Chinese Spring (CS)	Gewone heksaploïede koringkultivar; vatbaar vir blaarroespatotipe UVPrt8
Chinese Spring kort (CS-S)	'n Naby-isogeniese lyn van CS wat die kortstrooigeen, <i>Rht-B1b</i> , besit
S13-translokasie	<i>Ae. speltoides</i> /3*CS
04M127-1	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
04M127-2	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
04M127-3A	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
04M127-3F ¹	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
04M127-4	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
04M127-7	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
04M127-11	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
04M127-12	Seleksie uit toetskruising: S13/2* <i>CSph1b</i> -mutant//W84-17
Toetskruis-F ₁ (bestand)	Seleksie van 35 uit toetskruising: 04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D
Toetskruis-F ₁ (vatbaar)	Seleksie van 64 uit toetskruising: 04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D
CSDT3AS	Chinese Spring ditelo 3AS; $2n = 40 + 2t^{3AS}$
CSDT3AL	Chinese Spring ditelo 3AL; $2n = 40 + 2t^{3AL}$
CSN3AT3B	Chinese Spring nullisoom 3A tetrasoom 3B; $2n = 42$
CSN3AT3D	Chinese Spring nullisoom 3A tetrasoom 3D; $2n = 42$

¹ Die F₂-familie het plante ingesluit met 'n atipiese (intermediêre) blaarroes weerstandsreaksie.

2.3. Deoksiribonukleïensuur- (DNS-) ekstraksie

Blaarmateriaal van alle rekombinant sowel as kontrole plante tydens hierdie studie is vanaf Welgevallen proefplaas te Stellenbosch, bekom. Totale genomiese-DNS van die plantmateriaal is volgens 'n klein-skaal weergawe van die Doyle en Doyle (1990) protokol, geëkstraheer. Die DNS-monsters is by -20°C gestoor en verdun tot 'n konsentrasie van 100 ng/μl voor gebruik daarvan vir polimerasekettingreaksie (PKR) amplifikasie.

2.4. Mikrosatelliet-tipering

Die fisiese en genetiese kaarte vir chromosoom 3A (*T. aestivum*), wat op die *GrainGenes* webtuiste (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) asook in gepubliseerde chromosoom 3A kaarte (Röder *et al.*, 1998; Somers *et al.*, 2004; Sourdille *et al.*, 2004; Torada *et al.*, 2006 verskyn, is gebruik om potensieel-nuttige mikrosatelliet-merkers vir die studie, te identifiseer. Die inleiervolgordes sowel as die smeltingstemperature (T_m) vir die mikrosatelliet-merkers (chromosoom 3A) wat gebruik is, word in Tabel 2 uiteengesit.

Tabel 2: Inleiervolgordes, smeltingstemperature en fragmentgroottes van die mikrosatellietmerkers wat gebruik is vir die karakterisering van variante van die *Ae. speltoides* verhaalde S13 translokasie.

Mikrosatelliet lokus	Voorwaartse inleiervolgorde (5'-3') ^a	Terugwaartse inleiervolgorde (5'-3') ^a	T _m (°C) ^b	Fragment grootte (bp) ^c
<i>Xbarc57</i> (3AS)	GCGACCACCTCAGCCAACCTT ATTATGT	GCGGGGAGGCACATTCATAG GAGT	62	252
<i>Xglk683/Sun-2</i> (3AS)	CTAAGATACCAAGAACAGAG C	GCACTCCTCAAACACTTAAG C	60	X
<i>Xbarc294</i> (3AS)	ACGTCATCGAGCCCTTCTAT	AGAGACACGGTTGCTACAAA GA	56	232
<i>Xbarc310</i> (3AS)	GGGCGGCGCATGTGCACCTA	GCGTGGGAAGCGACTAAATCA ACT	62	199
<i>Xwmc11</i> (3AS)	TTGTGATCCTGGTTGTGTTGT GA	CACCCAGCCGTTATATATGT TGA	56	177
<i>Xbarc12</i> (3AS)	CGACAGAGTGATCACCCAAA TATAA	CATCGGTCTAATTGTCAATG TA	53	200
<i>Xwmc532</i> (3AS)	GATACATCAAGATCGTGCCA AA	GGGAGAAATCATTAAACGAAG GG	53	176
<i>Xcfd79</i> (3AS)	TCTGGTCTTGGGAGGAAGA	CATCCAACAATTTGCCCAT	53	284
<i>Xgwm369</i> (3AS)	CTGCAGGCCATGATGATG	ACCGTGGGTGTTGTGAGC	56	X
<i>Xgwm218</i> (3AS)	CGGCAAACGGATATCGAC	AACAGTAACTCTCGCCATAG CC	55	X
<i>Xbarc284</i> (3AS)	GCGTCAGAAATGCAAGAAA AATAGG	GCGGAAGAAAAGGACGAAG ACAAG	57	232
<i>Xwmc050</i> (3AS)	CTGCCGTCAGGCCAGGCTCA CA	CAACCAGCTAGCTGCCGCCG AA	66	X
<i>Xbarc19</i> (3AS)	GCGACCCGAGTAGCCTGAA	GGTGGACCATTAGACGCTTA CTTG	58	146
<i>Xbarc45</i> (3AS)	CCCAGATGCAATGAAACCAC AAT	GCGTAGAACTGAAGCGTAAA ATTA	55	182
<i>Xgwm2</i> (3AS)	CTGCAAGCCTGTGATCAACT	CATTCTCAAATGATCGAACA	52	132
<i>Xwmc475</i> (3AS)	AACACATTTTCTGTCTTTTCG C	TGTAGTTATGCCAACCTTTC C	55	154
<i>Xgwm5</i> (3AS)	GCCAGCTACCTCGATAACAAC TC	AGAAAGGGCCAGGCTAGTA GT	58	172
<i>Xgwm674</i> (3AS)	TCGAGCGATTTTTCCTGC	TGACCGAGTTGACCAAACA	54	X
<i>Xbarc67</i> (3AL)	GCGGCATTTACATTTTCAGAT AGA	TGTGCCTGATTGTAGTAACG TATGTA	55	104
<i>Xgwm391</i> (3AL)	ATAGCGAAGTCTCCCTACTC CA	ATGTGCATGTGCGGACGC	57	X
<i>Xbarc1021</i> (3AL)	GGAAGGACCTGACTGACTGC ATCTG	GCGATCACAACCATTCTTTTT AACTA	58	X

^a Vyfaksent-kant na drieaksent-kant

^b Grade Celsius

^c Basispare

X Produk fragment grootte onbekend

2.5. Polimerasekettingreaksie (PKR) amplifikasie van mikrosatellietmerkers

Mikrosatellietvolgordes is geamplifiseer met gebruik van die PKR-siklus voorgestel deur Röder *et al.* (1998).

Ongeveer 200 ng genomiese-DNS is as templaar gebruik in 'n 20 µl reaksie-volume wat 2X PKR-buffer (*Bioline*), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM van elke dNTP (*Bioline*), 0.5 µM van elke inleier, 1 U *Taq*-polimerase (*Bioline*) en SABAX water, bevat het. Die amplifikasie-reaksies is in 'n *Applied Biosystems* termo-sirkuleerder 2720 uitgevoer vir 45 siklusse. Na 'n inisiële denaturasiestap van 1 minuut by 94°C, het elke siklus bestaan uit 1 minuut by 94°C, 1 minuut by die inleiersmeltingstemperatuur (T_m) (Tabel 2), en 2 minute by 72°C. Die 45 siklusse is gevolg deur 'n finale 10 minute verlengings-stap by 72°C. Die amplifikasieprodukte is geskei deur elektroforese van 5 µl van die reaksie-volume in 'n 1.5% m/v agarose jel wat 0.005% v/v ethidiumbromied bevat. Die bandpatrone is onder ultraviolet (UV) lig gevisualiseer.

Die amplifikasieprodukte is geskei op 'n 6% m/v akriëlamied:bisakriëlamied denatureringsjel wat 6M urea en 1X TBE bevat het. Die jel is voorberei deur 'n 1000 µl ammoniumpersulfaat (10% m/v) en 200 µl N, N, N', N'-tetrametyleendiamien (TEMED) by 200 ml van die 6% voorraad-oplossing te voeg. Die jel is gegiet met behulp van 1.0 mm dik spasieërders en kamme en is toegelaat om vir een uur te polimeriseer voor dit in die elektroforese-apparaat geplaas is. Daarna is die jel toegelaat om vir 30 minute teen 65W te loop. Die putjies is met 1X TBE uitgespoel voordat die monsters gelaai is. Vyftien µl van elke monster, wat uit gelyke volumes amplifikasie-produk en AFLP-laaibuffer (98% formamied, 10mM EDTA, 0.05% bromofenolblou en 0.05% xileensianol) bestaan het, is vir 5 minute by 95°C gedensatureer en dadelik op ys geplaas voordat dit in die putjies van die jel gelaai is. 'n Die jel is dan toegelaat om vir vyf en 'n half-uur teen 50W te elektroforeer voordat dit met silwer-kleuring gevisualiseer is.

2.6. Silwer-kleuring

Na afloop van elektroforese is die twee glasplate van mekaar geskei en die plaat wat

die jel bevat vir 20 minute in 'n fikseermiddel (0.5% v/v gekonsentreerde asynsuur en 10% v/v etanol) geplaas. Die fikserings-stap is gevolg deur twee 5-minute was-stappe met dH₂O by kamertemperatuur. Kleuring is gedoen met 0.1% m/v AgNO₃-oplossing vir 20 minute by kamertemperatuur gevolg deur nog 'n 10-sekonde was-stap met dH₂O. Die jel is daarna oorgedra na 'n ontwikkelings-oplossing (1.5% m/v NaOH en 0.16 % v/v formaldehyd) en toegelaat om te ontwikkel tot die bande sigbaar geword het. Die jel is dan vir 'n laaste keer afgespoel met dH₂O en in plastiek geseël om uitdroging te voorkom.

2.7. Analise van die mikrosatelliet jelle

Die bandpatroon van elke plantmonster is met behulp van die kontrole bandpatrone geanaliseer en 'n foto is vir rekord-doeleindes van elke mikrosatelliet jel geneem.

2.8. Opsporing van rekombinante S13-translokasie-homosigote

Die rekombinante S13 translokasie, 04M127-3A, kon nie vir kruising met CSDT3AL gesinchroniseer word nie. Dié betrokke F₂-populasie waarin hierdie rekombinant gesegregeer het moes dus gesif word vir homosigote ten einde mikrosatellietanalise te doen.

Die 04M127 families 5-55 (uitgesluit 22-36, 39 en 48) is gesif vir moontlike verdere rekombinante S13 translokasies. Toe sodanige rekombinante gevind is moes daar weereens binne die betrokke families homosigote geïdentifiseer word vir mikrosatellietontleding.

In al die bogenoemde gevalle is homosigote soos volg opgespoor: Die betrokke F₂-families is vir weerstand teen blaarroespatotipe UVPrt8 getoets. Daardie plante wat die sterkste weerstandsreaksies (= ; of 1) getoon het, is uitgeplant. Dié plante is daarna met mikrosatellietmerkers *Xbarc294* en *Xgwm674* getoets om vir plante homosigoties vir die S13 translokasie te sif (homosigoties vir die nul-allele). Plante wat as moontlik homosigoties geïdentifiseer is, is daarna met die hele mikrosatelliet-paneel getoets ten einde die S13 translokasie se grootte en ligging te tipeer en te bevestig dat dit wel 'n rekombinant is.

2.9. Saailing blaarroesweerstandstoetsing

Saailinge is met *Puccinia triticina* patotipe UVPrt8 ge-inokuleer. Die blaarroes-spore is in 250 ml gedistilleerde water met een klein druppel Triton (benattingsmiddel), gesuspendeer. Die twee-blaar stadium saailinge is met die spoor-water-Triton mengsel bespuit met gebruik van 'n handspuit met 'n fyn sproeikop. Die geïnokuleerde plante is met plastiek-sakkies bedek om 'n hoë humiditeit te handhaaf en is vir 24-uur in die donker geïnkubeer. Die plante is daarna in 'n broeikamer by 'n temperatuur van 22-25°C en met 'n dag/nag siklus van 16/8 ure, geplaas. Weerstandreaksies is na 10-15 dae geëvalueer volgens die standaard 0-4 skaal deur Stakman en medewerkers in 1962 voorgestel gemodifiseer deur Roelfs in 1985 (soos aangehaal deur McIntosh, 1995). Plante met *LrS13* het tipies 'n ; tot ;1 infeksietipe geproduseer terwyl plante sonder *LrS13* gewoonlik voluit vatbaar was (IT = 3-4).

2.10. Streeproes-weerstandstoetsing

Die rekombinante, kontroles en S13 translokasie is gedurende die 2008 groeiseisoen op die land (Welgevallen proefplaas) geplant. Natuurlike infeksie met streeproes het geskied en die volwasse plante is onderling vergelyk. CS besit die volwasse plant weerstandsgene *Yr18/Lr34*. Die *Yr18*-reaksie is egter onderskeibaar van die sterk hipersensitiewe weerstand geassosieerd met *YrS13*.

2.11. Opspoor van *Aegilops speltoides*-spesifieke volgordes en gebruik daarvan om inleiers te ontwerp

Sestien verskillende *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes is met behulp van *Genbank* se *Entrez* soekfunksie op die *Nasionale Sentrum vir Bioinformatiese Informasie* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) webtuiste, gevind. Hierdié volgordes het die volgende ingesluit: (i) Klas 1 en 2 transponeerbare-elemente, (ii) subtelomeriese herhalings, (iii) mikrosatellietvolgordes, asook (iv) tandemherhalings. Tabel 3 dui die verskillende *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes, asook hul aanwinnommers soos op *Entrez Nucleotide* (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide), aan. 'n Afgekorte benaming (in die eerste kolom van Tabel 3) is eenvoudigheidshalwe vir elke *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde, geskep. Geen vooraf-kennis aangaande die mate waartoe hierdie

volgordes met *T. aestivum* (CS-Chinese Spring) ooreenstem was beskikbaar nie, maar dié volgordes is gekies vanweë die feit dat daar geen merkbare ooreenkoms met die *T. aestivum*-genoom aangedui is nadat daar 'n homologie soektog geloods is nie (NCBI; BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Hierdié volgordes is vervolgens gebruik vir inleierontwerp (Tabel 4). Al die inleierstelle is volgens eie ontwerp, deur gebruik te maak van *Integrated DNA technologies* (IDT; www.idtdna.com) se *PrimerQuestSM*-program (www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/). Die verwagte PKR produk-grootte asook die inleiervolgordes en smeltingstemperatuur (T_m) vir die onderskeie fragmente word in Tabel 4 aangetoon. Die potensiële bruikbaarheid van die verkreeë inleiers vir die kartering van rekombinante is bepaal deur dit te toets teen 'n paneel bestaande uit die volgende genotipes: CS, CS-S, W84-17, *Ae. speltoides* en die volledige S13 translokasie.

Tabel 3: *Aegilops speltoides*-spesifieke volgordes wat gekies is vir inleierontwerp in 'n poging om verdere merkers vir karakterisering van die S13 translokasie te bekom.

Afkorting	<i>Ae. speltoides</i> -spesifieke volgordes	Aanwinnommer	Publikasie
TST1	En/Spm-gelyke transposon, kloon Esas-3 (gedeeltelike volgorde).	AY265312	Raskina, <i>et al.</i> , 2004a.
TST2	Ty1-copia retrotransposon terugtranskriptase-gelyke geen, kloon Cas-11 (gedeeltelike volgorde).	AY221465	Ongepubliseerd
TST3	CEREBA/WIS 2-1A-gelyke putatiewe retrotransposon-gelyke element.	AJ300268	Muniz, <i>et al.</i> , 2001
TST4	Ty3-gypsy retrotransposon RT-geen, kloon Gas-5 (gedeeltelike volgorde).	AY204211	Belyayev, <i>et al.</i> , 2005.
TST5	Au-element retrotransposonvolgorde, kloon 10.	AY674974	Ongepubliseerd
TST6	Acas-1 transposon (gedeeltelike volgorde).	AY894831	Altinkut, <i>et al.</i> , 2006.
TST7	Morgane_1611A10-1 transposon, kloon B8_B.	AY675334	Sabot, <i>et al.</i> , 2006.
TST8	Copia-gelyke retrotransposon (gedeeltelike volgorde).	AF305421	Raskina, <i>et al.</i> , 2002.
TST9	Transposon Tpo1 <i>TnpD</i> geen, kloon Trit-sp1.	AF492377	Langdon, <i>et al.</i> , 2003.
TST10	Copia-gelyke retrotransposon, fragment van die terugtranskriptase, kloon: S3 (gedeeltelike volgorde).	D90687	Matsuoka & Tsunewaki, 1996.
TSH1	Spelt1 subtelomeriese herhalende volgorde.	AY117402	Salina, <i>et al.</i> , 2004.
TSH2	<i>Aegilops speltoides</i> DNS, mikrosatellietvolgorde, kloon:307-5.	AB088402	Cheng en Murata, 2003.
TSH3	<i>Aegilops speltoides</i> familie van tandemherhalende DNS.	Y09217	Salina, <i>et al.</i> , 1997.
TSH4	Tail-familie tandemherhalende volgorde.	AB077258	Ongepubliseerd
TSH5	Afa-familie tandemherhalende volgorde, kloon Afa-spe5.	AB003244	Nagaki, <i>et al.</i> , 1998.
TSS1	<i>Aegilops speltoides</i> genoom-spesifieke DNS.	Z21644	Anamthawat-Jonsson, <i>et al.</i> , 1993.

Tabel 4: Ontwerpte *Ae. speltoides*-spesifieke oligonukleotied inleiervolgordes en PKR-kondisies wat gebruik is om hul potensieële bruikbaarheid te toets.

<i>Ae. speltoides</i> - spesifieke volgordes	Inleierstel	Inleiervolgorde (5'-3')	T _m ^a (°C)	PKR-fragment grootte ^b (bp)
TST1	TST1F	GTG ATA GCA TTA TCG GCA CAC TC	56	510
	TST1R	ACA GCC AAA TGC ACC ATC AC		
TST2	TST2F	AGA TGG TCA GGA AGG GAA AGT G	55.5	178
	TST2R	AAA GCA TAA CTC CCT CGC CTC		
TST3	TST3F	ACA CAA CGG TTA CCA TAC GTG C	55.5	700
	TST3R	AGT GTT CCG CGT GTG TAA ATC C		
TST4	TST4F	GCT TGA ACA CTC TCA CTT AGC C	57	344
	TST4R	CTT GGG TCA ATA GTT GGG TTT GCC		
TST5	TST5F	CAG TGC ATT TAG CTC CCG CTT GC	58	150
	TST5R	CCT TGG CGC AGT GGT AAA GC		
TST6	TST6F	CAC TCT GGC TTC ATC AAT TCG C	55.5	756
	TST6R	AAA CAA ACA GCC GGT TCA CG		
TST7	TST7F	GAG CTG CAA AGT CTG TCG AAA C	55	888
	TST7R	AGT GTG ATG ATC TGC CCG TAT G		
TST8	TST8F	TGG CTT TCT GGA GAA GAG TTG T	55.5	245
	TST8R	CCA TGT CGT CGA CGT ATA GCA T		
TST9	TST9F	CCT TGG TTG TGC ATG AAG AGG AAG	57	220
	TST9R	ATC CGT AAC CGA GAT AGT CGT G		
TST10	TST10F	TGT ATA TGA TGC AGC CGG AAG G	56.5	191
	TST10R	GCT CCC ACT CAC TTT CTT GTA AAC G		
TSH1	TSH1F	GTG CCA TAG AGG AGC AAG TTA TCG	55	453
	TSH1R	TGA CCT CAT GTT GAG AAT TTG GC		
TSH2	TSH2F	ATC ACT GGC CTT GAG AAG ACG TTC	59	255
	TSH2R	AGC AGC AGG AGC CAC AGA ATT ATC		
TSH3	TSH3F	CGA TAA CTT GCT CCT CTA TGG CAC	55	127
	TSH3R	GGC CAA ATT CTC AAC ATG AGG TC		
TSH4	TSH4F	GCA TTC CTG GCA TCG GTC	56	559
	TSH4R	TGT TCT TGG CTG TTA CGT GC		
TSH5	TSH5F	GCA TGT GCA AGA AAG TTG AGA GGG	55	104
	TSH5R	ACG AGT TTC CGT ATG AAA TCC TGA		
TSS1	TSS1F	TTG CAC ACA AAC CGC ACG AAA G	55	534
	TSS1R	TGA CCA AAT GGA TCT ACG GCA C		

Alle inleierstelle is volgens eie ontwerp

F, voorwaarts (forward); R, terugwaarts (reverse)

^a Geoptimiseerde smeltingstemperatuur vir elke inleierstel

^b Fragment grootte van produk na amplifikasie

2.12. Polimerasekettingreaksie (PKR) amplifisering met gebruik van *Aegilops speltoides*-gebaseerde inleierstelle

PKR-amplifikasie het in 'n 25 µl reaksies plaasgevind, met die gebruik van reagenses soos uiteengesit in Tabel 5. Een PKR-program is gebruik om al die inleierstelle te amplifiseer. Die PKR-program was as volg: 'n inisiële denatureringstap van 3 minute by 94°C, gevolg deur 35 siklusse van 1 minuut by 94°C, 45 sekondes by die geoptimeerde smeltingstemperatuur (Tabel 4), 1 minuut by 72°C en 'n finale verlengings-stap by 72°C vir 7 minute. Die voorraadkonsentrasies asook die reaksiekonsentrasies van elke PKR-reagens in die verskillende amplifikasie-reaksies word in Tabel 5 gelys. Die amplifikasieprodukte is op 'n 2% agarose jel, wat ethidiumbromied 0.005% v/v bevat, geanaliseer om die bandgrootte asook die spesifisiteit van die amplifikasie-reaksies te kontroleer.

2.13. Gebruik van bestaande SCAR-merkers

Vier verskillende SCAR-merkers, spesifiek vir die S13 translokasie is gedurende 2008 in die laboratorium ontwikkel (Eksteen, 2008). Die SCAR-merkers, hul inleiervolgordes, PKR produkgroottes en smeltingstemperatuur (T_m) word in Tabel 6 aangedui. PKR amplifikasie het in 25 µl reaksie-mengsels plaasgevind, met die gebruik van reagenses soos uiteengesit in Tabel 7. Een PKR-program is gebruik om al die fragmente van die onderskeie SCAR-merkers wat ondersoek word, te amplifiseer. Die PKR-program was as volg: 'n inisiële denatureringstap van 5 minute by 94°C, gevolg deur 40 siklusse van 1 minuut by 94°C, 30 sekondes by die geoptimeerde smeltingstemperatuur (Tabel 6), 1,5 minuut by 72°C en 'n finale verlengings-stap by 72°C vir 7 minute. Die voorraadkonsentrasies asook die reaksiekonsentrasies van elke PKR-reagens in die verskillende amplifikasie-reaksies word in Tabel 7 gelys. Die amplifikasieprodukte is op 'n 2% agarose jel, wat ethidiumbromied bevat, geëlektroforeer om die bandgrootte asook die spesifisiteit van die amplifikasie-reaksies te kontroleer.

Tabel 5: Geoptimeerde konsentrasies van die PCR-reagense (*Bioline*) vir gebruik met *Ae. speltoides*-spesifieke inleierstelle.

<i>Ae. speltoides</i> - spesifieke volgordes	Inleierstel	DNS [ng] ^a	10X <i>Taq</i> Buffer ^b	MgCl ₂ [mM] ^c	Inleier [pmol] ^d	dNTPs [mM] ^e	<i>Taq</i> polimerase [U] ^f
TST1	TST1F	100	1	2.4	10	0.2	1.5
	TST1R				10		
TST2	TST2F	100	1	3	10	0.2	1
	TST2R				10		
TST3	TST3F	100	1	3	10	0.2	1.5
	TST3R				10		
TST4	TST4F	100	1	2.4	10	0.2	1.5
	TST4R				10		
TST5	TST5F	100	1	2.4	10	0.2	1.5
	TST5R				10		
TST6	TST6F	100	1	3	10	0.2	1.5
	TST6R				10		
TST7	TST7F	100	1	3	10	0.2	1.5
	TST7R				10		
TST8	TST8F	100	1	3	10	0.2	1.5
	TST8R				10		
TST9	TST9F	100	1	2.4	10	0.2	1.5
	TST9R				10		
TST10	TST10F	100	1	3	10	0.2	1.5
	TST10R				10		
TSH1	TSH1F	50	1	3	10	0.2	2
	TSH1R				10		
TSH2	TSH2F	100	1	3	10	0.2	1
	TSH2R				10		
TSH3	TSH3F	50	1	3	10	0.2	2
	TSH3R				10		
TSH4	TSH4F	100	1	1.6	10	0.2	1.5
	TSH4R				10		
TSH5	TSH5F	100	1	3	10	0.2	1.5
	TSH5R				10		
TSS1	TSS1F	100	1	3	10	0.2	1.5
	TSS1R				10		

^a DNS reaksiekonsentrasie

^b *Taq*-buffer reaksiekonsentrasie

^c Mg²⁺ reaksiekonsentrasie

^d Reaksiekonsentrasie van elke inleier

^e Reaksiekonsentrasie van elke dNTP

^f *Taq* reaksiekonsentrasie

Tabel 6: Oligonukleotied inleiervolgordes en PKR-kondisies. van drie SCAR-merkers (Eksteen, 2008) wat spesifiek is vir die S13-translokasie.

S13 translokasie- spesifieke volgordes	Inleierstel	Inleiervolgorde (5'-3')	T_m^a (°C)	PKR- fragment grootte ^b (bp)
SCAR1	R-16S13F	GGTGAACGCTAAACCCAGGTAACC	57	605
	R-16R	CAACCTGGGAAGATGCTGAG		
SCAR2	R-16S13F	GGTGAACGCTAAACCCAGGTAACC	57	819
	R-16S13R	GGTGAACGCTGATGGCACTAT		
SCAR3	R-16F	CACAGGGTGGTTTTGCACG	57	730
	R-16S13R	GGTGAACGCTGATGGCACTAT		

F, voorwaarts (forward)

R, terugwaarts (reverse)

^a Geoptimiseerde smeltingstemperatuur vir elke inleierstel

^b Fragment grootte van produk na amplifikasie

Tabel 7: Geoptimiseerde konsentrasies van die PKR-reagense (*Bioline*) vir drie SCAR-merkers (Eksteen, 2008) wat spesifiek is vir die S13-translokasie.

S13 translokasie- spesifieke volgordes	Inleierstel	DNS [ng] ^a	10X Taq Buffer ^b	MgCl ₂ [mM] ^c	Inleier [pmol] ^d	dNTPs [mM] ^e	Taq polimerase [U] ^f
SCAR1	R-16F	100	1	1.2	8	0.2	1
	R-16R				8		
SCAR2	R-16S13F	100	1	1.2	8	0.2	1
	R-16S13R				8		
SCAR3	R-16S13F	100	1	1.2	8	0.2	1
	R-16F				8		

^a DNS reaksiekonsentrasie

^b Taq-buffer reaksiekonsentrasie

^c Mg²⁺ reaksiekonsentrasie

^d Reaksiekonsentrasie van elke inleier

^e Reaksiekonsentrasie van elke dNTP

^f Taq reaksiekonsentrasie

F, voorwaarts (forward)

R, terugwaarts (reverse)

2.14. DArT analise van S13 rekombinante

DArT-analise is gedoen op die volgende genotipes: (a) Die kontroles CS, CS-S, W84-17 en die volledige S13 translokasie. (b) Rekombinant 04M127-3. (c) Vyf-en-dertig blaarroesbestande plante uit die toetskruising: 04M127-3/W84-17//CSN3AT3B/D. (d) Rekombinant 04M127-2. (e) Rekombinant 04M127-4. (f) Rekombinant 04M127-7. (g) Rekombinant 04M127-11. Monsters (20 µl) genomiese DNS met 'n konsentrasie van 100 ng/µl van elke genotipe is in 'n mikrotiter plaat gelaai. Vyf µl TE-buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA; pH8) is by elke monster gevoeg en geseël vir verskeping na die *Triticarte* genotiperingsdiens in Yarralumla, Australië. Waarna die data wat terug ontvang, geanaliseer is.

3. RESULTATE EN BESPREGING

3.1. DNS ekstraksie

DNS van alle rekombinante en kontroles soos beskryf onder Materiaal en Metodes (afdeling 2.2) is volgens die klein-skaal weergawe van die Doyle en Doyle (1990) protokol, geëkstraheer (afdeling 2.3). Alle ekstraksies was suksesvol en het genomiese-DNS van 'n hoë gehalte (hoë opbrengs en nie-gedegradear) gelewer. Die DNS is hierna tot 'n werkbare konsentrasie van 100 ng/μl verdun en vir verdere studie gebruik.

3.2. Mikrosatelliet en RFLP merkerpaneel identifikasie

SSRs is die voorkeur merkertipes vir genetiese en planteteelt studies (Sourdille, *et al.*, 2004). SSRs of te wel mikrosatellietmerkers is gesog vanweë hul ko-dominansie, lokus-spesifisiteit en geskiktheid om hoër vlakke van polimorfisme tussen naby verwante spesies op te spoor (Röder *et al.*, 1995; Plaschke *et al.*, 1995). Goed-ontwikkelde mikrosatellietkaarte is beskikbaar en die relatief digte verspreiding van mikrosatellietloci oor chromosoom 3A maak mikrosatelliete by uitstek geskik vir die genotipering van rekombinante in hierdie studie.

'n Potensieel-nuttige mikrosatelliet merkerpaneel wat op grond van inligting uit die *GrainGenes* webtuiste asook gepubliseerde chromosoom 3A kaarte geïdentifiseer is (afdeling 2.4), is vir hul geskiktheid om in die studie gebruik te word, geëvalueer. Dit het behels dat die onderskeie mikrosatellietinleiers gebruik is om merkerfragmente in die DNS van die kontrole plante te amplifiseer. Die verkree mikrosatellietprofile is toe geëvalueer vir: (i) graad van polimorfisme, (ii) voorkoms van nul-allele in enige van die koringgenome (CS, CS-S en W84-17) en (iii) spesifisiteit vir chromosoom 3A. Foto's van die tersaaklike poli-akriëlamied jelle wat vir die identifikasie van geskikte merkers gebruik is, word in Addendum A, Figure A1 tot A21 verskaf. Die (koring) chromosoom 3A diagnostiese bande word met hakies aangedui.

Die volgende merkerloci was nie geskik vir gebruik in hierdie studie nie: *Xwmc11*, *Xcfd79*, *Xbarc284*, *Xwmc050*, *Xwmc475* en *Xbarc67* (Addendum A, Figure A16-A21).

Xcfd79 is gevind om té polimorfies te wees (profiel is te kompleks) om die genotipes akkuraat genoeg te kan tipeer (Addendum A, Figuur A17). Daar kon nie 'n eenvoudige band-profiel vir herhaalbare genotiperings geïdentifiseer word nie. Netso, was die merkers *Xwmc11*, *Xbarc284*, *Xwmc475* en *Xbarc67* nie bruikbaar nie, omdat die onderskeie inleierstelle, anders as wat deur die ontwikkelaars op die webtuistes aangedui word, nie chromosoom 3A spesifieke loci in die *T. aestivum* genotipes geamplifiseer het nie (Addendum A, Figure A16, A18, A20, A21). In laasgenoemde vier gevalle is daar by elkeen van hierdie merkers 'n band-profiel in die negatiewe kontrole (CSN3AT3B) aangetref, wat met die positiewe kontroles CS, CS-S, W84-17 of CSDT3AS ooreenstem. Die CSN3AT3B kontrole besit geen chromosoom 3A nie, dus sal dit verwag word om ook geen band-profiel te toon wanneer dit met 'n merker vir die kort of lang arm van chromosoom 3A getoets word nie. Na raadpleging van verdere chromosoomkaarte is daar gevind dat merker *Xwmc475* eerder 'n lokus op chromosoom 5A (Somers *et al.*, 2004) van *T. aestivum* opspoor. In die geval van merkers *Xwmc11*, *Xbarc284* en *Xwmc050* (Addendum A, Figuur A19) word die potensiële bruikbaarheid daarvan verder verlaag deurdat die positiewe kontrole W84-17 'n nul-alleel vir hierdie merkers besit. Dit het tot gevolg dat wanneer 'n plant positief vir die W84-17 alleel is, dit as 'n vals negatief vertoon sal word.

Die RFLP-gebaseerde STS-lokus *Xglk683* (Sun-2 inleierstel) is ook aangewend vir genotiperings vanweë 'n skaarste aan geskikte mikrosatellietmerkers in die area op die kort arm van chromosoom 3A waar dié lokus aangetref word.

Die finale merkerpaneel het dus bestaan uit merkerloci *Xbarc57*, *Xglk683*, *Xbarc294*, *Xbarc310*, *Xbarc12*, *Xwmc532*, *Xgwm369*, *Xgwm218*, *Xgwm2*, *Xgwm5*, *Xbarc45*, *Xbarc19*, *Xgwm674*, *Xgwm391* en *Xbarc1021*. Hierdie merkerpaneel is dwarsdeur die studie gebruik vir die genotiperings van alle rekombinante.

3.3. Karakterisering van S13-rekombinante 1 tot 4

3.3.1. Bepaling van die relatiewe groottes en liggings van die *Ae. speltoides* chromosoomstreke in rekombinante 1 tot 4

Vier vermoedelik verkorte translokasie vorms is met die aanvang van die studie

ontvang, naamlik: rekombinant **04M127-1** (F_1 hemisigoot: CSDT3AL/04M127-1N en F_1 hemisigoot: CSDT3AL//W84-17/04M127-1); rekombinant **04M127-2** (F_1 hemisigoot CSDT3AL/04M127-2); rekombinant **04M127-4** (F_1 hemisigoot: CSDT3AL/04M127-4 en F_1 hemisigoot: CSDT3AL//W84-17/04M127-4) en rekombinant **04M127-3** (F_3 : 04M127-3A en F_3 : 04M127-3F wat vermoed was om translokasiehomosigote te wees). Rekombinante 1, 2, en 4 is almal met CSDT3AL gekruis en blaarroesbestande F_1 is geselekteer vir DNS-ekstraksie. Hierdie bestande plante was dus hemisigoties vir die kort arm van chromosoom 3A wat die translokasie dra. Die hemisigoot kan dan gebruik word om die presiese grootte en ligging van die translokasie op die kort arm te bepaal en die proses word nie bemoelijk deurdat die rekombinante moontlik heterosigoties is nie. Heterosigote gee verwronge resultate weens die feit dat die mikrosatellietmerkers wat gebruik word negatief vir die translokasie en positief vir *T. aestivum*, toets. Omdat rekombinant 3 nie gesinchroniseer kon word vir kruising met CSDT3AL nie, is 'n oënskynlik suiwertelende (homosigotiese) F_3 -populasie geïdentifiseer vir DNS-ekstraksie en merker-analise.

Die vier, rekombinante vorms asook die kontrole plante is met behulp van die geselekteerde mikrosatellietmerkers en die RFLP-gebaseerde STS-merker (*XgIk683*), (Tabel 2, Materiaal en Metodes), gekarakteriseer. Die amplifikasieprodukte van onderskeidelik die mikrosatelliet- en RFLP-merkers is op poli-akriëlamied en agarose jelle geskei. Al die tersaaklike jelfoto's verskyn in Addendum A (Figure A1-A15).

Die verkreeë merker-resultate word in Tabel 8 saamgevat. Die kort arm van chromosoom 3A van koring is ongeveer 80 centi-Morgan (cM) in lengte (Shah *et al.*, 1999) en in Tabel 8 word die merkerloci weergegee in hul mees waarskynlike volgorde soos blyk uit die gepubliseerde chromosoom 3A kaart (Röder *et al.*, 1998; Somers *et al.*, 2004; Sourdille *et al.*, 2004; Torada *et al.*, 2006; *GrainGenes*). Figuur 4 toon eweneens die mees waarskynlike konsensus volgorde van die verskillende merkerloci wat tydens die studie gebruik is. In Figuur 4 is die fisiese afstande tussen loci nie volgens skaal geteken nie en reflekteer dit ook nie koppelingsafstande nie. Die benaderde liggings van die gekarteerde loci op die chromosoom word wel op 'n fisiese kaart aangedui wat die posisies van die chromosoom 3A C-bande en die delesiebundels toon. Die fisiese kaart is verhaal uit Qi *et al.* (2003) en word volgens hul afmetings weergegee. Merkers ten opsigte waarvan daar in die literatuur teenstrydigheid bestaan

rakende hul relatiewe liggings is onderstreep. Daar is veral teenstrydigheid ten opsigte van die ligging van die merkerlokus *Xbarc67*. *Xbarc67* is as een van die aanvanklike mikrosatellietpaneel geëvalueer maar is weggelaat uit die studie omdat dit nie ondubbelsinnig aan 'n enkele chromosoomarm toegewys kon word nie (Addendum A, Figuur A21). Volgens Sourdille *et al.*, 2004 word hierdie lokus op die kort arm van chromosoom 3A aangetref, maar volgens Somers *et al.*, 2004 kom *Xbarc67* op die lang arm van chromosoom 3A voor.

Tabel 8: Resultate van die vier rekombinante S13 translokasies (04M127-1, -2, -3A en -4) en kontrole plante wat met die merker-paneel gegenotipeer is.

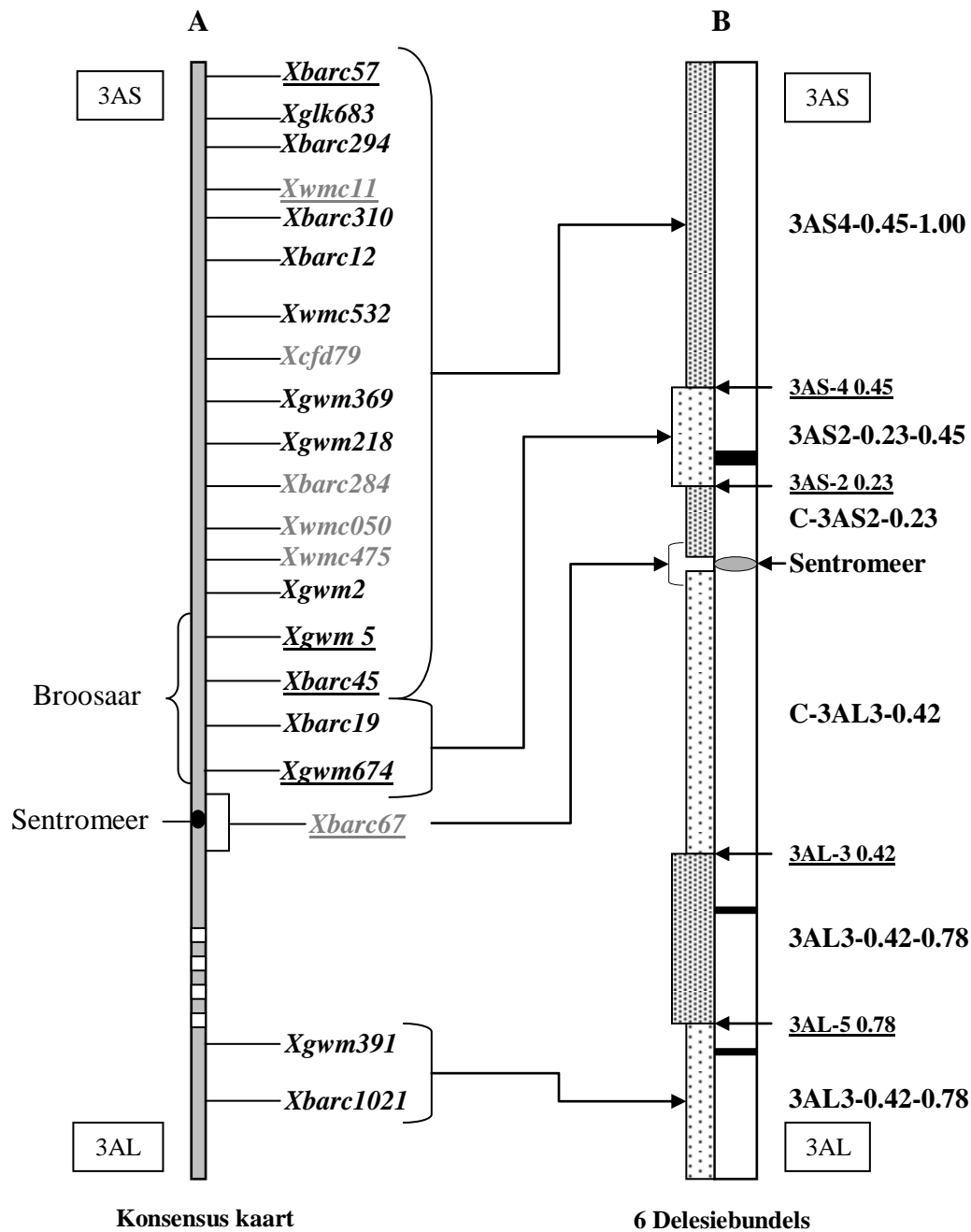
Plant no.		Kort arm (Distaal)												(Proksimaal)			Lang arm	
		<i>Xbarc</i>	<i>Xglk</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xwmc</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xbarc</i>		
		57	683	294	310	12	532	369	218	2	5	45	19	674	391	1021		
1	CSDT3AL/04M127-1N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
2	CSDT3AL/W84-17/04M127-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
3	CSDT3AL/04M127-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
4	CSDT3AL/04M127-4	-	-	+*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
5	CSDT3AL/W84-17/04M127-4	-	-	+*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
6	04M127-3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	-	Sentromeer	+	+	
11	CS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	
12	CS-S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	
13	W84-17	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*		-	+	
14	CSN3AT3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	
15	CSDT3AS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		
16	CSDT3AL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
17	<i>Ae. speltoides</i>	-	-	-	-*	-	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-		
18	S13 translokasie	-	-	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		

+, merkeralleel 1 aanwesig;

-, merkeralleel 1 afwesig;

+*, merkeralleel 2 aanwesig

-* merkeralleel 1 afwesig, ander profiel



Figuur 4: (A) Volgorde van chromosoom 3A loci wat in die studie gebruik is. Die merkerloci word weergegee in hul mees waarskynlike volgorde soos blyk uit die gepubliseerde chromosoom 3A kaarte (Röder *et al.*, 1998; Somers *et al.*, 2004; Sourdille *et al.*, 2004; Torada *et al.*, 2006; *GrainGenes*). Die merkers wat onderstreep is toon teenstrydigheid in volgorde. (B) Fisiese kaart wat die C-band patroon van chromosoom 3A aandui (Gill *et al.*, 1991) met delesie breekpunte (onderstreep) wat die chromosoom in ses delesie-bundels verdeel (Qi *et al.*, 2003). Die geraamde posisie van die *broosaar*-geen (volgens Nalam *et al.*, 2006) word ook aangedui. Die fisiese kaart is benaderd, volgens die proporsies wat in Qi *et al.* (2003) weergegee word, geteken.

Daar is ook nie geprobeer om 'n genetiese konsensus kaart van die merkerloci saam te stel nie, aangesien daar teenstrydigheid aangaande die kaart-afstande tussen die merkerloci tussen die verskillende gepubliseerde chromosoom 3A kaarte is.

Uit Tabel 8 blyk die volgende: Die data vir die volledige S13-translokasie, sowel as die van rekombinante 04M127-1 en 04M127-2 dui daarop dat hierdie twee rekombinante moontlik geen verkorting ondergaan het nie. Die vyftien merkers op die kort arm bied egter 'n beperkte resolusie en sluit nie die moontlikheid uit dat rekombinante 1 en 2 wel by die telomeer van die kort arm of aan die proksimale kant by die sentromeer kon verkort het nie. Hierbenewens is die twee lang arm merkerloci in die mees terminale delesiebundel gekarteer sodat min onthul word rakende die grootte van die volledige S13-translokasie. Dit is onduidelik of dit 'n Robertsoniese translokasie is en of 'n proksimale gedeelte van die 3AL arm ook uit *Ae. speltoides* chromatien bestaan.

In rekombinant 4 is die koringalleel (W84-17) herwin by lokus *Xbarc294*. Omdat die uitruiling waarskynlik die gevolg van 'n enkeloorkruising is, impliseer die data dat *Xbarc294* moontlik die mees distale 3AS merkerlokus is.

Na karakterisering van rekombinante 3A en 3F het geblyk dat daar in beide gevalle koringallele geamplifiseer is by al sewentien merkerloci (die resultate word nie in Tabel 8 aangedui nie). Tydens die voorbereiding van die vier rekombinante lyne vir DNS-ekstrasie, is saailing blaarroes weerstandstoetse (UVPrt8) op elk van die vier 04M127-families waarin die rekombinante translokasies segregeer het, gedoen. In die geval van rekombinant 3 is daar twee infeksietipes waargeneem. Eerstens die tipiese *LrS13* vlekreaksie; plante met hierdie reaksie is as 04M127-3A gemerk. 'n Tweede groep saailinge het 'n intermediêre (infeksietipe = X) reaksie ontwikkel; en is as 04M127-3F aangedui. Opvolgtoetsing het egter getoon dat die weerstand in die 04M127-3F plante nie van *Ae. speltoides* afkomstig is nie maar waarskynlik bemiddel word deur twee komplementêre gene, *Lr27* (chromosoom 3BS) en *Lr31* (chromosoom 4BS) wat onderskeidelik deur CS-S en CS bygedra is (Marais 2007; persoonlike mededeling). Elk van die gene op hul eie is oneffektief, maar wanneer hulle saam voorkom in 'n plant, komplementeer hulle mekaar om 'n intermediêre infeksietipe daar te stel. Dit was dus duidelik dat 04M127-3F nie 'n S13-rekombinant is nie en hierdie lyn is gevolglik nie verder geëvalueer nie.

In die geval van rekombinant 3A het opvolgondersoek getoon dat die plant wat vir DNS-ekstraksie gebruik is, nie soos oorspronklik vermoed 'n translokasiehomosigoot was nie. Omdat die vollengte translokasie sterk voorkeur-oorerwing toon mag 'n F₂-populasie afkomstig van 'n translokasieheterosigoot soms net uit bestande plante bestaan. Op grond hiervan mag daar dan verkeerdelik aanvaar word dat die lyn homosigoties vir die translokasie is (soos oënskynlik hier die geval was). Verdere nageslagstoetsing is gevolglik gedoen totdat 'n translokasie 3A homosigoot wel verkry is. Die DNS van hierdie plante is daarna gebruik vir merker-karakterisering en die korrekte data vir rekombinant 3A word in Tabel 8 verstrekk.

3.3.2. Identifikasie en karakterisering van homosigotiese, rekombinante 04M127-3A

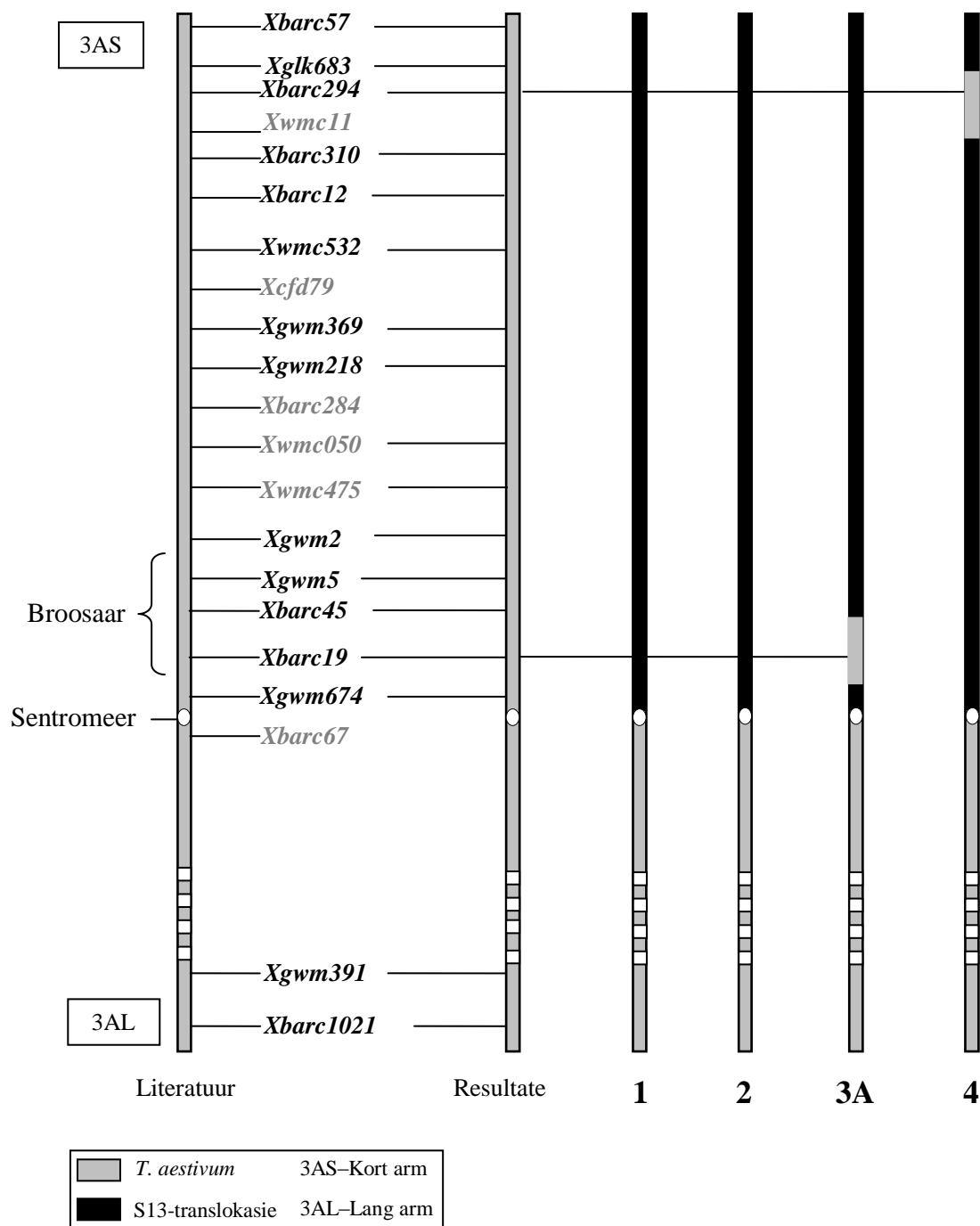
Twintig sade van twee lyne wat skynbaar suiwertelend was vir rekombinant 3 (04M127-3A-1 en -2) is geplant en blaarroes (UVPr8) toetse op die saailinge uitgevoer. Vyf plante van elke lyn met die sterkste weerstandsreaksies is uitgeplant en met merkers *Xbarc294* (lokus distaal geleë) en *Xgwm674* (lokus waarskynlik proksimaal geleë) getoets. Beide merkers is maklik ontloedbaar op agarose jelle. Sodra 'n nul-alleel vir een van die merkers waargeneem word sou dit beteken dat die betrokke plant homosigoties by die spesifieke lokus moes wees. Lyn 04M127-3A-1 het geen homosigote opgelewer nie en al die plante het beide die *Xbarc294* en *Xgwm674* loci uitgedruk. Dié lyn het ook die swakste weerstandsreaksies (2 tot 2^c) van die twee lyne getoon. Lyn 04M127-3A-2, wat die sterkste weerstandsreaksies (; tot 1⁺) getoon het, het dertien moontlike homosigote opgelewer. Die dertien plante was almal negatief vir beide *Xbarc294* en *Xgwm674*. Vier van die dertien moontlike homosigote is gekies om met die hele mikrosatellietpaneel getoets te word. Die tersaaklike jelfoto's word in Addendum B (Figure B1-B15) weergegee. Al vier plante wat rekombinante vorm 3 verteenwoordig, het dieselfde merkerprofiel getoon en die data word as 'n enkele entiteit in Tabel 8 voorgestel. Die uitgebreide data het bevestig dat die nuutgeïdentifiseerde plante wel homosigoties was. Figuur 5 toon diagrammaties aan hoe die vier rekombinante moontlik daaruit sien.

Rekombinant 3A het die koringalleel herwin by lokus *Xbarc19* wat in die tweede delesiebundel op 3AS karteer. Hierdie plante het minder hibried-nekrose getoon en het beter saadkwaliteit gehad as die ander drie rekombinante. Die bevestigde, intermediaêre

ligging van *Xbarc19* wil daarop dui dat rekombinant 3A die gevolg was van 'n dubbeloorkruisingsgebeurtenis. Dit is vreemd dat 'n dubbeloorkruising geskied het en dat slegs 'n relatief klein intermediêre spesie-chromosoomsegment verruil is vir koringchromatien. Die skynbaar laer insidensie van “gametosied-geen”-simptome in hierdie rekombinant mag beteken dat hierdie oorkruising gelei het tot die verlies van 'n *Gc*-faktor(e).

3.3.3. Uitdrukking van die broos-aar (“fragile rachis”) fenotipe in die rekombinante lyne

Rekombinante 1, 2 en 4 het die broosaar-fenotipe (Figuur 6) soos deur Nalam *et al.* (2006) beskryf, besit terwyl dit afwesig was in rekombinant 3. Dit beteken dus dat hierdie lokus in die area van koringchromatien voorkom wat herstel is in rekombinant 3. Volgens Nalam *et al.* (2006) word die broosaar-fenotipe gekenmerk deur spontane breking voor elke syaar van 'n ryp aar wat tot die verspreiding van wig-vormige diaspore lei. In die wilde spesie *Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccoides* word hierdie fenotipe deur twee hoofgene, naamlik: *broosaar 2* (*brittle rachis 2*, *Br-A2*) en *broosaar 3* (*brittle rachis 3*, *Br-A3*), beheer. Hierdie twee gene is onderskeidelik deur Nalam *et al.* (2006) op homoeoloë areas van chromosome 3A en 3B van *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, gekarteer. Verder is gevind dat die *broosaar*-gene van *T. aestivum* (*Br-A2* en *Br-A3*) homoeoloog aan die van *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* is, wat aandui dat die ligging van die gene in beide spesies gekonserveerd gebly het. Die ligging van *Br-A2* op chromosome 3A is tot 'n 11 cM area tussen merkers *Xgwm2* en *Xgwm674*, beperk. Duidelik is die data wat in hierdie studie verkry is in ooreenstemming met die gerapporteerde ligging van die broosaar-lokus. Indien die volgorde van loci *Xgwm2*, *Xgwm5*, *Xbarc45* en *Xbarc19* korrek is (Figuur 5) kan die interval waarbinne die broosaar-geen val verder vernou word na die gebied *Xgwm674-Xbarc45*.



Figuur 5: Diagrammatiese voorstelling van die moontlike aard van die S13-translokasie in rekombinante vorms 1 tot 4. Die merkers wat grys gekleur is, was nie gekik vir die karakterisering van die rekombinante nie.



Figuur 6: Foto's van die broosaar-fenotipe wat in rekombinante vorms 1, 2 en 4 waargeneem is. Met rypwording breek die are na die eerste sjaar af.

3.3.4. Saadgehalte en sigbare gametosied-effekte

Die duisend korrelmassas van sade wat verkry is na selfbestuiwing van die vier, verkorte S13-translokasies; die twee ouerlyne (S13 en W84-17) waaruit hulle verhaal is, en die F_1 van kruisings tussen die translokasies en gewone koring is vergelyk (Tabel 9). Die resultate toon dat saadmonsters van die ouertipes amper geen verrimpelde saad bevat nie. Die kruising S13 X W84-17 toon 'n verhouding van ongeveer 20:1 gevulde tot verrimpelde F_1 -sade terwyl die resiproke kruising, W84-17 X S13, slegs verrimpelde sade geproduseer het. Hierdie resiproke effek word teweeggebring deur *Gc*-gene, wat op die S13-translokasie geleë is. Wanneer die vroulike ouer die S13-translokasie besit is die effekte op die nageslag nie só erg nie, maar wanneer 'n translokasie-draer as manlike ouer met gewone koring gekruis word, veroorsaak die *Gc*-gene kwaai saadverrimpeling in die F_1 . Verskille in resiproke kruisings word normaalweg deur sitoplasma-genoom interaksies veroorsaak (Knott, 1987) en word dikwels waargeneem in kruisings met lyne wat introgressies van wilde spesie chromatie besit (Tsunewaki, 1980).

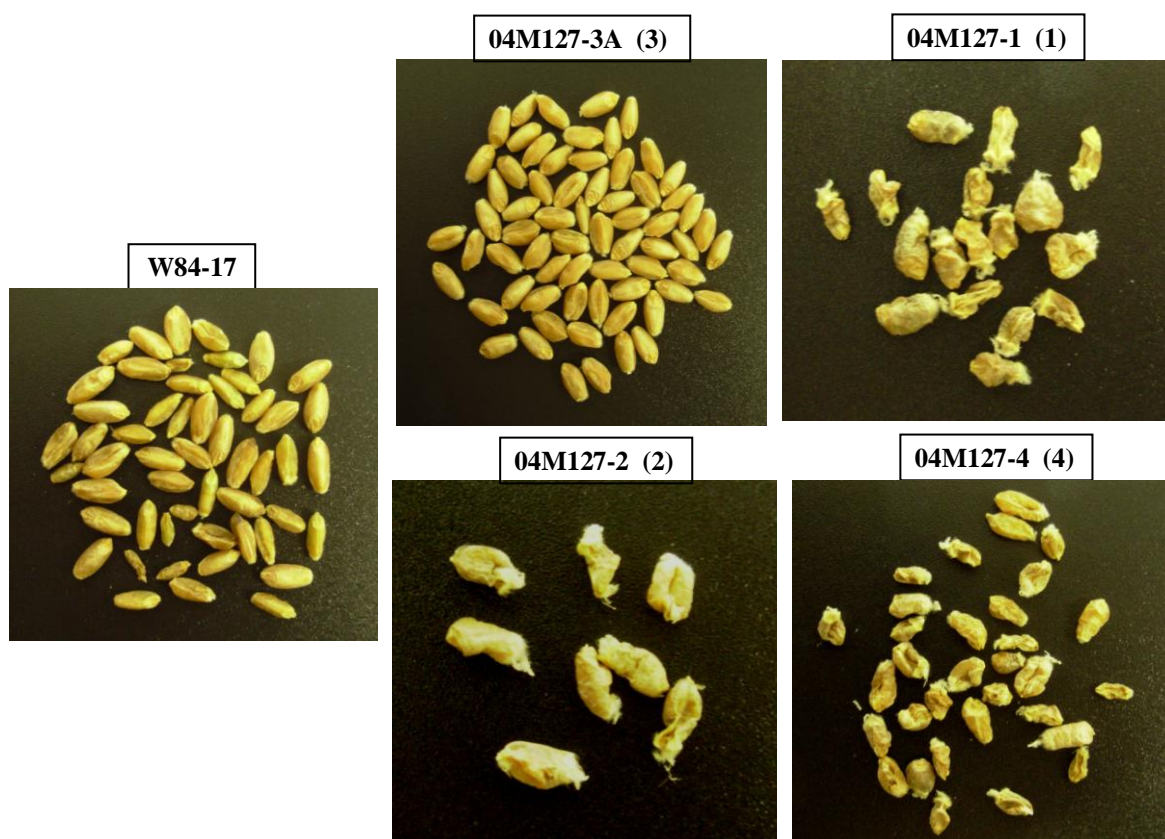
Die effek van die *Gc*-gene kan ook nog duidelik in die vier, verkorte translokasies waargeneem word. Bestuiwing van gewone koring (CSDT3AL) met S13 rekombinante 1, 2, 3 en 4 veroorsaak dat ongeveer twee-derdes van die F_1 -sade kwaai verrimpeld is. Die gemiddelde grootte van sade wat na selfbestuiwing van die vier translokasielyne verkry is, toon dat rekombinant 3 beter gehalte sade produseer (Figuur 7). Marais en Pretorius, 1996 het ook aangetoon dat die *Gc*-gene ernstige, nadelige effekte soos steriliteit, saadverrimpeling, chromosombreuke en hibried-nekrose tot gevolg het. Dus toon die meer gevulde sade wat deur rekombinante vorm 3 geproduseer word dat daar 'n moontlike verlies aan die *Gc*-gene mag wees.

Dié data vergelyk goed met die resultate wat in Tabel 8 getoon word. Verkorting van die translokasie, met die meegaande verlies aan spesie chromatie, het 'n verhoging in die saadgehalte wat verkry word tot gevolg. Rekombinante 3 en 4 het skynbaar die meeste S13-chromatie verloor en toon beter saadgehalte. Rekombinant 3 toon ook nie die broosaar-fenotipe wat deur die ander drie rekombinante vertoon word nie. Dit maak rekombinant 3 die vorm met die meeste potensiaal vir verdere ontwikkeling.

Tabel 9: Effek van die S13-translokasie en vier verkorte vorms daarvan op die gehalte van F₁-sade geproduseer uit resiproke kruisings en selfbestuiwing.

Kruising/selfbestuiwing	S13-translokasie rekombinant	Aantal sade en 1000 korrelmassa (g)	
		Verrimpeld	Vol
F ₁ : S13 X W84-17 [§]		? (1.4)	? (27.8)
F ₁ : W84-17 X S13 [§]		? (4.1)	? (0)
S13 self [§]		0 (0)	? (40.3)
W84-17 self [§]		? (1.4)	? (56.4)
F ₁ : CSDT3AL X 04M127-1N	1	8 (7.5)	9 (18.4)
F ₁ : CSDT3AL X W84-17/04M127-1	1	12 (22)	15 (39.1)
F ₁ : CSDT3AL X 04M127-2	2	3 (11.7)	5 (17.6)
F ₁ : CSDT3AL X 04M127-4	4	1 (5.5)	4 (10.5)
F ₁ : CSDT3AL X W84-17/04M127-4	4	18 (9.6)	14 (20.9)
F ₁ : 04M127-3A self	3	21 (18.3)	20 (47.5)
F ₁ : 04M127-3A X W84-17	3	2 (16.5)	2 (21.5)
F ₁ : W84-17 X 04M127-3A	3	21 (8.7)	17 (25.1)

[§] Dit is onbekend hoeveel sade, vol en verrimpeld, gebruik is vir die berekening van die 1000 korrelmassas vir : S13 X W84-17, W84-17 X S13, S13 self en W84-17 self (data is van G.F. Marais ontvang)



Figuur 7: Verteenwoordigende saadmonsters van S13 rekombinante 1 tot 4 en die W84-17 kontrole lyn. Die saadmonster van rekombinant 3A is die heterosigotiese saad wat met aanvang van die studie ontvang is. Die nuut geïdentifiseerde 04M127-3A homosigotiese saad is nie hierby ingesluit nie.

3.4. Identifikasie en karakterisering van verdere S13-rekombinante vorms

Evaluering van die vier bestaande rekombinante het daarop gedui dat rekombinant 3 die meeste potensiaal het vir verdere ontwikkeling. Die vier rekombinante is visueel (op grond van plantvoorkoms) deur Marais (2007; persoonlike mededeling) geïdentifiseer na vergelyking van 131 F₁-plante uit die toetskruising 04M127. Omdat geskikte merkers sedertdien in hierdie studie geïdentifiseer kon word, was dit moontlik om die toetskruispopulasie 04M127 weer 'n keer (met merkers) te sif vir verdere rekombinante. Die oogmerk hiermee was om vas te stel of rekombinant 3A inderdaad die nuttigste rekombinant is wat uit die toetskruispopulasie herwin kan word.

3.4.1. Saailing blaarroesweerstand-toetse vir verdere rekombinant identifikasie uit 04M127 families 5-55

Die data wat deur Marais (2007, persoonlike mededeling) gegenereer is t.o.v. die 131 toetskruis 04M127 lyne is geraadpleeg om 'n subgroep van lyne te identifiseer waarbinne daar moontlike verdere translokasies kon voorkom. Op grond van die aantal F₂-sade geproduseer en die gehalte van hierdie sade, is vyftig lyne (wat vanaf 04M127-5 tot 04M127-55 genommer is) uitgesonder vir merker-karakterisering.

Twintig sade van elkeen van die 50 families is geplant en blaarroes (UVPrt8) saailingweerstandstoetse is op die saailinge uitgevoer. Vyf plante van elke lyn met die sterkste weerstandsreaksies (; of 1) is uitgeplant en vir teenwoordigheid van die SSR-loci *Xbarc294* en *Xgwm674* getoets.

Xbarc294 en *Xgwm674* polimorfismes is maklik ontleedbaar op agarose jelle en is dus geskik vir grootskaalse sifting. Die *Xbarc294* (distaal geleë) en *Xgwm674* (naaste aan die sentromeer) loci is ook gekies weens hul relatiewe liggings. Die primêre doel met die gebruik van die merkerloci was om homosigotiese plante te identifiseer. Homosigote sal negatief toets vir ten minste een van die merkers. Indien een lokus negatief toets terwyl die ander positief toets, sou dit dui op 'n gerekombineerde translokasie-homosigoot.

Die 50 families uit toetskruising 04M127 het drie moontlik addisionele, verkorte rekombinante vorms opgelewer. Hierdie drie rekombinante kom uit die families 04M127-7, 04M127-11 en 04M127-12. Aldrie plante was negatief vir merkerlokus *Xbarc294* en positief vir *Xgwm674* en sal voortaan as rekombinante 7, 11 en 12 bekend staan. Rekombinante 7, 11 en 12 is hierna met gebruik van die hele merkerpaneel, gekarakteriseer.

3.4.2. Bepaling van die relatiewe groottes en liggings van *Ae. speltoides* chromatien in rekombinante 7, 11 en 12

Die drie rekombinante en kontrole plante is met die volle merkerstel (Tabel 2), getoets. Foto's van die amplifikasie-produkte word in Addendum B (Figure B1-B15) weergegee en die merker-resultate word in Tabel 10 opgesom. Die resultate wat voorheen met rekombinant 3 verkry is, word ook weer in Tabel 10 gelys ten einde vergelyking tussen die vier translokasies te vergemaklik. Alhoewel daar rekombinasie in vorms 3, 11 en 12 aangetoon kon word het daar moontlik geen rekombinasie in rekombinant 7 geskied nie. Daar sal opgelet word dat dié drie rekombinante in Tabel 10 (poli-akriëlamied skeiding/silwerkleuring) as negatief vir lokus *Xgwm674* aangedui is. Dit het met hertoetsing geblyk dat die plante tydens sifting op die agarose jelle verkeerdelik as positief getipeer is. Hoewel dit lyk asof 04M127-7 nie 'n rekombinant is nie, is dit egter nie onmoontlik dat rekombinasie buite die area wat deur die merkerpaneel gedek word, plaasgevind het nie.

Rekombinant 12 het dieselfde polimorfisme-profiel as rekombinant 3 getoon (positief vir lokus *Xbarc19*; Addendum B, Figuur B12) en moes dus ook 'n dubbele oorkruising tussen merkers *Xbarc45* en *Xbarc19* en merkers *Xbarc19* en *Xgwm674* ondergaan het om 'n interkalêre blok gewone koring chromatien te herwin.

Rekombinant 11 blyk om moontlik die kortste translokasie te besit na rekombinasie. Net soos met rekombinante 3 en 12 moes 'n dubbele oorkruising ook plaasgevind het. Rekombinant 11 toets positief vir merkers *Xbarc45* (Addendum B, Figuur B11) en *Xbarc19* en dus moes chiasmata tussen *Xgwm5* en *Xbarc45* asook tussen *Xbarc19* en *Xgwm674* gevorm het.

Die waarneming dat rekombinante 3, 11 en 12 aldie vanweë dubbeloorkruising in dieselfde chromosoomstreek ontstaan het, is onverwags. Homoeoloë rekombinasie word verwag om minder gereeld as homoloë rekombinasie te geskied en meer enkeloorkruisingsprodukte waarin groter gedeeltes van die translokasie deur koringchromatien vervang is, sou verwag word. Die enigste moontlike verklaring van die waargenome data is dat dit verband mag hou met die *Gc*-gene wat op die translokasie voorkom en die interaksie daarvan met die koringgenoom. Hierdie interaksies kon moontlik tot gevolg hê dat gamete met sekere (rekombinante) geenkombinasies geëlimineer is.

Figuur 8 verskaf 'n diagrammatiese voorstelling van die gerekombineerde (verkorte) S13-translokasies 3, 4, 11 en 12. Rekombinante vorms 3 en 12 besit dieselfde merkerprofiel. Rekombinant 11 het moontlik die meeste gewone koring-chromatien na rekombinasie herwin. Rekombinante 3 en 11 het albei die broos-aar kenmerk verloor en verskaf dus 'n aanduiding van die benaderde ligging van hierdie lokus. Die sade van beide rekombinante 11 en 12 sluit 'n hoë proporsie verrimpelde pitte in en die translokasies is duidelik nog steeds geassosieerd met *Gc*-effekte.

Tabel 10: Merker resultate van S13-rekombinante 3, 11 en 12 sowel as 04M127-7 en die kontrole plante.

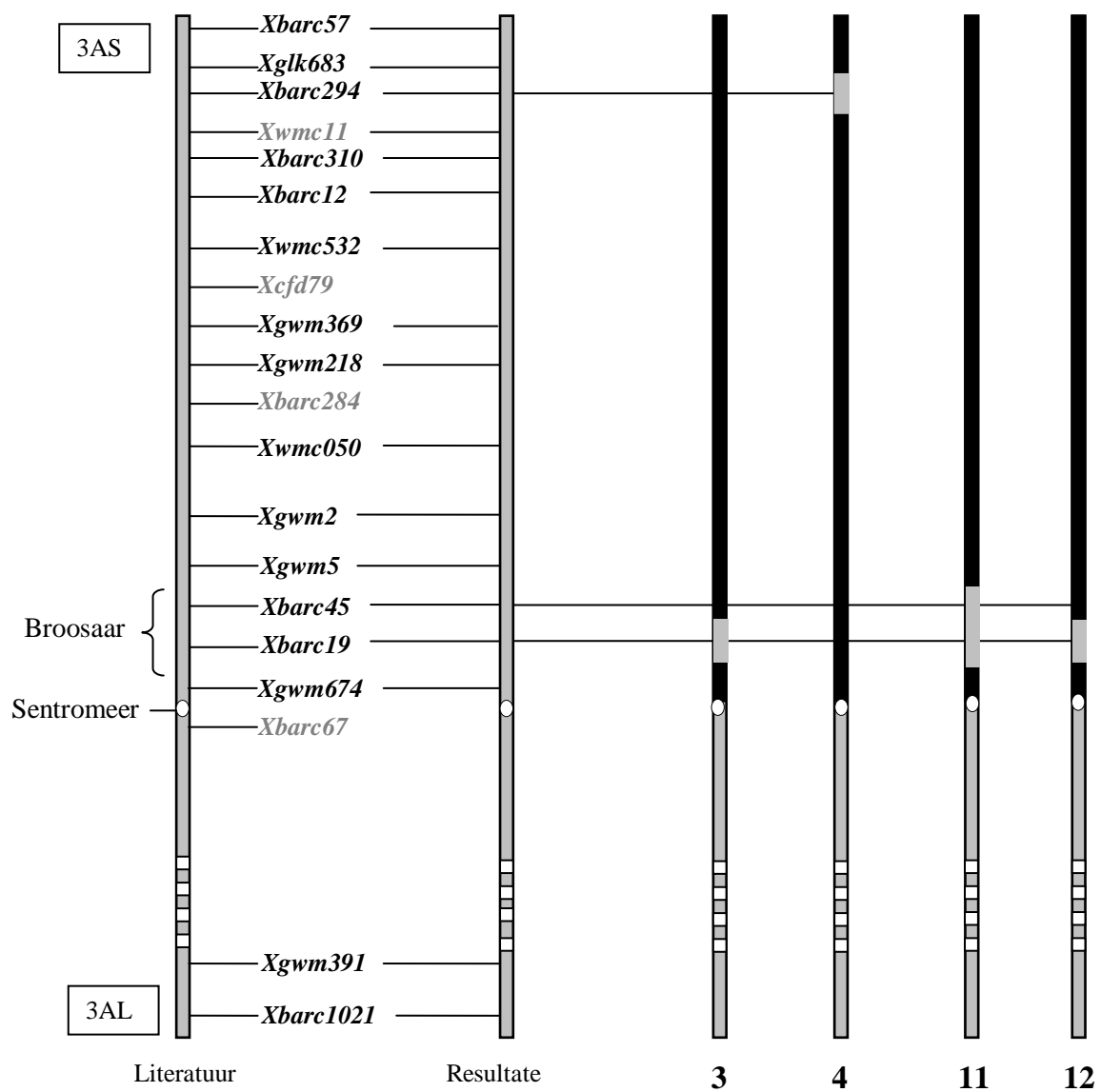
	Kort arm (Distaal)												(Proksimaal)			Lang arm	
	<i>Xbarc</i>	<i>Xglk</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xwmc</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xbarc</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xgwm</i>	<i>Xbarc</i>		
	57	683	294	310	12	532	369	218	2	5	45	19	674	391	1021		
04M127-3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*	-	+	+	
04M127-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*	+
04M127-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	*	-	+	*	+
04M127-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*	-	+	+	+
CS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CS-S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W84-17	+	*	+	+	*	+	+	+	+	*	+	+	+	+	*	+	+
CSN3AT3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSDT3AS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CSDT3AL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Ae. speltoides</i>	-	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-
S13 translokasie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+, merkeralleel 1 aanwesig;

-, merkeralleel 1 afwesig;

+, merkeralleel 2 aanwesig

-* merkeralleel 1 afwesig, ander profiel



Figuur 8: Diagrammatiese voorstelling van die moontlike ligging en grootte van die *Ae. speltoides* chromosom in vier S13-rekombinante (3, 4, 11 en 12).

3.5. Poging om verdere *Aegilops speltoides*-spesifieke merkers te identifiseer

Die hoof doelwit van hierdie studie was om wesentlik-verkorte vorms van die S13-translokasie te produseer wat steeds die weerstand sou besit maar wat vry sou wees van *Gc*-gene. Die rekombinante wat tot dusver herwin is, sal voortaan na verwys word as die groep A rekombinante en besit elk nog steeds groot areas van *Ae. speltoides*-verhaalde chromatien. Verdere pogings om rekombinante te produseer en op te spoor sal vergemaklik word indien *Ae. speltoides*-spesifieke merkers (bv. sentromeriese of telomeriese volgordes, transposonvolgordes of genoomspesifieke volgordes) ontwikkel kan word. Genoomspesifieke merkers (dominant) beteken ook dat dit nie verder nodig sou wees om eers homosigote of hemisigote te herwin nie wat die vinnige sifting van groot populasies moontlik sou maak. Die *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes wat geïdentifiseer is (afdeling 2.11) op die NCBI webtuiste is daarom gebruik om moontlike molekulêre merkers vir die S13-translokasie te skep.

3.5.1. Poging tot PCR-optimisering van *Aegilops speltoides*-spesifieke volgorde inleiers

3.5.1.1. *Aegilops speltoides*-spesifieke volgordes: *TST1*, *TST2*, *TST4*, *TST5*, *TST8*, *TST9*, *TST10*, *TSH2*, *TSH4*, *TSH5*, *TSS1*

Daardie inleierstelle wat ten volle geoptimeer kon word en nie-polimorfiese, duidelike bande van die verwagte grootte geamplifiseer het, sal eerste bespreek word.

Die *Ae. speltoides*-transposon 1 (*TST1*) PCR is ten volle geoptimeer soos aangedui in Figuur 9A. Daar is 'n duidelike band met 'n grootte van ongeveer 510 basispare (bp) geamplifiseer. Dit het ooreengestem met die verwagte produk-grootte (510bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Die inleierstel amplifiseer egter nie 'n *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde nie, maar produseer ook bande van vergelykbare grootte in CS, CS-S en W84-17 en kon dus nie as merker gebruik word nie.

Die *Ae. speltoides*-transposon 2 (*TST2*) PCR is ten volle geoptimeer soos aangedui in Figuur 9B. Daar is 'n duidelike band met 'n grootte van ongeveer 178 basispare. Dit het ooreengestem met die verwagte produk-grootte (178bp) soos bepaal deur die IDT-

inleier-ontwerp-program. Die inleierstel is egter weereens nie *Ae. speltoides* spesifiek nie.

Die *Ae. speltoides*-transposon 4 (TST4) PKR is ten volle geoptimiseer soos aangedui in Figuur 9C. Daar is 'n duidelike band met 'n grootte van ongeveer 344 basispare. Dit het ooreengestem met die verwagte produk-grootte (344bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Die geamplifiseerde produk kom egter in die koringgenoom sowel as die *Ae. speltoides*-genoom voor.

Die *Ae. speltoides*-transposon 5 (TST5) reaksie is ten volle geoptimiseer soos aangedui in Figuur 9D. Daar is 'n duidelike, nie-polimorfiese band met die verwagte grootte van ongeveer 150 basispare. Dit het ooreengestem met die verwagte produk-grootte (150bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Hierdie merker kon weereens nie as nuttig beskou word nie aangesien die geamplifiseerde produk in die koringgenoom sowel as die *Ae. speltoides*-genoom voorkom.

Die *Ae. speltoides*-transposon 8 (TST8) (Figuur 9E) inleierstel amplifiseer 'n duidelike nie-polimorfiese band van ongeveer 245 basispare wat ooreengestem het met die verwagte produk-grootte (245bp) bepaal deur IDT-inleier-ontwerp-program. Die inleierstel het ook 'n minder prominente produk met grootte ongeveer 800bp (met die pyl aangedui) wat geblyk het om *Ae. speltoides* spesifiek te wees, geamplifiseer. Hierdie skynbare *Ae. speltoides*-spesifieke RKR-produk is later in die studie getoets vir moontlike aanwending as merker om tussen die verskillende rekombinante te onderskei.

Die *Ae. speltoides*-transposon 9 (TST9) reaksie is ten volle geoptimiseer soos aangedui in Figuur 9F. Daar is 'n duidelike, nie-polimorfiese band met 'n grootte van ongeveer 220 basispare. Dit het ooreengestem met die verwagte produk-grootte (220bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Hierdie merker is ook nie as nuttig beskou nie aangesien die geamplifiseerde produk in die koringgenoom sowel as die *Ae. speltoides*-genoom voorkom.

Die *Ae. speltoides*-transposon 10 (TST10) PKR is ten volle geoptimiseer soos aangedui in Figuur 9G. Daar is 'n duidelike band met 'n grootte van ongeveer 191

basispare. Dit het ooreengestem met die verwagte produk-grootte (191bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Die inleierstel veroorsaak amplifikasie van 'n onduidelike band van ongeveer 1000 bp in grootte in *Ae. speltoides*, maar nie in S13 nie, daarom is hierdie fragment nie geskik vir merker ontwikkeling nie.

Die *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 2 (TSH2) reaksie is ten volle geoptimeer soos aangedui in Figuur 9H. Daar is 'n duidelike band met 'n grootte van ongeveer 255 basispare. Dit het ooreengestem met die verwagte produk-grootte (255bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Hierdie inleierstel is egter ook nie *Ae. speltoides* spesifiek nie.

Al hierdie ontwerpte inleierstelle amplifiseer dus nie-polimorfiese, duidelike bande van die verwagte grootte, wat nie as merkers in die huidige studie gebruik kon word nie. Die enigste uitsondering was die *Ae. speltoides*-transposon 8 inleierstel wat benewens die nie-polimorfiese teikenvolgorde ook 'n polimorfiese band met grootte 800 bp geproduseer het. Daar kan twee tentatiewe redes verskaf word waarom die inleiers wat vanaf hierdie *Ae. speltoides*-volgordes ontwerp is ook tot amplifikasie in die koringgenome lei. Eerstens: die *Ae. speltoides* transposon-volgordes kan verwag word om steeds 'n hoë mate van ooreenkoms te besit met die vergelykbare volgordes in die koringgenoom. Tweedens: die inleiers is moontlik ontwerp in areas waar daar volledige homologie tussen die koring- en *Ae. speltoides*-volgordes is.

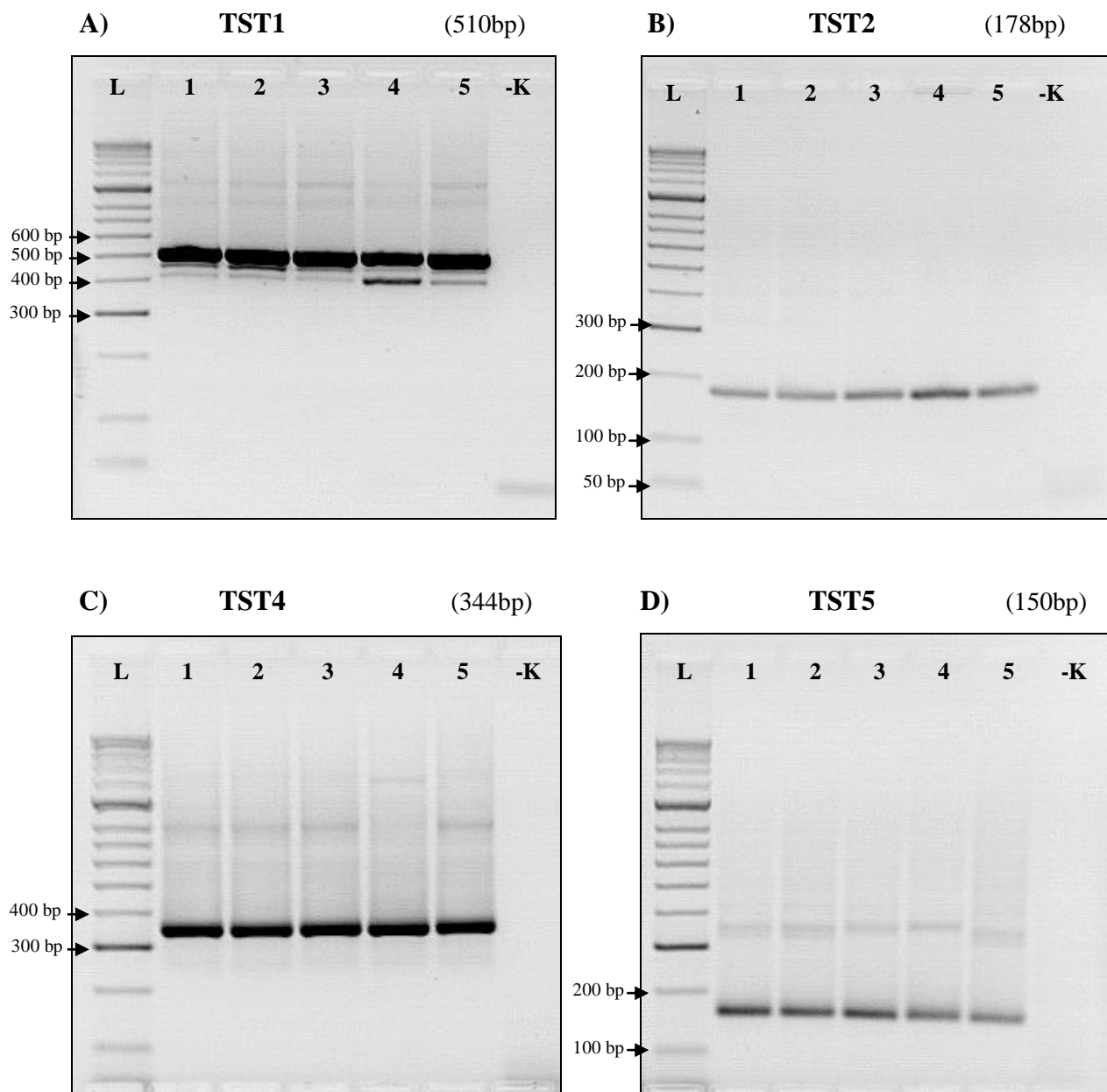
Die *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 4 (TSH4) PKR is ten volle geoptimeer soos aangedui in Figuur 9I. Die inleierstel amplifiseer polimorfiese bande waaronder 'n duidelike band met 'n grootte van ongeveer 559 basispare. Dit was in ooreenstemming met die verwagte produk-grootte (559bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Die geamplifiseerde produk kom egter in die koringgenoom sowel as die *Ae. speltoides*-genoom voor en kon dus nie as 'n geskikte merker vir die translokasie beskou word nie.

Die *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 5 (TSH5) reaksie is ten volle geoptimeer soos aangedui in Figuur 9J. Hierdie inleierstel amplifiseer ook polimorfiese bande waaronder 'n band met 'n grootte van ongeveer 104 basispare. Dit was in ooreenstemming met die verwagte produk-grootte (104bp) soos bepaal deur die IDT-

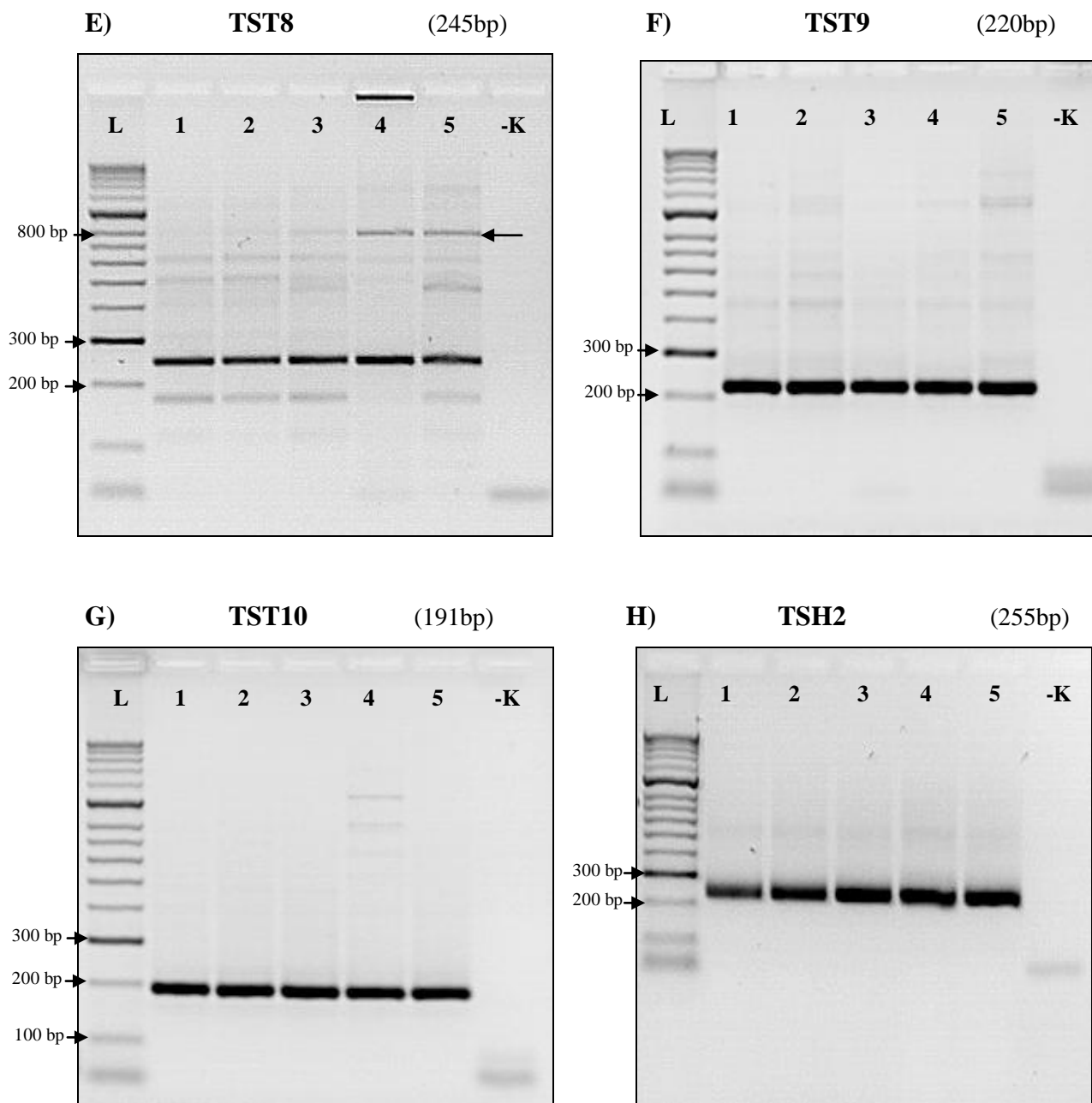
inleier-ontwerp-program. Hierdie merker kon weereens nie as nuttig beskou word nie aangesien die geamplifiseerde produk ook in beide genome voorkom.

Die *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde 1 (TSS1) PKR is ten volle geoptimeer soos aangedui in Figuur 9K. Hierdie inleierstel amplifiseer ook polimorfiese bande waaronder 'n duidelike band met 'n grootte van ongeveer 534 basispare. Dit was in ooreenstemming met die verwagte produk-grootte (534bp) bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Die inleierstel amplifiseer ook 'n produk wat nie *Ae. speltoides*-spesifiek is nie (~ 750bp). Dit sou egter as potensiële negatiewe merker kon dien. Die pyl in Figuur 9K dui 'n koringspesifieke produk aan wat in CS, CS-S en W84-17 geamplifiseer word, maar nie in *Ae. speltoides* en die translokasie nie.

Al hierdie ontwerpte inleierstelle wat gebaseer is op *Ae. speltoides* herhaalde volgorde motiewe amplifiseer nie-polimorfiese, bande van die verwagte grootte, wat nie as merkers in die huidige studie gebruik kon word nie. Die enigste uitsondering was die koringspesifieke band wat deur die *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde 1 inleiers geamplifiseer is. Duidelik moet daar ook in hierdie gevalle vergelykbare herhaalde DNS-motiewe in die koringgenome voorkom wat die ontwikkeling van genoomspesifieke merkers kompliseer.

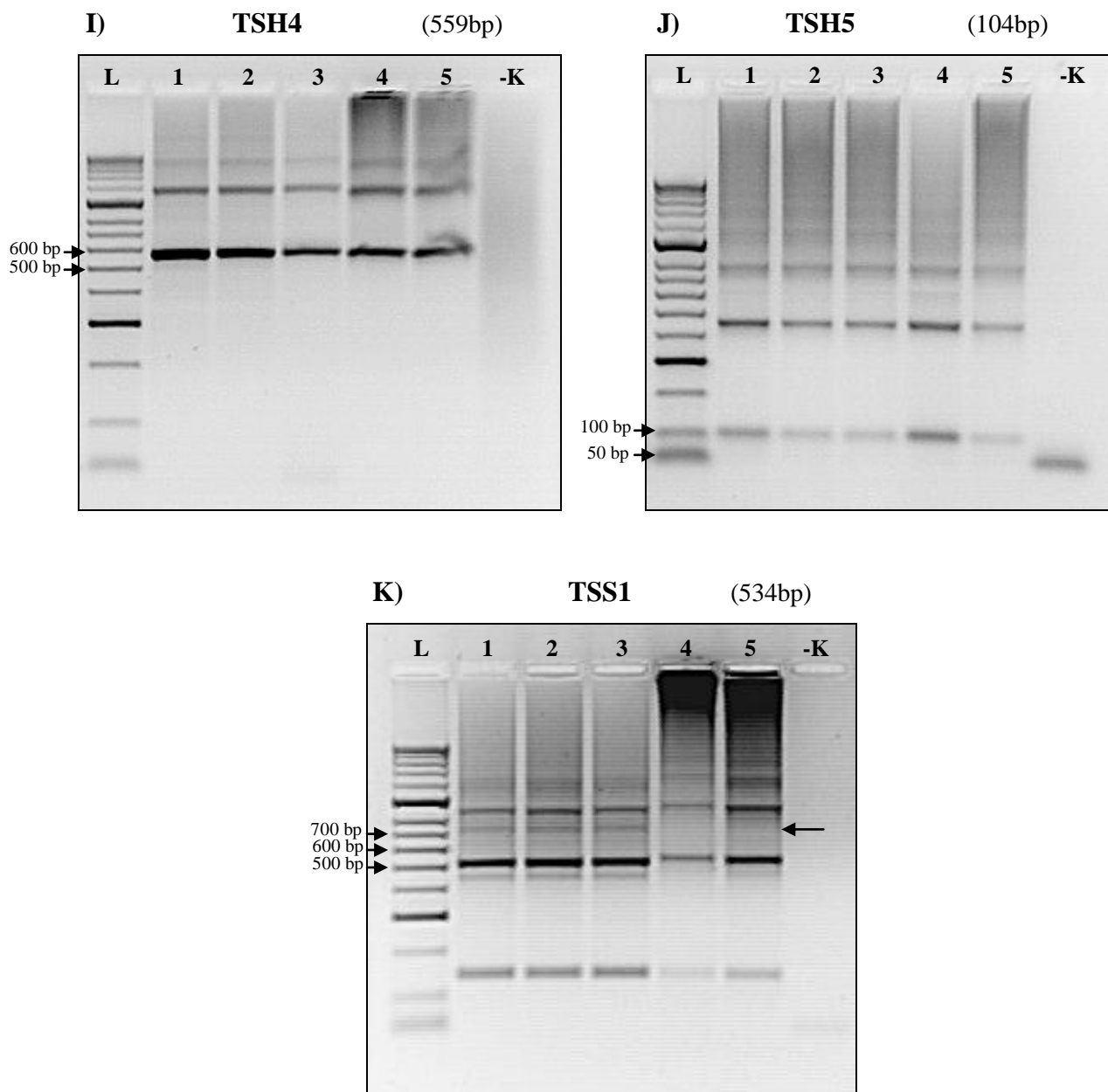


Figuur 9: Agarose foto's van die PKR-produkte van ag *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes. **(A)** TST1, *Ae. speltoides*-transposon 1; **(B)** TST2, *Ae. speltoides*-transposon 2; **(C)** TST4, *Ae. speltoides*-transposon 4; **(D)** TST5, *Ae. speltoides*-transposon 5. Controle-paneel om te toets vir *Ae. speltoides*-spesifieke amplifikasie: **(1)** CS; **(2)** CS-S; **(3)** W84-17; **(4)** *Ae. speltoides*; **(5)** Volledige S13 translokasie. **L** – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); **-K** – negatiewe kontrole (water).



Figuur 9: Vervolg:

(**E**) TST8, *Ae. speltoides*-transposon 8; (**F**) TST9, *Ae. speltoides*-transposon 9; (**G**) TST10, *Ae. speltoides*-transposon 10; (**H**) TSH2, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 2. Kontrole-paneel om te toets vir *Ae. speltoides*-spesifieke amplifikasie: (1) CS; (2) CS-S; (3) W84-17; (4) *Ae. speltoides*; (5) Volledige S13 translokasie. **L** – 100bp leer (HPLII, Bioline); **-K** – negatiewe kontrole (water).



Figuur 9: Vervolg:

Agarose jelfoto's van die PCR-produkte van drie *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes. **(I)** TSH4, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 4; **(J)** TSH5, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 5; **(K)** TSS1, *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde 1. Kontrole-paneel om te toets vir *Ae. speltoides*-spesifieke amplifikasie: **(1)** CS; **(2)** CS-S; **(3)** W84-17; **(4)** *Ae. speltoides*; **(5)** Volledige S13 translokasie. **L** – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); **-K** – negatiewe kontrole (water).

3.5.1.2. *Aegilops speltoides*-spesifieke volgordes: TST3, TST6, TST7, TSH1, TSH3

Die inleierstelle wat nie ten volle geoptimeer kon word nie en onduidelike, polimorfiese bande van onverwagte grootte geamplifiseer het, sal hier bespreek word. In iedere geval is verskeie pogings aangewend om die PKR van elke inleierstel te optimeer deur die DNS, inleierstel, MgCl₂, sowel as die dNTP konsentrasies asook die smeltingstemperatuur van die inleierstel te wysig.

Die *Ae. speltoides*-transposon 3 (TST3) inleierstel kon nie volledig geoptimeer word nie (Figuur 10A). Daar kan wel 'n band van ongeveer die regte fragment-grootte (700 bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program, waargeneem word. Dié fragment is in die S13-translokasie geamplifiseer, maar nie in *Ae. speltoides* nie. Die amplifikasiesetel van die inleierstel kan dus nie met sekerheid met die *Ae. speltoides* chromosom in die translokasie verbind word nie. Daar was ook koring-spesifieke amplifikasie in die negatiewe monsters (CS, CS-S, W84-17) waarvan die bande 'n effens sterker intensiteit getoon het as die band in die S13 translokasie laan.

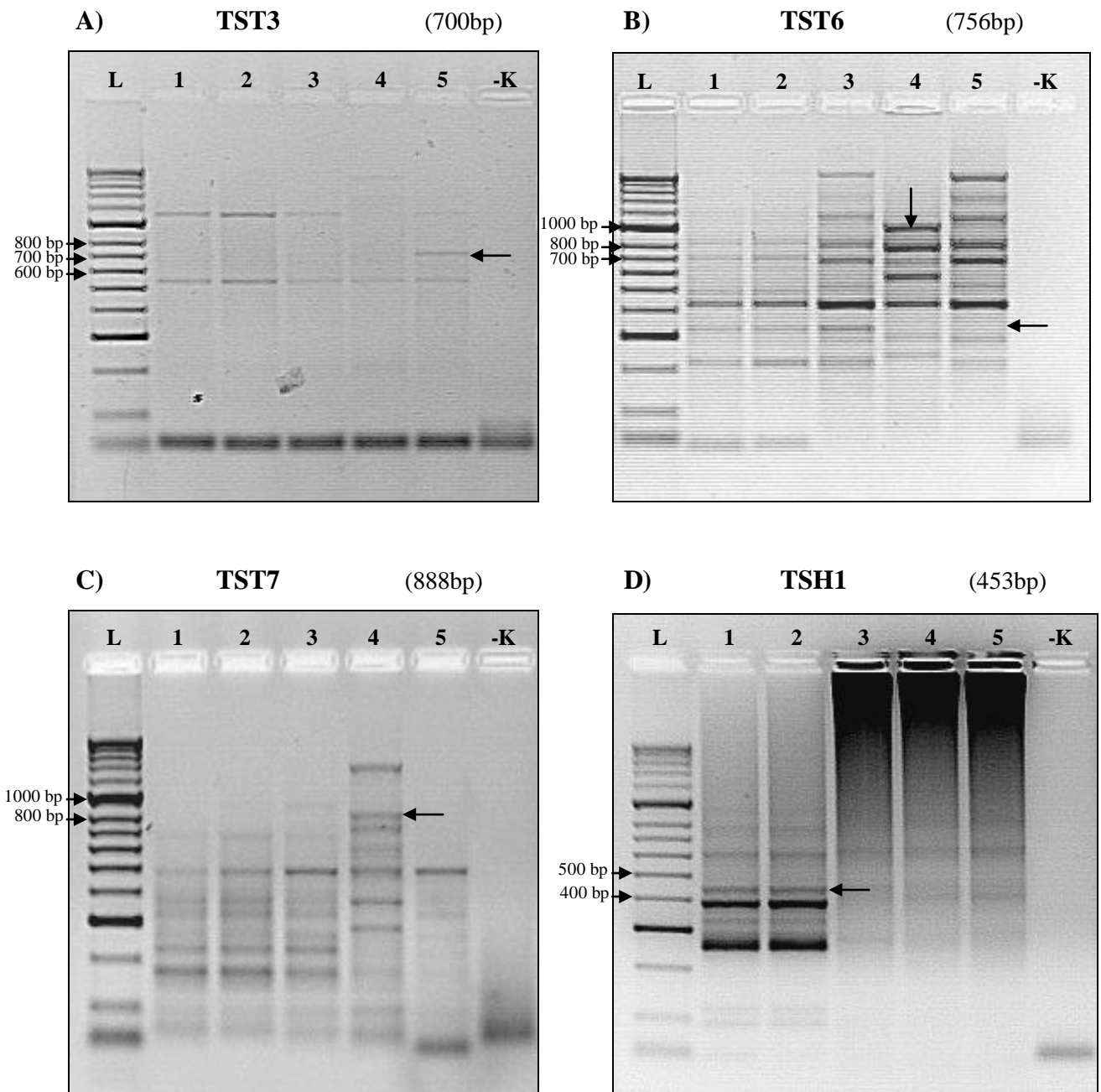
Ae. speltoides-transposon 6 (TST6) (Figuur 10B). Die onvolledig geoptimeerde PKR reaksie het steeds verskeie produk-groottes geamplifiseer, waaronder 'n band van die voorgestelde grootte soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program. Hoewel daar polimorfisme waargeneem is, kon geen van die bande uitsluitlik met die *Ae. speltoides* chromosom verbind word nie. Een band (> 300bp) is moontlik koring-spesifiek en kom moontlik voor in die chromosom 3AS-streek wat in die S13 translokasie verplaas is, aangesien dit verdwyn in laan 18. Die band kan moontlik ook as 'n negatiewe merker gebruik word.

Die *Ae. speltoides*-transposon 7 (TST7) inleiers amplifiseer talle loci (Figuur 10C). Hoewel daar oënskynlik unieke bande in *Ae. speltoides* geamplifiseer is, is hierdie produkte nie ook in die S13 translokasie geamplifiseer nie. Dit wil daarop dui dat die betrokke *Ae. speltoides*-spesifieke loci buite die getranslokeerde streek val en dus nie nuttig is vir kartering nie.

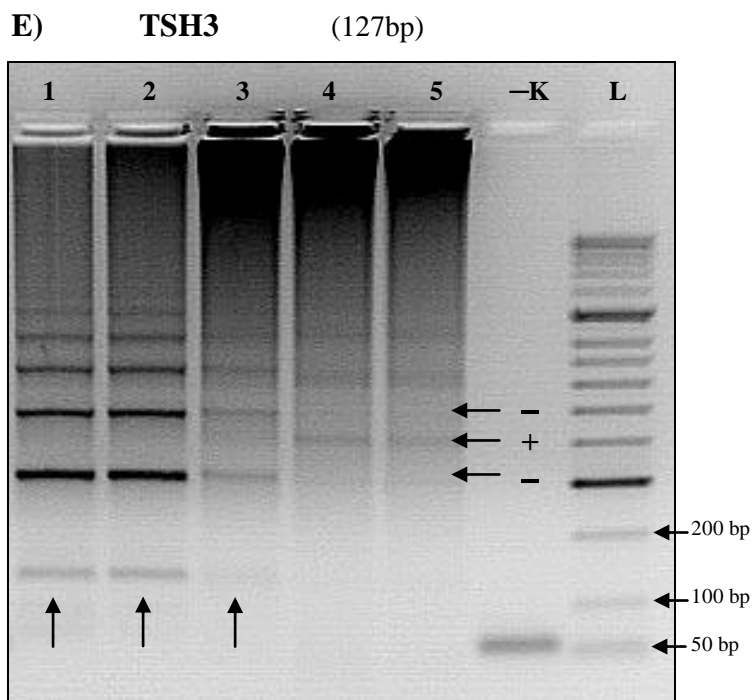
Die *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 1 (TSH1) PKR kon nie volledig geoptimeer word nie (Figuur 10D). Daar kan wel 'n band van ongeveer die regte fragment-grootte

(453 bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program, waargeneem word. Die band word egter in die negatiewe monsters naamlik: CS en CS-S waargeneem en glad nie in die *Ae. speltoides*-monster soos verwag nie. Die sogenaamde *Ae. speltoides*-spesifieke-herhalende volgorde blyk dus om nie spesifiek vir *Ae. speltoides* te wees nie. Daar is ook nie-spesifieke amplifikasie, waarvan die bande 'n sterker intensiteit (hoër amplifikasie konsentrasie) as die verlangde band het. Daar kan ook smere wat in die W84-17, *Ae. speltoides* en S13 translokasie lane voorkom, waargeneem word. 'n Moontlike verklaring vir die smere kon dalk 'n te hoë konsentrasie van DNS in die PKR-reaksiemengsel wees, maar daar was nog geen merkbare verskil in die intensiteit van die smere nadat die DNS konsentrasie met die helfte verminder is nie.

Die *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 3 (TSH3) reaksie kon nie volledig geoptimeer word nie (Figuur 10E). Daar kan wel 'n band van ongeveer die regte fragment-grootte (127 bp) soos bepaal deur die IDT-inleier-ontwerp-program, waargeneem word. Die band word egter in die negatiewe monsters naamlik: CS en CS-S waargeneem en glad nie in die *Ae. speltoides*-monster soos verwag nie. Die sogenaamde *Ae. speltoides*-spesifieke-herhalende volgorde was dus ook nie spesifiek vir *Ae. speltoides* nie. Daar was ook nie-spesifieke amplifikasie, waarvan die bande 'n sterker intensiteit (hoër amplifikasie konsentrasie) as die verlangde band gehad het. Daar het ook smere voor in die W84-17, *Ae. speltoides* en S13 translokasie lane voorgekom wat op te hoë DNS konsentrasie in die PKR-reaksiemengsel kon dui, maar daar was nog geen merkbare verskil in die intensiteit van die smere nadat die DNS met die helfte verminder is nie. Daar kan wel twee bande van ongeveer 300 en 500bp in die CS, CS-S en W84-17 lane waargeneem word wat as potensiële negatiewe merkers vir *Ae. speltoides* en translokasie S13 sou kon dien. Daar kan ook 'n band van 'n lae intensiteit in die *Ae. speltoides* en die S13 translokasie lane waargeneem word wat nie in die koringgenoom lane voorkom nie. Hierdie band kan as potensiële positiewe merker vir die spesie-genoom en translokasie dien. Hierdie produkte sal verder ontwikkel moet word voordat dit as merkers beskou kan word.



Figuur 10: Agarose foto's van die PKR-produkte van vyf *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes. (A) TST3, *Ae. speltoides*-transposon 3; (B) TST6, *Ae. speltoides*-transposon 6; (C) TST7, *Ae. speltoides*-transposon 7; (D) TSH1, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 1. Kontrole-paneel om te toets vir *Ae. speltoides*-spesifieke amplifikasie: (1) CS; (2) CS-S; (3) W84-17; (4) *Ae. speltoides*; (5) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, Bioline); -K – negatiewe kontrole (water).



Figuur 10: Vervolg:

(E) TSH3, *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 3. Controle-paneel om te toets vir *Ae. speltoides*-spesifieke amplifikasie: (1) CS; (2) CS-S; (3) W84-17; (4) *Ae. speltoides*; (5) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); -K – negatiewe kontrole (water).

3.5.2. Evaluering van sekere van die nuut-geïdentifiseerde *Ae. speltoides* spesifieke en koring-spesifieke volgorde-inleierstelle om te onderskei tussen S13 rekombinante

Die merker-soektog (afdeling 3.5.1) wat gebaseer was op *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes het verskeie potensieel-nuttige positiewe en negatiewe merkers vir die S13 translokasie opgelewer. Hieronder was fragmente wat gegeneer is deur inleierstelle *Ae. speltoides*-transposon 8 (TST8) (Figuur 9E); *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde 1 (TSS1) (Figuur 9K); inleierstel *Ae. speltoides*-transposon 6 (TST6) (Figuur 10B) en *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 3 (TSH3) (Figuur 10E).

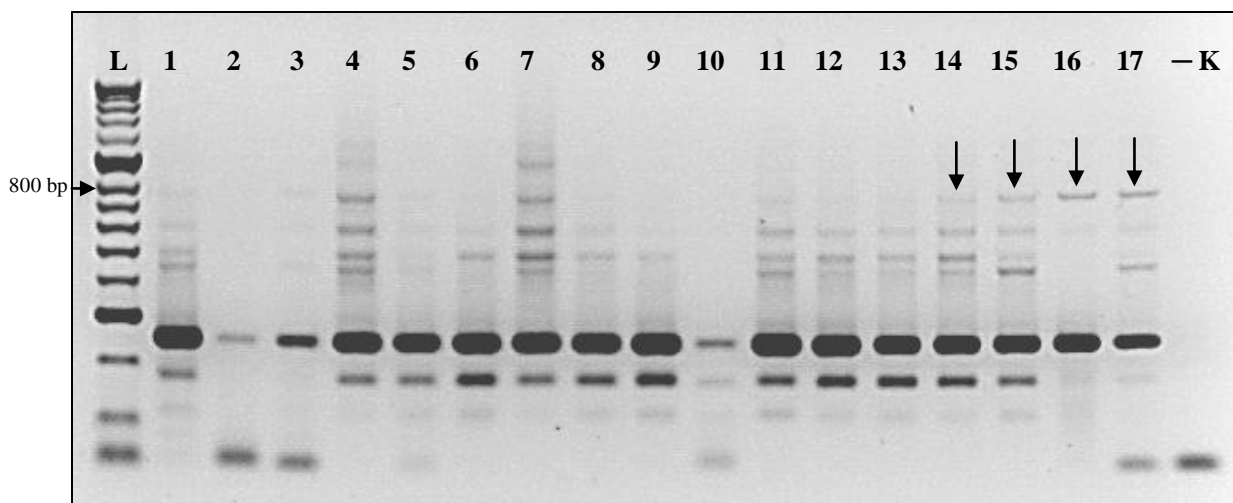
Daar is ook drie verskillende SCAR-merkers spesifiek vir die S13 translokasie ontwikkel deur Eksteen (2008).

Beide hierdie groepe van potensieële merkers is vervolgens gebruik om fragmente in al die rekombinante te amplifiseer en dit te ontleed.

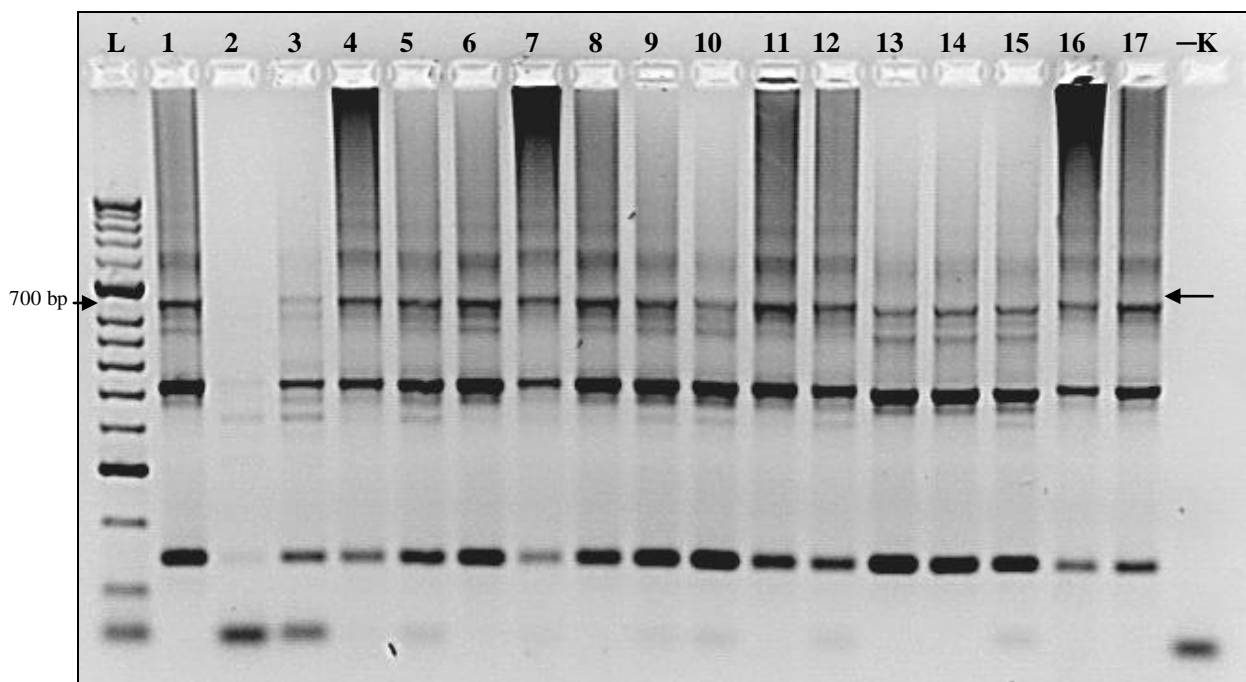
3.5.2.1. *Aegilops speltoides*-spesifieke volgordes as merkers

Die *Ae. speltoides*-transposon 8 (TST8) (Figuur 9E) inleierstel het 'n minder prominente produk met grootte ongeveer 800bp (met die pyl aangedui) wat geblyk het om *Ae. speltoides* spesifiek te wees, geamplifiseer. Al die groep A rekombinante (04M127-1, -2, -3, -4, -7, -11 en -12) sowel as die kontrolepaneel is met hierdie inleierstel geamplifiseer (Figuur 11). Daar is verwag dat die 800bp produk sou amplifiseer in die rekombinante vorms sowel as die *Ae. speltoides* en S13 translokasie kontroles. Soos dit blyk uit Figuur 11 het hierdie fragment egter ook in die koringgenome geamplifiseer (aangedui in lane 14 en 15) en is dit dus nie *Ae. speltoides*-spesifiek nie.

Die *Ae. speltoides*-spesifieke volgorde 1 (TSS1) (Figuur 9K) inleierstel het 'n koring-spesifieke amplifikasie-produk (~ 750bp) opgelewer wat moontlik as negatiewe merker gebruik sou kon word. Die groep A rekombinante en kontrolepaneel is met hierdie inleierstel geamplifiseer. Die resultate wat in Figuur 12 opgesom word, toon dat die koring-diagnostiese band baie dof is, en hoewel dit onderskei tussen koring en *Ae. speltoides* chromatien, kan dit nie altyd met sekerheid gediagnoseer word nie. Die



Figuur 11: Agarose jelfoto van amplificatieproducte gegenereerd met die *Ae. speltoides*-transposon 8 (TST8) inleierstel. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-7; (7) 04M127-11; (8) 04M127-12; (9) 04M127-3A-2 (1); (10) 04M127-3A-2 (2); (11) 04M127-3A-2 (3); (12) 04M127-3A-2 (4). Controle-paneel: (13) CS; (14) CS-S; (15) W84-17; (16) *Ae. speltoides*; (17) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); -K – negatieve controle (water).



Figuur 12: Agarose jelfoto van amplificatieproducte gegenereerd met die *Ae. speltoides*-specifieke volgorde 1 (TSS1) inleierstel. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-7; (7) 04M127-11; (8) 04M127-12; (9) 04M127-3A-2 (1); (10) 04M127-3A-2 (2); (11) 04M127-3A-2 (3); (12) 04M127-3A-2 (4). Controle-paneel: (13) CS; (14) CS-S; (15) W84-17; (16) *Ae. speltoides*; (17) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); -K – negatieve controle (water).

merker sal dus lae herhaalbaarheid hê. Die merker sou wel verbeter kon word deur die produk te klonere, die volgorde te bepaal en nuwe SCAR-inleiers hiervoor te ontwerp.

Die *Ae. speltoides*-transposon 6 (TST6) (Figuur 10B) inleierstel het verskeie produkgroottes geamplifiseer, waaronder 'n band > 300bp wat moontlik koring-spesifiek is, aangesien dit nie in *Ae. speltoides* of die S13 translokasie geamplifiseer het nie. Hierdie band kon moontlik ook as 'n negatiewe merker vir die S13 translokasie gebruik word. Die groep A rekombinante en kontroles is met hierdie inleierstel geamplifiseer (Figuur 13). Dié inleierstel kon nie volledig geoptimeer word nie en het swak geamplifiseer. Dit sal duidelik ook 'n swak herhaalbare merker daarstel. Indien die merkerfragment wel gebruik word, sou dit ook nodig wees om dit eers na 'n SCAR-merker om te skakel.

Skygbaar polimorfiese bande (twee koring-spesifiek en een *Ae. speltoides*-spesifiek) wat met die ontwerpte *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 3 (TSH3) inleierstel geamplifiseer is (Figuur 10E), was nie polimorfies toe dit gebruik is om die bande in die groep A rekombinante en kontroles te amplifiseer nie (Figuur 14). Aldrie die produkte het in die hele kontrole paneel geamplifiseer (Figuur 14) en was dus nie nuttige merkers nie.

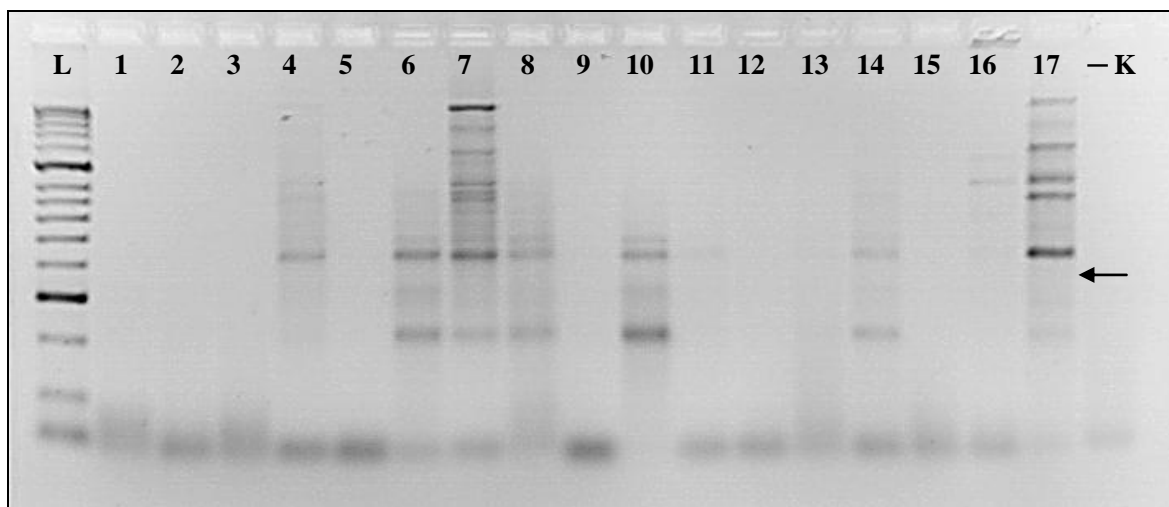
In iedere geval is verskeie pogings aangewend om die PKR van elke inleierstel te optimeer deur die DNS, inleierstel, MgCl₂, sowel as die dNTP konsentrasies asook die smeltingstemperatuur van die inleierstel te wysig, maar die poging tot PKR optimisering was onsuksesvol.

Geeneen van die potensiële merkers wat gegenereer is met gebruik van *Ae. speltoides*-spesifieke DNS-volgorde inligting was dus geskik vir grootskaalse sifting om nuwe rekombinante te probeer opspoor nie.

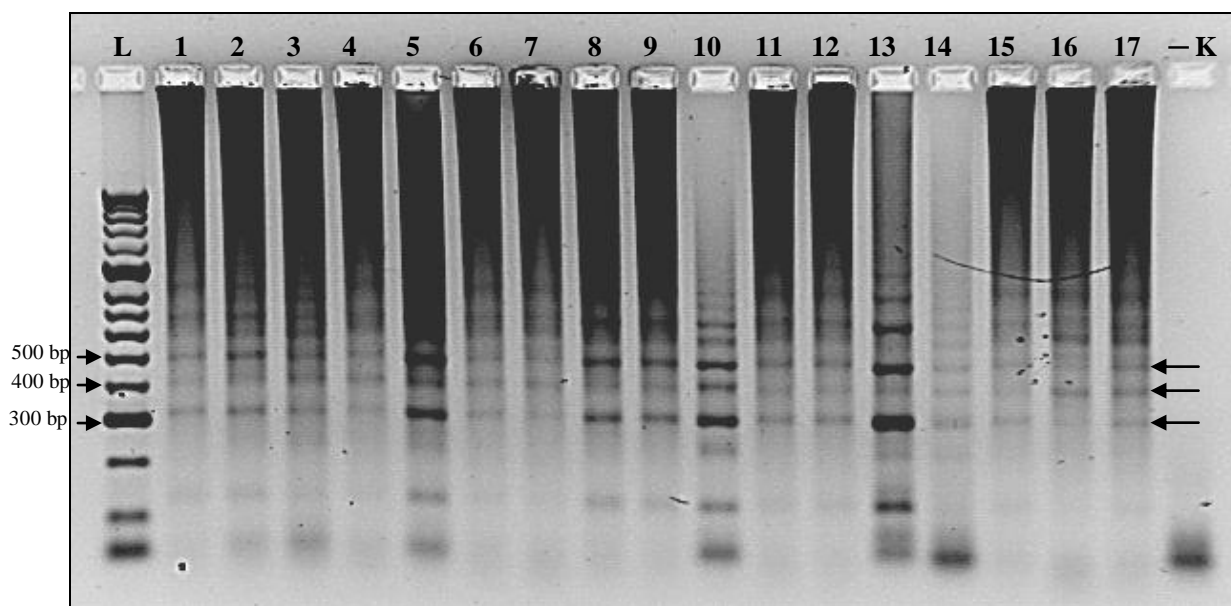
Al die *Ae. speltoides* spesifieke volgordes wat hier vir inleierontwerp gebruik is, is vooraf op die NCBI webtuiste teen die *T. aestivum* genoom ge-“BLAST” (homologiesoektog geloods) met die basiese ‘nucleotide blast’ of te wel ‘megablast’ wat soek vir hoogs ooreenstemmende volgordes, maar geen merkbare ooreenkomste is gevind nie. Daarom was dit ietwat onverwags dat amplifikasie met amper al die ontwerpte

inleierstelle in die koring- en spesie-genome sowel as die translokasie plaasgevind het. Al die transposon volgordes (wat klas 1 en 2 elemente insluit) wat gebruik is, is geïdentifiseer in studies wat die evolusie van transposons in *Ae. speltoides* ondersoek het (Matsuoka & Tsunewaki, 1996; Muniz, *et al.*, 2001; Raskina, *et al.*, 2002; Langdon, *et al.*, 2003; Raskina, *et al.*, 2004; Belyayev, *et al.*, 2005; Altinkut, *et al.*, 2006; Sabot, *et al.*, 2006). Hierdie volgordes is met behulp van degeneratiewe inleiers en die gebruik van genomiese DNS van *Ae. speltoides* gegeneer. Die degeneratiewe inleiers amplifiseer gekonserveerde areas van transposons wat reeds in *T. aestivum* geïdentifiseer is. Al die volgordes is dus afkomstig van gekonserveerde domeine en toon dus 'n hoë graad van ooreenkoms met die volgordes van *T. aestivum*. Dus, hoewel die *Ae. speltoides* transposon volgordes in sekere unieke aspekte verskil van die in *T. aestivum* is daar waarskynlik in die geheel 'n hoë graad van ooreenkoms tussen transposons van die twee spesies.

Met die ondersoek van die *Ae. speltoides* spesifieke herhalende volgordes is daar ook gevind dat die volgordes 'n hoë graad van ooreenkoms met *T. aestivum* toon. Volgens Devos en Gale (1997) is daar homoloë volgordes in die subtelomeriese areas van die verskillende grasspesies. Dit maak dan amplifikasie met die ontwerpte inleierstelle moontlik in die koring- sowel as spesie-genome. Met inleierstelle TSH1 en TSH3 het amplifikasie in die koringgenome (CS en CS-S) plaasgevind, maar nie in *Ae. speltoides* of translokasie S13 nie, dit steeds onbekend presies waarom hierdie resultate verkry is, aangesien hierdié volgordes as *Ae. speltoides* spesifiek gepubliseer is. Indien die inleiers ontwerp is op grond van volgordes wat ook algemeen in koring voorkom is amplifikasie moontlik in die koringgenome, maar die gebrek aan amplifikasie in die spesie-genoom is steeds 'n raaisel.



Figuur 13: Agarose jelfoto van die *Ae. speltoides*-transposon 6 (TST6) koring-spesifieke amplifikasieprodukt. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) 04M127-7; (7) 04M127-11; (8) 04M127-12; (9) 04M127-3A-2 (1); (10) 04M127-3A-2 (2); (11) 04M127-3A-2 (3); (12) 04M127-3A-2 (4). Kontrol-paneel: (13) CS; (14) CS-S; (15) W84-17; (16) *Ae. speltoides*; (17) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, Bioline); -K – negatiewe kontrole (water).

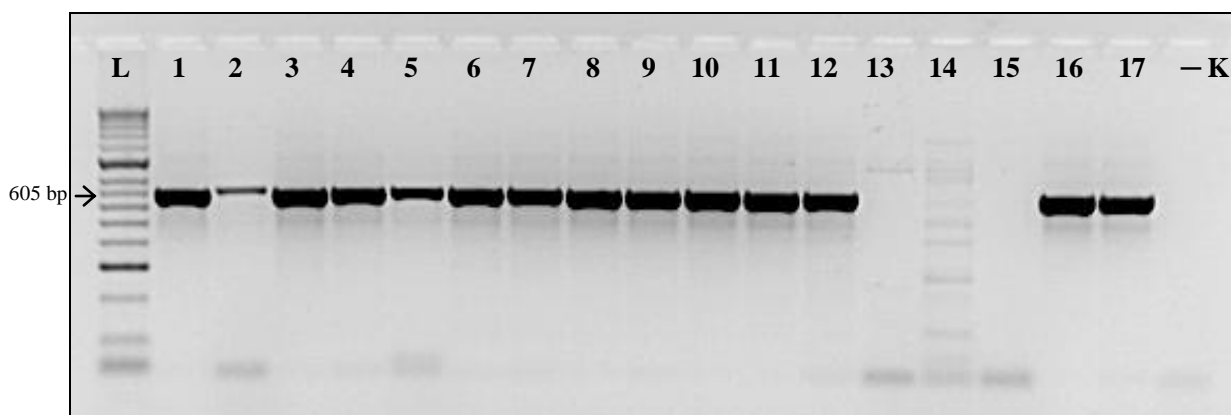


Figuur 14: Agarose jelfoto van die amplifikasieprodukte gegenereer met die *Ae. speltoides*-herhalende volgorde 3 (TSH3) inleierstel. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) 04M127-7; (7) 04M127-11; (8) 04M127-12; (9) 04M127-3A-2 (1); (10) 04M127-3A-2 (2); (11) 04M127-3A-2 (3); (12) 04M127-3A-2 (4). Kontrol-paneel: (13) CS; (14) CS-S; (15) W84-17; (16) *Ae. speltoides*; (17) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, Bioline); -K – negatiewe kontrole (water).

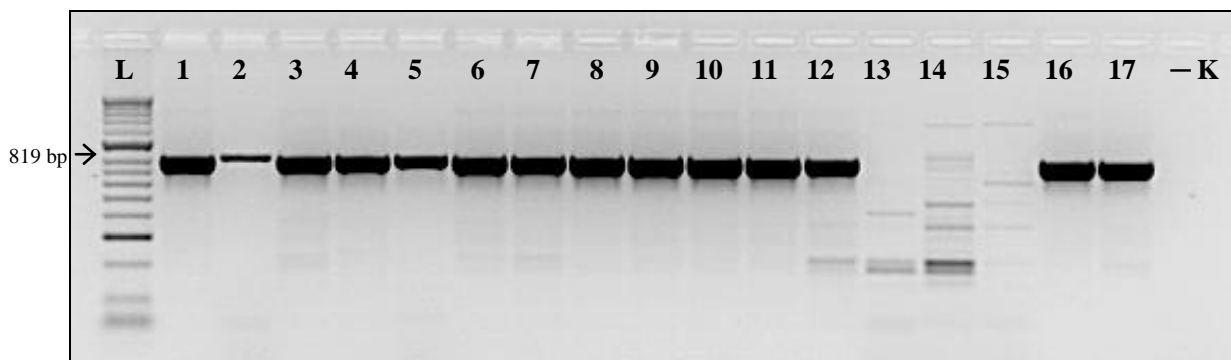
3.5.2.2. S13 translokasie-spesifieke SCAR-merkers

Die gebruik van *Ae. speltoides*-spesifieke volgordes en transposons as basis vir die identifikasie van merkers vir *Ae. speltoides* en S13 spesifiek was onsuksesvol. Dit was egter steeds nodig om verdere merkers te vind wat gebruik kon word om tussen potensiële rekombinante te onderskei. Die drie SCAR-merkers, spesifiek vir die S13 translokasie, wat deur Eksteen (2008) ontwikkel is, is vervolgens geëvalueer. Dit is onbekend waar op die translokasie die betrokke loci geleë is, maar hulle deel dieselfde voorwaartse en terugwaartse inleiers, byvoorbeeld SCAR1 en SCAR2 het dieselfde voorwaartse inleier, maar verskillende terugwaartse inleiers terwyl SCAR2 en SCAR3 dieselfde terugwaartse inleier, maar verskillende voorwaartse inleiers het, sodat naby-geleë loci geamplifiseer word. Die SCAR-merkers is genommer van 1 tot 3 vir eenvoud en amplifiseer produkgroottes van onderskeidelik 605, 819 en 730bp in *Ae. speltoides* en die S13 translokasie.

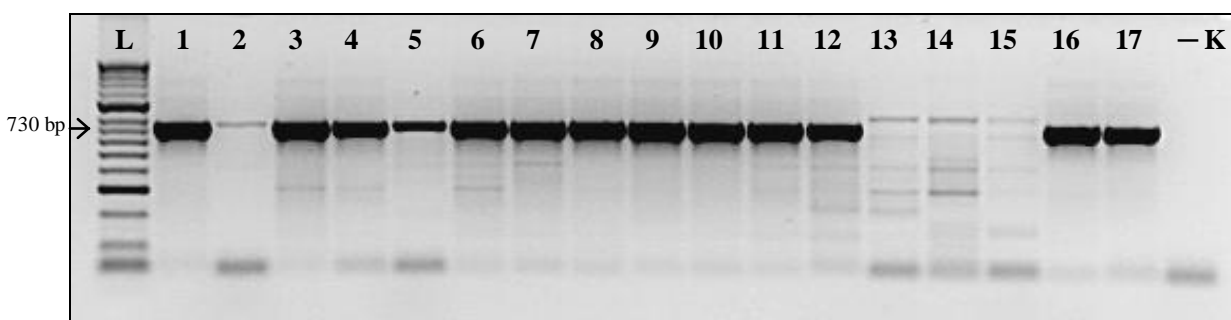
Al die groep A rekombinante plus kontroles is met die drie SCAR-merkers geamplifiseer (Figure 15, 16 en 17) en die diagnostiese bande was in al drie gevalle in al die translokasies teenwoordig. Dit is nie totaal onverwags wanneer daar na die rowwe fisiese kaarte van die rekombinante gekyk word nie (Figure 5 en 8). Dit is wel onbekend presies hoe groot die areas van oorblywende *Ae. speltoides* chromosomien in die rekombinante is, maar duidelik word die grootste gedeeltes van 3A steeds deur vreemde chromosomien beslaan. Die merkers val dus in 'n area van die translokasie wat nog nie deur die rekombinasie in enige van die rekombinante geraak is nie. Die merkers verskaf voorts bevestiging dat al die rekombinante wat tot dusver bestudeer is wel die S13 translokasie en gemodifiseerde vorms daarvan besit. Tweedens, is dit dominante merkers wat baie nuttig gebruik sal kan word in pogings om verdere rekombinante te selekteer en te karakteriseer.



Figuur 15: Agarose jelfoto van die SCAR 1 diagnostiese amplifikasieproduk wat spesifiek is vir die S13 translokasie. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-7; (7) 04M127-11; (8) 04M127-12; (9) 04M127-3A-2 (1); (10) 04M127-3A-2 (2); (11) 04M127-3A-2 (3); (12) 04M127-3A-2 (4). Kontrol-paneel: (13) CS; (14) CS-S; (15) W84-17; (16) *Ae. speltoides*; (17) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, Bioline); -K – negatiewe kontrole (water).



Figuur 16: Agarose jelfoto van die SCAR 2 diagnostiese amplifikasieproduk wat spesifiek is vir die S13 translokasie. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-7; (7) 04M127-11; (8) 04M127-12; (9) 04M127-3A-2 (1); (10) 04M127-3A-2 (2); (11) 04M127-3A-2 (3); (12) 04M127-3A-2 (4). Kontrol-paneel: (13) CS; (14) CS-S; (15) W84-17; (16) *Ae. speltoides*; (17) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, Bioline); -K – negatiewe kontrole (water).



Figuur 17: Agarose jelfoto van die SCAR 3 diagnostiese amplifikasieproduk wat spesifiek is vir die S13 translokasie. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-7; (7) 04M127-11; (8) 04M127-12; (9) 04M127-3A-2 (1); (10) 04M127-3A-2 (2); (11) 04M127-3A-2 (3); (12) 04M127-3A-2 (4). Kontrol-paneel: (13) CS; (14) CS-S; (15) W84-17; (16) *Ae. speltoides*; (17) Volledige S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, Bioline); -K – negatiewe kontrole (water).

3.6. Poging om rekombinant 3 verder te verkort

Die hoof doelwit van hierdie studie was om die potensieel nuttigste S13 rekombinant wat nog die roes-weerstandsgene dra te identifiseer en daarna te poog om dit nog verder te verkort. Daar is gehoop dat dit moontlik sou wees om in die proses van die geassosieerde *Gc*-gene ontslae te raak. *Gc*-gene het nadelige effekte op plant agrotipe, vrugbaarheid en saadgehalte en het dit tot nou toe onmoontlik gemaak om die weerstand kommersieel te benut. In 'n poging om verdere verkorting teweeg te bring, is rekombinant 3 met W84-17 gekruis en is die F₁ met CSN3AT3D getoetskruis om hemisigotiese nageslag te bekom vir sifting met dominante sowel as resessiewe merkers. Daar is gehoop dat daar in die F₁ vroulike ouer oorkruising (in die *Xbarc19* gebied) sou geskied tussen die gerekombineerde translokasie chromosoom en die normale chromosoom 3A. Na toetskruising sou daar dan geselekteer kon word vir rekombinante waarin die chromosoomgebiede distaal of proksimaal van *Xbarc19* deur koringchromatien vervang is. Een van die twee gerekombineerde tipes is verwag om die weerstand te besit afhangend van waar op die chromosoomarm *LrS13* geleë is.

3.6.1. Saailing blaarroesweerstand van die toetskruis F₁

Een honderd sade van die toetskruis F₁: 04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D is in vyf potte met twintig sade elk geplant. Die saailinge is met blaarroes (UVPrt8) geïnokuleer en daardie plante met die sterkste weerstandsreaksies (= ; of 1) is apart in groepe van vyf uitgeplant. Die vatbare plante (weerstandreaksies 3 tot 4) is ook in aparte potte in groepe van vyf uitgeplant. In totaal is 35 bestande en 65 vatbare plante, waarvan een doodgegaan het, uitgeplant. Die bestande plante is genommer van 100-129 en 194-198 en die vatbare plante is genommer van 130-193.

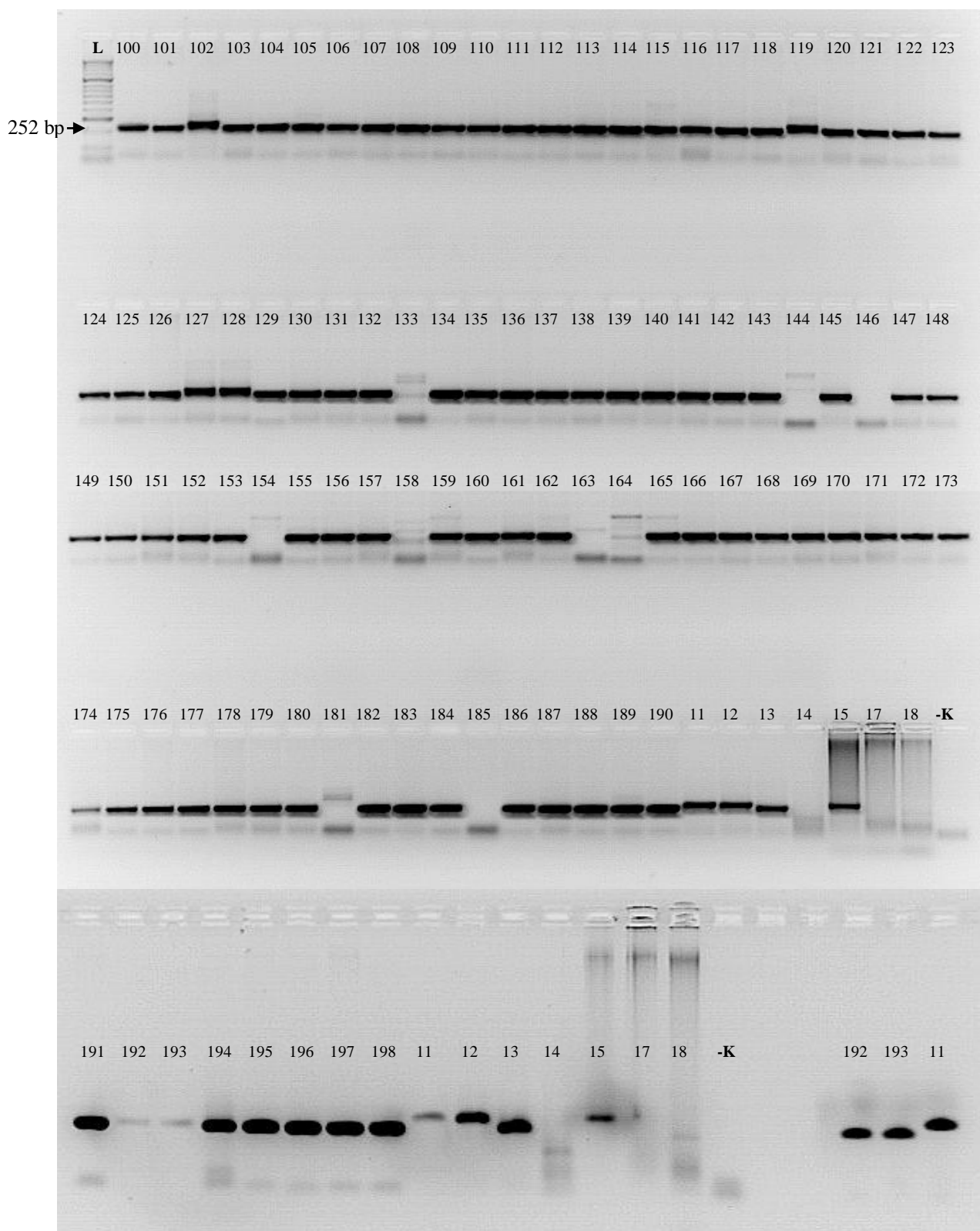
3.6.2. Merker-tipering van die toetskruis F₁

Na uitplanting is die 35 bestande sowel as die 64 vatbare plante vir die teenwoordigheid van *Xbarc57*, *Xbarc294* en *Xgwm674* getoets. *Xbarc57*, *Xbarc294* en *Xgwm674* is maklik ontleedbaar op agarose jelle en kan dus vir grootskaalse sifting gebruik word. *Xbarc57*, *Xbarc294* en *Xgwm674* is ook gekies weens hul ligging vanaf mekaar. Die merkers is vër genoeg van mekaar geleë om 'n verteenwoordigende beeld

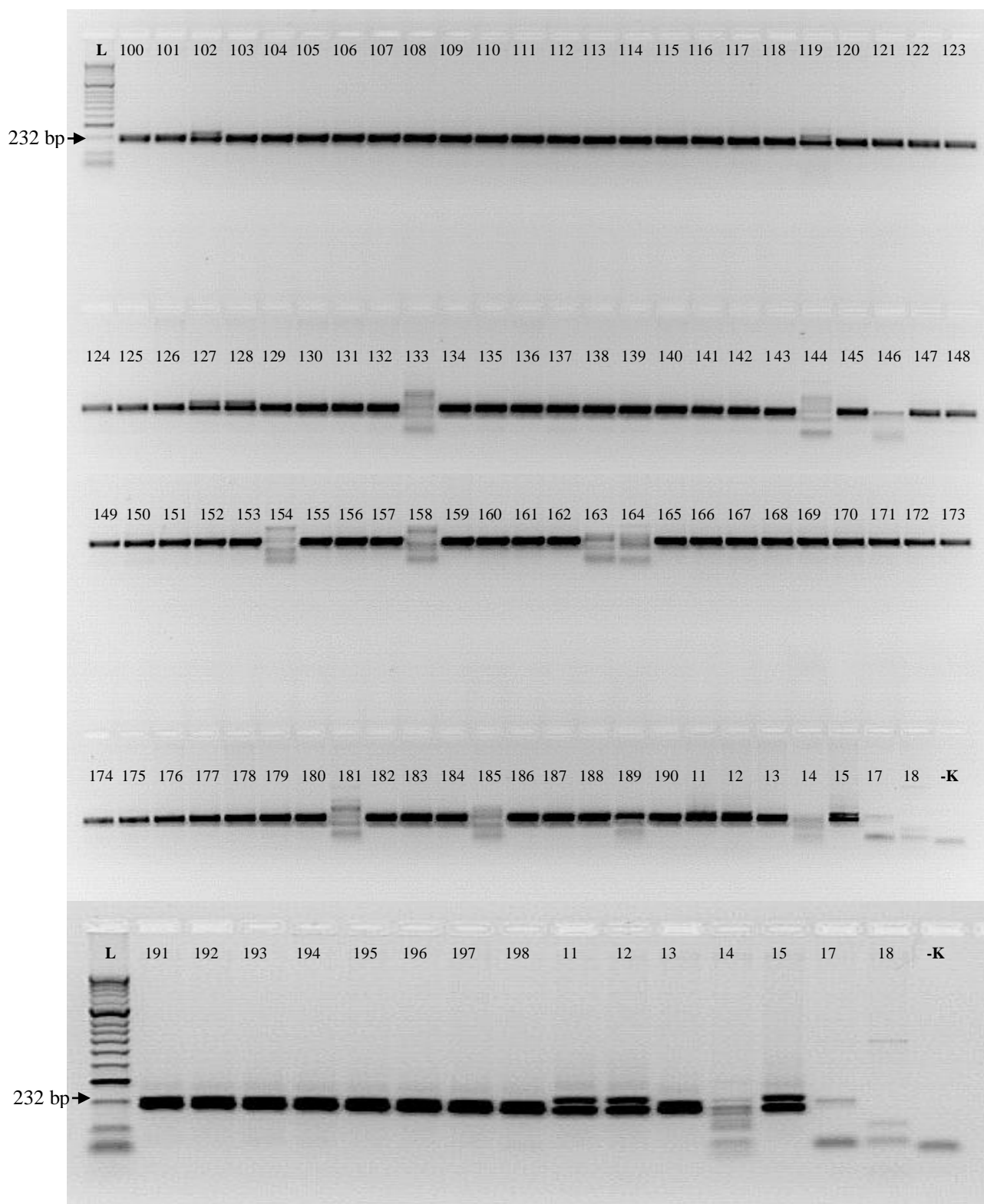
van waar die translokasie moontlik geleë mag wees, te kry. Verder is *Xbarc57* en *Xgwm674* ook gekies omdat hulle die punte (naby die telomere en sentromeer) van die kort arm van chromosoom 3A verteenwoordig. Daar kan dan 'n voorlopige beeld geskep word van watter punt (distaal of proksimaal) rekombinasie ondergaan het. Soos reeds beskryf, behoort die merkers negatief te toets in areas waar daar nog *Ae. speltoides* chromatien aangetref word en positief te toets in areas wat *T. aestivum* herwin het na rekombinasie.

Figure 18, 19 en 20 verteenwoordig die agarose jelfoto's van onderskeidelik die bestande en die vatbare plante wat vir loci *Xbarc57*, *Xbarc294* en *Xgwm674* getoets is. Die vatbare plante is vir volledigheidshalwe ook geanaliseer, maar hierdie plante is nie kommersieel bruikbaar nie, omdat hulle reeds *LrS13* verloor het.

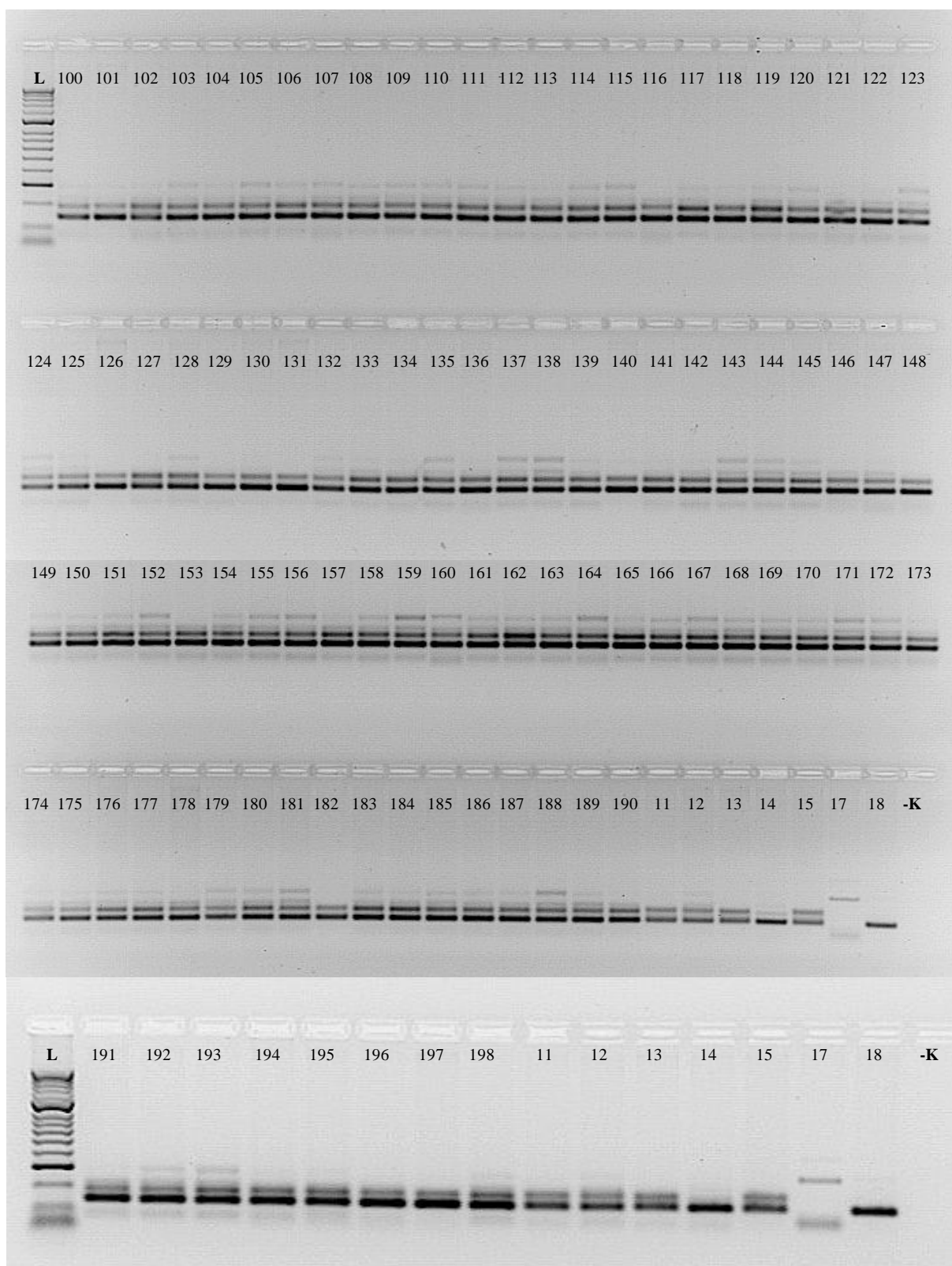
Uit die resultate wat verkry is kan daar afgelei word dat daar grootskaalse rekombinasie plaasgevind het. Al die bestande en die meerderheid (55) van die vatbare plante het positief vir al drie loci getoets. Omdat die data nie sinvolle afleidings moontlik maak het nie, was dit nodig om die volle paneel van merkers op die bestande rekombinante te toets. Nege van die 64 vatbare plante wat spesie-chromatien besit het by een of meer van die drie merkerloci wat vir sifting gebruik is, is ook met die volledige merkerpaneel getoets.



Figuur 18: Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegeneer in 'n toetskruis F_1 populasie met gebruik van die SSR-inleierstel *Xbarc57*. Plante **100-129**, **194-198** is bestand; **130-193** is vatbaar. Controle-paneel: **(11)** CS; **(12)** CS-S; **(13)** W84-17; **(14)** CSN3AT3B; **(15)** CSdT3AS; **(17)** *Ae. speltoides*; **(18)** S13 translokasie. **L** – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); **-K** – negatiewe kontrole (water).



Figuur 19: Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegeneer in 'n toetskruis F_1 populasie met gebruik van die SSR-inleierstel *Xbarc294*. Plante **100-129**, **194-198** is bestand; **130-193** is vatbaar. Kontrole-paneel: **(11)** CS; **(12)** CS-S; **(13)** W84-17; **(14)** CSN3AT3B; **(15)** CSdT3AS; **(17)** *Ae. speltoides*; **(18)** S13 translokasie. **L** – 100bp leer (HPLII, Bioline); **-K** – negatiewe kontrole (water).



Figuur 20: Agarose jelfoto van amplifikasieprodukte gegenereer in 'n toetskruis F_1 populasie met gebruik van die SSR-inleierstel *Xgwm674*. Plante **100-129**, **194-198** is bestand; **130-193** is vatbaar. Kontrole-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); -K – negatiewe kontrole (water).

3.6.3. Karakterisering van die bestande toetskruis F₁ en nege van die vatbare toetskruis F₁ met die volle merkerpaneel.

Al die bestande toetskruis F₁ (100-129, 194-198), plus nege van die vatbare plante wat geblyk het om rekombinante te wees (na voorlopige sifting vir die teenwoordigheid van *Xbarc57*, *Xbarc294* en *Xgwm674* – Figure 18 tot 20), asook die kontrole plante is met behulp van die mikrosatellietmerkers en die RFLP (*Xglk683*)-afgeleide STS-merker, soos in Tabel 2 uiteengesit, gekarakteriseer. Die tersaaklike jelfoto's word onderskeidelik in Addendum C, Figure C1-C15 (bestande plante) en Addendum D, Figure D1-D15 (vatbare plante) verskaf, terwyl die resultate in Tabel 11 saamgevat word. Na hierdie rekombinante sal voortaan as die groep B rekombinante verwys word.

Uit Tabel 11 blyk dat al die bestande plante die koringalleel herwin het by elk van die getoetste loci en dat die bestande toetskruis F₁ onderverdeel kon word in twee subgroepe. Agt van die 15 merkers produseer duidelik onderskeibare CS en W84-17 allele (Addendum C, Figure C1-C15). Subgroep 1 wat uit plante 100-101, 103-118, 120-126, 129 en 194-198 bestaan, het deurgaans die W84-17 alleel by elk van die agt loci uitgedruk. Hierteenoor het subgroep 2 wat uit plante 102, 119, 127 en 128 (grys gekleur in Tabel 11) bestaan, altyd die CS alleel i.p.v. die W84-17 alleel by die agt loci uitgedruk. Aangesien die rekombinante positief toets vir al die koring merkerloci, maar nog steeds blaarroes-bestand is, moes hulle *LrS13* behou het. Dit beteken dat daar nog klein gedeeltes van die translokasie iewers op die kort arm van chromosoom 3A moes oorgebly het. Hierdie gedeeltes val heel moontlik in die areas distaal van merker *Xbarc57* of proksimaal van merker *Xgwm674*.

Nege van die vatbare F₁ toetskruisnageslag is duidelik gerekombineer. Vyf van die plante besit 'n breekpunt tussen *Xbarc19* en *Xbarc45* (soos in die 04M127-3A translokasie). Al vyf laasgenoemde rekombinante het egter ook koringchromatien herwin in die gebied van lokus *Xgwm674* wat dui op 'n proksimale oorkruising. Vier van die plante besit 'n oorkruisingsbreekpunt tussen *Xbarc12* en *Xbarc310*.

Die data van Tabel 11 word ook diagrammaties voorgestel in Figuur 21. Daar kan twee moontlike vertolkings van die data verskaf word. (1) Indien aangeneem word dat *LrS13* distaal van *Xbarc57* op die translokasie voorkom kan 'n enkeloorkruising tussen die

twee loci die ontstaan van die bestande rekombinante verduidelik. So 'n oorkruising kan alleenlik die vatbare nageslag verklaar as daar ook 'n tweede oorkruising op die kort arm veronderstel word (tussen *Xbarc12* en *Xbarc310* of tussen *Xbarc45* en *Xgwm674*). (2) 'n Tweede moontlikheid is dat *LrS13* proksimaal van *Xgwm674* op die 3AS kort arm voorkom, of selfs op die lang arm.

In hierdie geval kan 'n enkeloorkruising tussen loci *LrS13* en *Xgwm674* weereens al die bestande rekombinante verklaar. Dit kan ook die vatbare rekombinante verklaar mits 'n tweede oorkruising tussen *Xbarc19* en *Xbarc45* of tussen *Xbarc12* en *Xbarc310* veronderstel word. Dit is waarskynliker dat *LrS13* naby die telomeer geleë moet wees. Paring en rekombinasie in koring-chromosome vind vanaf die telomeer plaas (Corredor *et al.*, 2007) en dit is algemeen bekend dat die oorkruisingsfrekwensie laer is vir loci in die omgewing van die sentromeer. Die telomere is gewoonlik ook meer geenryke areas. Volgens Corredor *et al.* (2007) ondergaan die sentromere inderdaad 'n omskakeling van nie-homoloë na homoloë assosiasies tydens meiose, maar hierdie proses word primêr deur die vorming van terminaal geïnisieerde sinapse, beheer. Die sentromeer, volgens hulle, het geen effek op metafase I chiasma vorming, in die aanwesig- of afwesigheid van *Ph1*, nie. Ten einde te bevestig dat *LrS13* wel op die kort arm voorkom sal dit nodig wees om 'n telosomiese ontleding met 'n bestande rekombinant te doen.

Ongeag wat die ligging van *LrS13* is, dui die data op 'n baie selektiewe oorlewing van gamete. In die bestande plante is al die spesie (merker-) loci altyd volledig deur koringloci vervang. Dit is onverwags omdat daar duidelik ook oorkruising op talle punte tussen *Xbarc57* en *Xgwm674* moes geskied het, waarvan die produkte duidelik nie oorleef het nie. Netso, ten opsigte van die vatbare nageslag. Elk van die nege vatbare plante het aanduiding getoon van 'n tweede oorkruising tussen *Xbarc57* en *Xgwm674*. Alhoewel net nege van die vatbare plante getipeer is, was dit interessant dat die plante altyd net een van twee tipes rekombinante was. Dit is duidelik dat 'n baie wyer reeks van rekombinante tipes geproduseer moes gewees het as dit wat waargeneem was. Die enigste moontlike verklaring vir hierdie waarnemings is gesetel in die komplekse interaksie tussen *Gc*-gene en hul wisselwerking met loci in die koringgenoom om selektiewe oorlewing van sekere gamete tot gevolg te hê.

Tabel 11: Resultate verkry na ontleding van al die bestande toetskruis F₁ (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D); nege van die oënskynlik gerekombineerde, vatbare toetskruis F₁ en die paneel van kontrole plante met een STS- en verskeie mikrosatelliet-merkers.

Plant no.	Kort arm (Distaal)													Lang arm	
														(Proksimaal)	
	<i>Xbarc</i> 57	<i>Xglk</i> 683	<i>Xbarc</i> 294	<i>Xbarc</i> 310	<i>Xbarc</i> 12	<i>Xwmc</i> 532	<i>Xgwm</i> 369	<i>Xgwm</i> 218	<i>Xgwm</i> 2	<i>Xgwm</i> 5	<i>Xbarc</i> 45	<i>Xbarc</i> 19	<i>Xgwm</i> 674	<i>Xgwm</i> 391	<i>Xbarc</i> 1021
100 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
101 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
102 (bestand)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
103 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
104 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
105 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
106 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
107 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
108 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
109 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
110 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
111 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
112 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
113 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
114 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
115 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
116 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
117 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
118 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
119 (bestand)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
121 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
122 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
123 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
124 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
125 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+

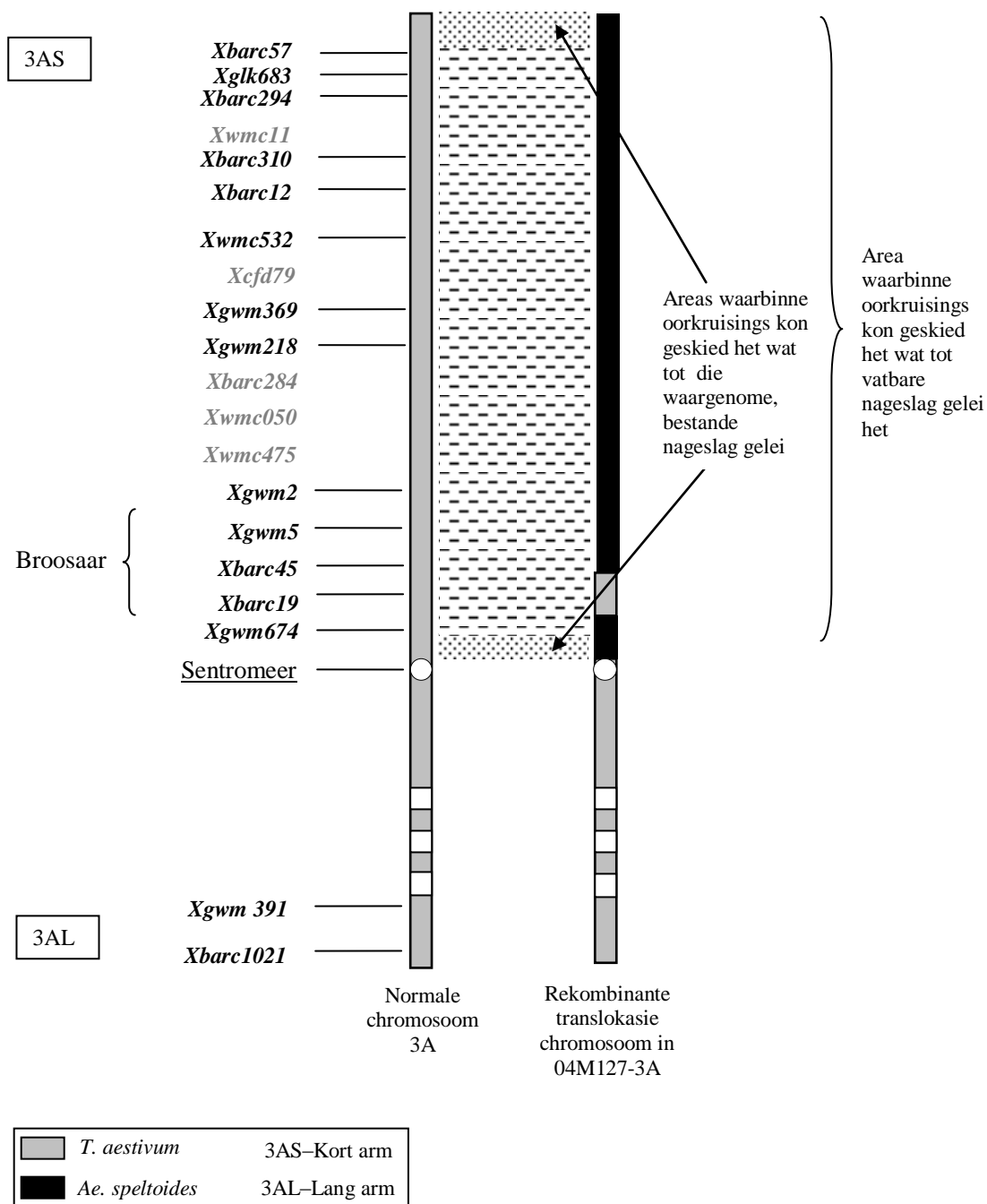
Sentroneer

Tabel 11: vervolg.

126 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
127 (bestand)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
128 (bestand)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
129 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
194 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
195 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
196 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
197 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
198 (bestand)	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
133 (vatbaar)	-	-	-	-	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
144 (vatbaar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	+*	+	+
146 (vatbaar)	-	-	-	-	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
154 (vatbaar)	-	-	-	-	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
158 (vatbaar)	-	-	-	-	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
163 (vatbaar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	+*	+	+
164 (vatbaar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	+*	+	+
181 (vatbaar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	+*	+	+
185 (vatbaar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	+*	+	+
CS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CS-S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W84-17	+*	+	+*	+*	+*	+*	+*	+	+*	+	+	+*	+*	+	+
CSN3AT3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSDT3AS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CSDT3AL	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////	////
<i>Ae. speltoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S13 translokasie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Rek 04M127-3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	-	+	+

Sentromeer

+, merkeralleel 1 aanwesig;
 -, merkeralleel 1 afwesig;
 +*, merkeralleel 2 aanwesig



Figuur 21: Diagrammatiese voorstelling van die rekombinasiegebeure wat moontlik aanleiding gegee het tot die bestande en vatbare derivate uit die toetskruising: Rek 04M127-3A/W84-17//CSN3AT3B,D (Tabel 11).

Dieselfde skynbare selektiewe oorlewing van gerekombineerde produkte is in die eerste gedeelte van die studie met die groep A rekombinante waargeneem. Van die sewe waarskynlike S13 (groep A) rekombinante het drie 'n soortgelyke interkalêre dubbeloorkruising ondergaan. In die proses is 'n betreklike klein hoeveelheid chromatien uitgeruil. Dit sou egter verwag word dat daar veel meer enkeloorkruisings moes geskied het waartydens groot gedeeltes van die *Ae. speltoides* chromatien verplaas is. Sodanige produkte is nooit herwin nie, wat weereens dui op komplekse interaksie van gedeeltes van die vreemde chromatien, beide onderling en met gedeeltes van die koringgenoom.

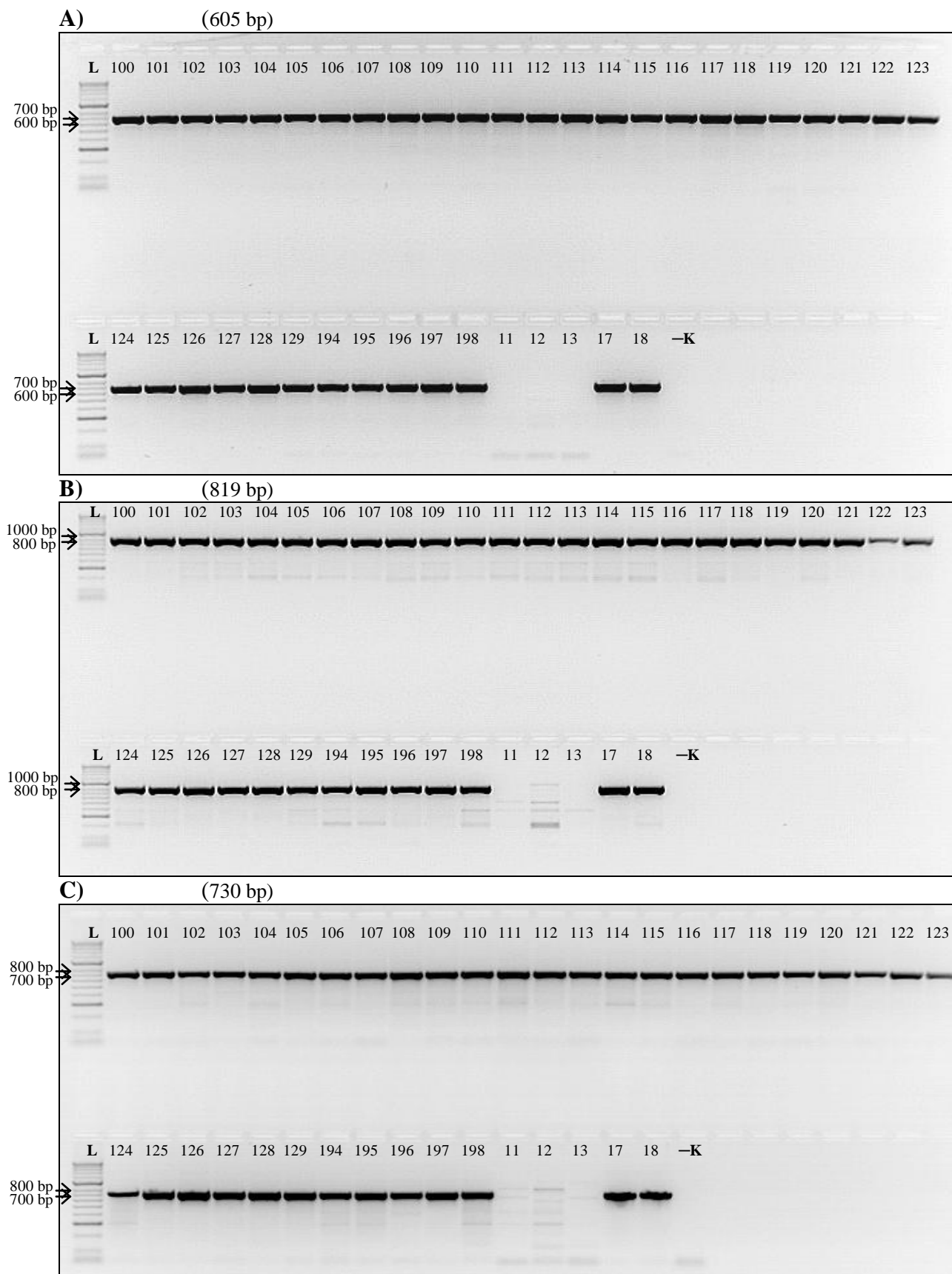
'n Verdere interessante verskynsel was die baie hoë (uitsluitlike) voorkoms van bestande, gerekombineerde produkte in die laaste rekombinasie-eksperiment. Dit is bekend dat die *Ae. speltoides* genoom naby-verwant is aan die koringgenoom (Feldman, 1987) en dit is nie onmoontlik dat daar homologie of naby-homologie bestaan vir die bestudeerde areas nie. In 'n studie deur Raskina *et al.* (2002) is gevind dat die S-genoom van *Ae. speltoides* sterk ooreenkoms met die sentromeriese en perisentromeriese areas van die A-genoom toon. Dit tesame met voorkeur-oorlewing van sekere gameetprodukte kan die waargenome data verklaar. Die volledige S13 translokasie het altyd nageslag met baie swak fenotipes, lae saadset en verrimpelde sade geproduseer (Marais 2007, persoonlike mededeling). In die *ph1b*-bemiddelde paringsinduksie-eksperiment wat die sewe groep A rekombinante opgelewer het, was daar slegs 'n baie lae proporsie van plante met effens beter fenotipe en beter saadgehalte. Dit is dus moontlik dat die skynbare lae voorkoms van rekombinasie in die verlede, nie soseer die gevolg was van min homologie nie, maar eerder die gevolg kon wees van ongunstige *Gc*-geen-interaksies wat sekere gameetgenotipes geëlimineer het.

3.6.4. Bevestiging dat die 35 (groep B) rekombinante wat uit die kruising 04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D geselekteer is, nog steeds *Ae. speltoides* chromatien besit

Al die mikrosatellietmerkers sowel as die RFLP-merker het positief getoets vir die *T. aestivum* allele in die 35 bestande rekombinante wat daarop dui dat 'n baie groot gedeelte van die translokasie verloor is. Die feit dat die plante almal bestand was dui wel op die teenwoordigheid van *LrS13*, maar verskaf nie konkrete bewys van die

teenwoordigheid van *Ae. speltoides* chromatien nie. Daar is toe besluit om al die bestande plante met die SCAR-merkers wat spesifiek vir translokasie S13 ontwikkel is (Eksteen, 2008), te toets ingeval die loci wel digby die geen geleë is. Die ontledings is gedoen soos uiteengesit in afdeling 2.13 (Tabelle 6 en 7) en die data word weergegee in Figuur 22. Al die bestande plante het positief getoets vir al drie SCAR-merkers. Die drie SCAR-inleiers amplifiseer waarskynlik dieselfde lokus aangesien SCAR 1 en SCAR 2 dieselfde voorwaartse inleier deel terwyl SCAR 2 en SCAR 3 dieselfde terugwaartse inleier deel. Die data dui daarop dat die SCAR-loci betreklik naby aan *LrS13* geleë moet wees en buite die area deur die mikrosatelliet merkerpaneel gedek word, val.

Die amplifikasie van al drie merkers bewys dat die bestande toetskruis F₁ wel nog 'n gedeelte van die translokasie en daarmee saam *LrS13* besit. Die rekombinante groep B plante kan nou ongetwyfeld as die kortste, S13 translokasie rekombinante beskou word. Figuur 23 is 'n foto van sommige van die bestande, rekombinante groep B plante. Die plante het geen uiterlike tekens van hibriednekrose getoon nie; het oënskynlik normale vrugbaarheid en het goed-ge vulde sade geproduseer.



Figuur 22: Agarose jelfoto's van die amplifikasieprofiel gegeneer met drie SCAR-inleierpare (**A**-SCAR 1; **B**-SCAR 2; **C**-SCAR 3) spesifiek vir S13. Die genotipes wat getoets is, sluit in: 35 bestande toetskruis F₁ plante (rekombinante groep B) (**100-129**, **194-198**) en 'n kontrole-paneel (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie. **L** – 100bp leer (HPLII, Bioline); **-K** – negatiewe kontrole (water).



Figuur 23: (A) Foto van sommige van die bestande, rekombinante groep B plante. (B) Aar ontwikkeling en vrugbaarheid van die plante was oënskynlik normaal.

3.7. Die S13-geassosieerde streeproes- (*YrS13*) en stamroes- (*SrS13*) weerstandsgene

Die groep A rekombinant, 04M127-3, is deur Marais (2008; persoonlike mededeling) geëvalueer vir saailing streeproesweerstand en dit het geblyk dat hierdie rekombinant *YrS13* deur oorkruising verloor het. Rekombinant 04M127-3 is ook gedurende die 2008 groeiseisoen op Welgevallen proefplaas geplant. Na natuurlike infeksie met stamroes het geblyk dat die rekombinant ook die *SrS13* lokus verloor het (Marais 2008; persoonlike mededeling). Hierdie twee gene mag dus in die omgewing van *Xbarc19* in die S13 translokasie voorkom.

3.8. Gebruik van DArT-merkers om die groep B rekombinante verder te tipeer

Die resultate van die DArT-ontleding gedoen op die bestande groep B rekombinante en kontroles is van die *Triticarte* genotiperingsdiens ontvang. Die lyne is met 756 bi-alleliese, dominante DArT merkers ge-ontleed, waarvan 545 reeds aan chromosome toegewys is. Die merkers word as aanwesig of afwesig geregistreer.

Slegs data gegenereer met merkers wat aan chromosoom 3A toegeken is en merkers wat nog nie aan spesifieke chromosome toegeken is nie, is gebruik. Vyftien van 43 merkers wat aan chromosoom 3A toegeken is en 41 van die 211 merkers wat nog nie aan spesifieke chromosome toegeken is nie, is gevind om bruikbaar te wees as negatiewe merkers vir die S13 translokasie. Die oorblywende merkers was nie bruikbaar nie vir verskeie redes: (i) van die merkers het in die koringgenome (CS, CS-S en W84-17) sowel as die S13 translokasie geamplifiseer, (ii) sommige merkers wat nul allele in CS of W84-17 geproduseer het, (iii) asook merkers wat nie in die koringgenome of S13 geamplifiseer het nie. Buiten die negatiewe merkers wat geïdentifiseer is, was daar ook ses merkers wat as positiewe merkers vir die S13 translokasie gebruik kon word. Laasgenoemde merkers was dus aanwesig in die S13 translokasie en afwesig in die koringgenome (CS, CS-S en W84-17).

Tabel 12 verskaf 'n opsomming van die resultate verkry met die verskillende DArT merkers wat nog nie aan spesifieke chromosome toegeken is nie. In Tabel 12 word merkers wat dieselfde profiel van aan- en afwesige loci herken saam gegroepeer. Die volledige data word in Addendum E (Tabel E1) weergegee.

Al die merkers in Tabel 12 toets negatief vir die S13 translokasie (in donker grys aangedui) en positief vir koringchromatien. Die 'Q'-waarde gee 'n aanduiding van merker-kwaliteit; volgens die *Triticarte* diens is die waarde op die analise van variansie (ANOVA) model gebaseer en kan die tipering van merkers met 'n 'Q'-waarde > 80 , as betroubaar beskou word. Merkers met 'Q'-waardes < 80 is ook gebruik, maar mag tiperingsfoute bevat. Wanneer 'n aantal merkers egter dieselfde profiel herken verskaf dit wel 'n mate van verifiëring van die data.

Ten opsigte van die groep A rekombinante bevestig die DArT data (Tabel 12) dat al vyf lyne wel rekombinante chromosome besit. In teenstelling met die mikrosatellietdata van Tabele 8 en 10, dui die DArT data daarop dat rekombinante 03M127-2 en 04M127-11 moontlik onderskeidelik die minste en die meeste spesie-chromatien bevat. Omdat dit onbekend is of die betrokke DArT-loci wel almal op chromosoom 3A voorkom en omdat die gene ongekarteer is, is dit egter onduidelik of so 'n afleiding geregverdig is. Boonop is daar nie sekerheid uit die mikrosatellietdata dat die aanvanklike S13 translokasie nie wel ook gedeeltes van die chromosoom 3AL arm kon beslaan het nie. Indien dit wel die geval was en sommige van die DArT loci op die lang arm sou voorkom, mag dit wel die oënskynlike teenstrydigheid van die mikrosatelliet- en DArT-data verklaar.

Ten opsigte van die groep B rekombinante dui die data daarop dat die grootste gedeelte van die *Ae. Speltoides*-chromatien met koringchromatien vervang is. Wat egter opval omtrent die data is dat vir 30 van die 40 merkers rekombinant 04M127-3 alreeds die koringlokus herwin het. Dit klink onwaarskynlik omdat die mikrosatellietdata daarop gedui het dat rekombinant 04M127-3 slegs 'n relatief klein gedeelte van die *Ae. speltoides* chromatien verloor het. Indien die data egter korrek is, sou dit weereens beteken dat die S13 translokasie ook 'n gedeelte van chromosoomarm 3AL kon beslaan het. Merkerprofiel 3 dui daarop dat groep B rekombinant 198 waarskynlik die grootste hoeveelheid spesie-chromatien oorgehou het. Merkerprofiel 5 dui daarop dat hierdie merker aanwesig is in 13 groep B rekombinante maar afwesig is in 18 van die rekombinante. Die merker het boonop 'n Q-waarde van ongeveer 80 wat dui op betroubaarheid. Die merker was egter alreeds teenwoordig in rekombinant 04M127-3 wat in die kruising gebruik is waaruit die groep B rekombinante verhaal is. Die waarneming impliseer dus dat hierdie koringlokus verlore geraak het in 18 van die

rekombinante. Indien die afleiding korrek is sou dit beteken dat die normale en translokasie-chromosome 3A 'n strukturele verskil (bv 'n inversie) besit het wat na oorkruising aanleiding kon gee tot verlies van hierdie lokus. Dit sou impliseer dat die 13 groep B rekombinante wat steeds die koringlokus besit in merkerprofiel 5 waarskynlik die veiliger keuses sou wees wanneer plante gekies word vir verdere kruisings. Dit is egter ook moontlik dat die waargenome resultate bloot 'n artefak is van die ontledingsmetode.

Tabel 13 verskaf 'n opsomming van die resultate verkry met die 15 bruikbare merkers wat op chromosoom 3A gekarteer is. Die volledige data verskyn in Addendum E (Tabel E2). Hierdie merkers is almal negatiewe merkers vir die S13 translokasie aangesien hulle in die koringgenome aanwesig en in die translokasie afwesig is. Die merker X genotipe kombinasies wat negatief getoets het word weer in donker grys aangedui. Die data dui weereens op aansienlike vermindering van die hoeveelheid spesie-chromatien en verplasing daarvan deur koringchromatien in die groep B rekombinante. Dit blyk weereens dat rekombinant 198 waarskynlik meer spesie-chromatien oorgehou het as die res van die groep B rekombinante.

Ses DArT-merkers het geblyk om positiewe merkers vir die *Ae. Speltoides*-chromatien te wees (Tabel 14). Hierdie merkers is aanwesig in S13, maar afwesig in die koringgenome (CS, CS-S en W84-17). Een van die merkerloci is nog nie aan 'n spesifieke chromosoom toegeken nie, maar die res kom onderskeidelik op chromosome 1B, 2B en 3D voor. Al ses merkers is van 'n koring genom-biblioteek afkomstig. Die hele merkerpaneel was aanwesig in die meerderheid groep A rekombinante en in al die groep B rekombinante. Dit beteken dat die merkerloci in 'n gebied van die S13 translokasie voorkom wat nie aan die rekombinasie deelgeneem het nie; waarskynlik digby die weerstandsgeen. Indien die merkers wel volgordes digby die weerstandsgeen herken, sou hulle moontlik vir merker-bemiddelde seleksie van *LrS13* gebruik kon word. As sulks sou hulle egter beperkte waarde hê omdat hulle ook koringfragmente kan opspoor in gewone koring kultivars. So byvoorbeeld binne die koringpopulasies wat vir merker ontwikkeling deur Triticarte gebruik is, onderskeidelik Avalon/Cadenza, Arina/NK93604, Cranbrook/Halberd, Carnamah/WAWHT2046, Kukri/Janz, Synthetic/Opata, Spark/Rialto, Vulcan/Kewell en Whistler/WW1842 (inligting op Triticarte se webtuiste, www.triticarte.com.au).

4. SAMEVATTING

Die suksesvolle oordrag van gewenste gene vanaf wilde spesies na gewone koring word bemoelik deur lae vrugbaarheid van die hibried asook die geredelikheid waarmee die twee spesies se chromosome paar (Knott, 1987). Gewenste gene word ook vergesel van groot hoeveelhede spesie chromatiene wat allerhande nadelige effekte mag hê; 'n verskynsel bekend as koppeling-sleur ('linkage-drag').

'n *Ae. speltoides* aanwys is met CS gekruis en blaarroesbestande F₁ is vyf keer na CS teruggekruis waarna dit met W84-17 gekruis is. Ondersoek van die nageslag uit die laaste kruising het getoon dat vreemde chromatiene waarin drie gene met tentatiewe benamings *LrS13*, *YrS13* en *SrS13* voorkom, op 'n onbekende koringchromosoom geïnkorporeer is (Marais *et al.*, 2003). Die weerstandsgene het uitsluitlike oordrag getoon en al die nageslag van 'n translokasieheterosigoot was altyd bestand. Die weerstand was oënskynlik onlosmaaklik gekoppel aan 'n *Gc*-geen(e) wat vrugbaarheid kwaai verlaag het en hibriednekrose, swak plantontwikkeling en verrimpelde sade tot gevolg gehad het. Dit het geblyk dat gerekombineerde gamete (vir die *speltoides* translokasie) waarskynlik altyd geaborteer het sodat die assosiasie van die weerstand en nadelige *Gc*-effekte nie geredelik op konvensionele wyse deur kruisteling en seleksie verbreek kon word nie (Marais 2008; persoonlike mededeling). Vanweë die sterk segregasiedistorsie was dit nie moontlik om die translokasie met aneuploïe te karteer nie maar kon dit uiteindelik met behulp van mikrosatelliete aan chromosoomarm 3AS toegewys word.

'n Poging is aangewend om die S13 translokasie te verkort. Omdat dit nie duidelik was of die translokasiechromosoom en normale chromosoom 3A tydens meiose paar nie, is 'n *Ph1*-lose toestand geskep. Plante heterosigoties vir die translokasie wat terselfdertyd *ph1bph1b* was, is verkry en getoetskruis met die vatbare toetsers, W84-17. Blaarroesbestande F₁-nageslag is uitgeplant en die plante is individueel beoordeel vir hibriednekrose-simptome, vrugbaarheid, plantvoorkoms en saadgehalte. Die vier beste plante vir die kenmerke (04M127-1 tot 4) is geselekteer en het as basis vir hierdie studie gedien (Marais 2008, persoonlike mededeling).

Hierdie studie het ten doel gehad: (i) om die vier waarskynlike 04M127 rekombinante

molekulêr te karakteriseer, (ii) om verdere rekombinante in toetskruispopulasie 04M127 te probeer vind, (iii) om die mees bruikbare rekombinant te identifiseer en (iv) om te poog om die kortste rekombinant verder te verkort ten einde soveel moontlik van die *Gc*-gene te verwyder.

Uiteindelik is sewe 04M127 rekombinante (sg. rekombinante groep A) gekarakteriseer. Hierdie rekombinante het verskillende (maar klein) hoeveelhede vreemde chromatien vir koringchromatien verruil, maar die effekte van koppeling-sleur was nog duidelik sigbaar met die plante wat hibriednekrose asook verrimpelde saad getoon het. Van die rekombinante het ook steeds die broosaar-fenotipe getoon waar die are met rypwording na die eerste sjaar afbreek. 'n Verdere *Gc*-effek behels verskille in die sukses van resiproke kruisings. Wanneer 'n *S13* translokasie-draer resiprook met 'n nie-draer gekruis word, verskil die resultaat afhangend van watter lyn die vroulike ouer was. As die vroulike ouer nie die translokasie besit nie is die F_1 sade erg verrimpeld en nie-lewenskragtig. Hierdie en ander effekte van *Gc*-gene herinner sterk aan die kenmerke van transposons en die vermoede is reeds uitgespreek (Literatuuroorsig, afdeling 1.11) dat hulle wel transposons is.

Met die uitsondering van 04M127-1, het die mikrosatelliet- en DArT-data bevestig dat al die groep A rekombinante wel vanweë oorkruising binne die translokasiegebied ontstaan het. Hoewel al die rekombinante steeds sterk *Gc*-effekte openbaar het was rekombinant 04M127-3 effens minder geaffekteer en is dit gekies vir voortgesette pogings om die translokasie te verkort. Saailing en landtoetsing met streeproes en stamroes het getoon dat rekombinant 3 net die *LrS13* lokus oorgehou het. Rekombinant 3 is een van drie rekombinante wat skynbaar vanweë dubbeloorkruising binne 'n relatief klein gebied op chromosoomarm 3AS ontstaan het. Die afwesigheid van enkeloorkruisingsprodukte waarin groter gedeeltes van die spesie-chromatien vir koringchromatien verruil is was onverwags. Omdat *Gc*-gene bekend is om sterk segregasiedistorsie-effekte tot gevolg te hê (Endo en Tsunewaki, 1975; Maan, 1975; Endo, 1990) is dit egter moontlik dat sodanig-gerecombineerde gamete wel ontstaan het, maar vanweë *Gc*-interaksies geëlimineer is.

In 'n poging om ook van die oorblywende *Gc*-gene ontslae te raak is rekombinant 04M127-3A met W84-17 gekruis. In die F_1 sou daar dus geleentheid wees vir oorkruising tussen die normale chromosoomarm 3AS en die verkorte *S13* translokasie. Omdat die *Ph1*

lokus teenwoordig was sou hierdie oorkruisings na normale meiotiese paring moes geskied. Paring en oorkruising sou dus alleenlik moontlik wees indien die gewone koring en *Ae. speltoides* telomere in staat was om te assosieer. Die F₁ is met CSN3AT3B/D plante bestuif ten einde hemisigotiese toetskruisnageslag daar te stel. Die toetskruis F₁ is na saailingtoetse onderverdeel in 35 bestande plante en 64 vatbare plante. Die bestande plante plus nege vatbare, dog gerekombineerde plante is vervolgens met die volle mikrosatelliet- en SCAR-merkerpaneel geëvalueer. Hierdie rekombinante is daarna as rekombinante groep B aangedui.

Ontleding van die groep B rekombinante het daarop gedui dat al die bestande plante al die koring mikrosatelliet- en SCAR-loci herwin het. Die nege vatbare plante het uit slegs twee tipes rekombinante bestaan. Die res van die vatbare plante het waarskynlik al die spesie-merkerallele, soos dit in rekombinant 3 voorkom, behou. Die ooglopende afwesigheid van talle ander verwagte, bestande en vatbare gameettipes was weer opvallend en dit wou voorkom asof selektiewe oorlewing van sekere gamete weereens geskied het. Die groep B rekombinante het aansienlik minder geassosieerde *Gc*-effekte as enige van die vroeëre vorms oorgehou, maar dit is onwaarskynlik dat al die *Gc* gene (transposons?) wel verwyder is.

Tydens die studie is daar ook gepoog om die translokasie in die verskillende rekombinante vorms deur gebruik van translokasie-spesifieke merkers te karakteriseer. *Gc*-gene word as potensiële TEE beskou en daar is besluit om *Ae. speltoides* transposons as potensiële-nuttige merkers vir translokasie-S13 te ontwikkel. Hierdie benadering het egter nie vrugte af gewerp nie aangesien die gepubliseerde, *Ae. speltoides* transposon-volgordes 'n hoë graad van ooreenkoms met die koring transposons getoon het en amplifikasie in die spesie-sowel as die koringgenome plaasvind. Die translokasie word in koring-agtergrond gehou, daarom was merker ontwikkeling nie suksesvol nie. Dit het aan die lig gekom dat al die *Ae. speltoides* transposon-volgordes van gekonserveerde koring transposon-volgordes verhaal is en daarom toon die gekonserveerde *Ae. speltoides* transposon-volgordes 'n hoë graad van ooreenkoms met dié van koring.

Die DArT data het bevestig dat groot hoeveelhede spesie-chromatien vir koringchromatien verruil is in die bestande, groep B rekombinante. Die data dui ook op die moontlikheid dat die oorspronklike S13 translokasie waarskynlik ook 'n gedeelte van 3AL betrek het. 'n

Totaal van 13 groep B rekombinante wat positief toets vir merker wPt-2278 (Addendum E, Tabel E1) is waarskynlik die geskikste en kortste seleksies om te gebruik vir verdere ontwikkeling van die weerstandsgen. Soos blyk uit die tweede rekombinasie-eksperiment behoort dit nou moontlik te wees om deur volgehoue kruisteling (in die afwesigheid van *Ph1*) en seleksie vir vrugbaarheid die oorblywende *Gc*-effekte te skei van die translokasie. Die aansienlike verdunning van die *Gc*-effekte behoort die oorlewing van selfs korter rekombinante te bevorder.

Die drie SCAR-merkers wat in die studie gebruik is moet nog gekarteer word, maar dit is moontlik om die merkers as potensiële *LrS13* merkers te ontwikkel mits die merkers nou genoeg gekoppel is. Indien die merkers nie nou-gekoppel is nie besit die merkers steeds die potensiaal om in 'n verdere rondte nog korter rekombinante te identifiseer.

Toekomstige studies en vooruitsigte: (i) Karteer *LrS13* volledig, (ii) bepaal of die drie SCAR-merkers asook die ses DArT-merkers gekoppel is aan *LrS13* (moontlike gebruik vir MAS-seleksie), (iii) poog om die korste rekombinante verder te verkort deur terug te kruis na W84-17 met gepaardgaande blaarroes seleksie en (iv) vra 'n formele naam vir *LrS13* aan en stel teelwyn kommersieel vry.

5. VERWYSINGS

- ADAMS, M.D., CELNIKER, S.E., HOLT, R.A., *et al.*, 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- ALTINKUT, A., KOTSERUBA, V., KIRZHNER, V.M., *et al.*, 2006. *Ac*-like transposons in populations of wild diploid Triticeae species: comparative analysis of chromosomal distribution. *Chromosome Res.* 14, 307-317.
- ANAMTHAWAT-JONSSON, K. & HESLOP-HARRISON, J.S., 1993. Isolation and Characterization of genome-specific DNA sequences in Triticeae species. *Mol. Gen. Genet.* 240, 151-158.
- ANTONOV, A.I., & MARAIS, G.F., 1996. Identification of leaf rust and genes in *Triticum* species for transfer to common wheat. *S. Afr. J. Plant Soil* 13(2), 55-60.
- ARKHIPOVA, I.R., LYUBOMIRSKAYA, N.V. & ILYIN, Y. V., 1995. *Drosophila* Retrotransposons. Austin: R. G. Landes Co.
- BADAEVA, E.D., FRIEBE, B. & GILL, B.S., 1996. Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome* 39, 1150-1158.
- BELYAYEV, A., RASKINA, O. & NEVO, E., 2005. Variability of the chromosomal distribution of Ty3-gypsy retrotransposons in the populations of two wild Triticeae species. *Cytogenet. Genome. Res.* 109, 43-49.
- BENNETZEN, J.L., 2000. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol. Biol.* 42, 251-269.
- BERG, D.E. & HOWE, M.H., 1989. Mobile DNA. American Society for Microbiology Drukkery, Washington, Distrik van Columbië.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., *et al.*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- BOYKO, E., KALENDAR, R., KORZUN, V., *et al.*, 2002. A high density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense related genes: insight into cereal chromosome structure and function. *Plant. Mol. Biol.* 48, 767-790.
- BRINKMAN, M.A., & FREY, K.J., 1977. Yield component analysis of oat isolines that produce different grain yields. *Crop Science* 17, 165-168.

- BROWN, T.A., 2002. Genomes, 2de uitg., BIOS Scientific Uitgewers Bpk., Oxford, VK.
- BUREAU, T.E. & WESSLER, S.R., 1992. Tourist: a large family of inverted-repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell* 4, 1283-1294.
- BUREAU, T.E. & WESSLER, S.R., 1994. Stowaway: a new family of inverted-repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell* 6, 907-916.
- BUREAU, T.E., RONALD, P.C. & WESSLER, S.R., 1996. A computer based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8524-8529.
- CAREFOOT, G.L. & SPROTT, E.R., 1967. *Famine on the Wind, Man's Battle Against Plant Disease*. Rand McNally en Mpy., VSA.
- CARLSON, J.E., TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, J.C., *et al.*, 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor. Appl. Genet.* 83, 194-200.
- CASACUBERTA, E., CASACUBERTA, J.M., PUIGDOMENECH, P., *et al.*, (1998). Presence of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in the genome of *Arabidopsis thaliana*: characterisation of the *Emigrant* family of elements. *Plant J.* 16, 79-85.
- CEOLONI, C., BIAGETTI, M., CIAFI, M., *et al.*, (1996). Wheat chromosome engineering at the 4x level: the potential of different alien gene transfers into durum wheat. *Euphytica* 89, 87-97.
- CHEN, P.D., TSUJIMOTO, H., & GILL, B.S., 1994. Transfer of *Phl* genes promoting homoelogenous oaring from *Triticum speltoides* to common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88, 97-101.
- CHENG, Z.J. & MURATA, M., 2003. A centromeric tandem repeat family originating from a part of Ty3/ Gypsy-retroelement in wheat and its relatives. *Genetics* 164, 665-672.
- CHENG, M., FRY, J.E., PANG, S., *et al.*, 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115, 971-980.
- CORREDOR, E., LUKASZEWSKI, A.J., PACHÓN, P., *et al.*, 2007. Terminal regions of wheat chromosomes select their pairing partners in meiosis. *Genetics* 177, 699-706.

- CRAIG, N.L., CRAIGIE, R., GELLERT, M., *et al.*, 2002. Mobile DNA II. American Society for Microbiology Pers, Washington, Distrik van Columbië.
- CROW, F., 1979. Genes that violate Mendel's rules. *Sci. Am.* 240, 104-113.
- DANILEVSKAYA, O., SLOT, F., PAVLOVA, M., *et al.*, 1994. Structure of the *Drosophila* HcT-A transposon: a retrotransposon-like element forming telomeres. *Chromosoma* 103, 215-224.
- DANILEVSKAYA, O., SLOT, F., TRAVERSE, K.L., *et al.*, 1997. The *Drosophila* telomere transposon *Het-A* produces a transcript with tightly bound protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6679-6682.
- DAUD, H.M. & GUSTAFSON, J.P., 1996. Molecular evidence for *Triticum speltoides* as a B-genome progenitor of wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 39, 543-548.
- DELANEY, D.E., NASUDA, S., ENDO, T.R., *et al.*, 1995. Cytologically based physical maps of the group-2 chromosomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 91, 568-573.
- DERISI, J.L., VISHWANATH, R.I. & BROWN, P.O., 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- DEVOS, K.M. & GALE, M.D., 1997. Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol. Biol.* 35, 3-15.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- EDWARDS, A., HAMMOND, H.A., JIN, L., *et al.*, 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12, 241-253.
- EICKBUSH, T., 1994. Origin and evolutionary relationships of retroelements. ble. 121-157. *In: S.S. Morse (red.). The evolutionary biology of viruses.* Raven Pres., New York.
- EKSTEEN, A., 2008. Die ontwikkeling van molekulêre merkers vir wilde spesie-verhaalde weerstandsgeenkomplekse van gewone koring. M. Sc. Tesis, Stellenbosch Universiteit, Stellenbosch, Suid-Afrika (In voorbereiding).
- ELLIS, T.H.N., POYSER, S.J., KNOX, M.R., *et al.*, 1998. Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Mol. Gen. Genet.* 260, 9-19.

- ENDO, T.R., 1978. On the *Aegilops* chromosomes having gametocidal action on common wheat. 306-314. In: Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium., Indië.
- ENDO, T.R., 1979. Selective gametocidal action of a chromosome of *Aegilops cylindrica* in a cultivar of common wheat. *Wheat Inf. Serv.* 50, 24-28.
- ENDO, T.R., 1982. Gametocidal chromosomes of three *Aegilops* species in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 24, 201-206.
- ENDO, T.R., 1985. Two types of gametocidal chromosome of *Aegilops sharonensis* and *Ae. Longissima*. *Jpn. J. Genet.* 60, 125-135.
- ENDO, T.R., 1987. Genome rearrangement caused by a gametocidal chromosome in common wheat. *Wheat Info. Serv.* 65, 43-44.
- ENDO, T.R., 1990. Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Jpn. J. Genet.* 65, 135-152.
- ENDO, T.R., 1996. Allocation of a gametocidal chromosome of *Aegilops cylindrica* to wheat homoeologous group 2. *Genes Genet. Syst.* 71, 243-246.
- ENDO, T.R. & KATAYAMA, Y., 1978. Finding of a selectively retained chromosome of *Aegilops caudata* L. in common wheat. *Wheat Inf. Serv.* 48, 32-35.
- ENDO, T.R. & TSUNEWAKI, K., 1975. Sterility of common wheat with *Aegilops triuncialis* cytoplasm. *J. Herd.* 66, 13-18.
- FAROOQ, S., SHAH, T.M. & ASGHAR, M., 1996. Intergeneric hybridization for wheat improvement: V. Production of and metaphase 1 chromosome analysis in F1 hybrids of wheat (*Triticum aestivum*) with *Aegilops ovata* L. *Cereal Res. Commun.* 24, 155-161.
- FEDOROFF, N.V., 1999. The suppressor-mutator element and the evolutionary riddle of transposons. *Genes Cells* 4, 11-19.
- FESCHOTTE, C., JIANG, N. & WESSLER, S.R., 2002. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nature Rev.* 3, 329-341.
- FERNÁNDEZ-CALVIN, B. & ORELLANA, J., 1994. Metaphase I-bound arms frequency and genome analysis in wheat–*Aegilops* hybrids. 3. Similar S or S' genomes of *Ae. speltoides*, *Ae. Longissima* and *Ae. Sharonensis*. *Theor. Appl. Genet.* 88, 1043-1049.
- FINCH, R.A., MILLER, T.E. & BENNETT, M.D., 1984. "Cuckoo" *Aegilops* addition chromosome in wheat ensures its transmission by causing chromosome breaks in meiospores lacking it. *Chromosoma* 90, 84-88.

- FINNEGAN, D.J., 1992. Transposable elements. pp. 1096-1107. In: D. L. Lindsley and G. Zimm (eds.). *The genome of *Drosophila melanogaster**. New York: Academic Press, New York.
- FLAVELL, A.J., KNOX, M.R., PEARCE, S.R., *et al.*, 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.* 16, 643-650.
- FLAVELL, A.J., BOLSHAKOV, V.N., BOOTH, A., *et al.*, 2003. A microarray-based high throughput molecular marker genotyping method: the tagged microarray marker approach. *Nucl. Acids Res.* 31, e115.
- FRIEBE, B., JIANG, J. & GILL, B., 1995. Detection of 5S rDNA and other repeated DNA on supernumerary B chromosomes of *Triticum* species (Poaceae). *Pl. Syst. Evol.* 196, 131-139.
- FRIEBE, B., JIANG, J., RAUPP, W.J., *et al.*, 1996. Characterization of wheat-alien translocations conferring and to diseases and pests: current status. *Euphytica* 91, 59-87.
- FRIEBE, B.R., TULEEN, N.A., JIANG, J., *et al.*, 1993. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. *Genome* 36, 731-742.
- FRIEBE, B.R., TULEEN, N.A. & GILL, B.S., 1999. Development and identification of a set of *Triticum aestivum* – *Aegilops geniculata* chromosome addition lines. *Genome* 42, 374-380.
- GIBBS, R.A., WEINSTOCK, G.M., METZKER, M.L. *et al.*, 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428, 475-476.
- GILL, B.S., FRIEBE, B. & ENDO, T.R., 1991. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 34, 830-839.
- GILL, K.S., GILL, B.S., ENDO, T.R., *et al.*, 1993. Fine physical mapping of *Ph1*, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. *Genetics* 134, 1231-1236.
- GILL, K.S., GILL, B.S., ENDO, T.R., *et al.*, 1996. Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. *Genetics* 143, 1001-1012.

- GIORGI, B., 1978. A homoeologous pairing mutant isolated in *Triticum durum* cv. Cappelli. ble. 4-5. In: Mutation Breeding Newsletter No. 11. Joint Food and Agriculture-International Atomic Energy Agency, Vienna, Oostenryk.
- GRANDBASTIEN, M.A., SPIELMANN, A. & CABOCHE, M., 1989. *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* 337, 376-380.
- GRANT, V., 1981. Plant speciation. 2de uitg. Columbia University Press, New York.
- GRAY, Y.H., 2000. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet.* 16, 461-468.
- HARLAN, J.R. & DE WET, J.M.J., 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20, 509-517.
- HESLOP-HARRISON, J.S., BRANDES, A., TAKETA, S., *et al.*, 1997. The chromosomal distributions of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* 100, 197-204.
- HILL, M., WITSENBOER, H., ZABEAU, M., *et al.*, 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1202-1210.
- HIROCHIKA, H., OTSUKI, H., YOSHIKAWA, M., *et al.*, 1996. Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon *Tto1* in rice. *Plant Cell* 8, 725-734.
- HOHMANN, U., GRANER, A., ENDO, T.R., *et al.*, 1995. Comparison of wheat physical maps with barley linkage maps for group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 91, 618-626.
- IZSVAK, Z., IVICS, Z., SHIMODA, N., *et al.*, 1999. Short inverted-repeat transposable elements in Teleost fish and implications for a mechanism of their amplification. *J. Mol. Evol.* 48, 13-21.
- JACCOUD, D., PENG, K., FEINSTEIN, D., *et al.*, 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucl. Acids Res.* 29, e25.
- JAUHAR, P.P., 1975. Genetic regulation of diploid-like chromosome pairing in the hexaploid species, *Festuca arundinacea* Schreb. and *F. rubra* L. (*Gramineae*). *Chromosoma* 52, 363-382.
- JAUHAR, P.P., 1977. Genetic regulation of diploid-like chromosome pairing in *Avena*. *Theor. Appl. Genet.* 49, 287-295.

- JAUHAR, P.P., 1990. Intergeneric hybrid between *ph1c* mutant of durum wheat and *Thinopyrum nodosum*. Bl. 94. In: Agronomy Abstracts. Am. Soc. Agro., Madison, Wisconsin.
- JAUHAR, P.P., 1991. Hybrid between durum wheat and diploid *Thinopyrum bessarabicum*. *Genome* 34, 283-287.
- JAUHAR, P.P., 1992. High chromosome pairing in hybrids between hexaploid bread wheat and tetraploid crested wheat grass (*Agropyron cristatum*). *Hereditas* 116, 107-109.
- JAUHAR, P.P., 1995. Meiosis and fertility of F1 hybrids between hexaploid bread wheat and decaploid tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*). *Theor. Appl. Genet.* 90, 865-871.
- JAUHAR, P.P. & JOPPA, L.R., 1996. Chromosome pairing as a tool in genome analysis: merits and limitations. ble. 9-37. In: P.P. Jauhar (red.) Methods of genome analysis in plants. CRC Pers, Boca Raton, Fla., Londen en Tokio.
- JAUHAR, P.P. & ALMOUSLEM, A.B., 1998. Production and meiotic analyses of intergenetic hybrids between durum wheat and *Thinopyrum* species. ble. 119-126. In: A.A. Jaradat (red.). Proceedings of the Third International *Triticeae* Symposium. 4-8 Mei 1997, International Center for Agricultural Research in the Dry areas (ICARDA), Aleppo, Sirië.
- JAUHAR, P.P. & CHIBBAR, R.N., 1999. Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome* 42, 570-583.
- JIANG, N. & WESSLER, S.R., 2001. Insertion preference of maize and rice miniature inverted repeat transposable elements as revealed by the analysis of nested elements. *Plant Cell* 13, 2553-2564.
- JIANG, N., BAO, Z., TEMNYKH, S., *et al.*, 2002. *Dasheng*: a recently amplified nonautonomous LTR element that is a major component of pericentromeric regions in rice. *Genetics* 161, 1293-1305.
- JIN, Y.K. & BENNETZEN, J.L., 1989. Structure and coding properties of *Bs1*, a maize retrovirus-like transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6235-6239.
- JOHNS, M.A., MOTTINGER, J. & FREELING, M., 1985. A low copy number, copia-like transposon in maize. *EMBO J.* 4, 1093-1102.
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., *et al.*, 1999. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98, 704-711.

- KALENDAR, R., TANSEKANEN, J., IMMONEN, S., *et al.*, 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6603-6607.
- KIBIRGE-SEBUNYA, I.N. & KNOTT, D.R., 1983. Transfer of stem rust and to wheat from an *Agropyron* chromosome having a gametocidal effect. *Can. J. Genet. Cytol.* 25, 215-221.
- KIDWELL, M.G. & LISCH, D., 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7704-7711.
- KIDWELL, M.G. & HOLYOAKE, A.J., 2001. Transposon-induced hotspots for genomic instability. *Genome Res.* 11, 1321-1322.
- KILIAN, A., HUTTNER, E., WENZL, P., *et al.*, 2005. The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome profiling for crop improvement. ble. 443-461. *In*: R. Tuberosa, R. L. Phillips & Gale M. (reds.). Proceedings of the International Congress “ In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution”.27-31 Mei 2003, Bologna, Italië.
- KIMBER, G. & FELDMAN, M., 1987. ‘ Wild Wheat: An Introduction.’ Special Report 353 College of Agriculture University of Missouri, Columbia.
- KING, M., 1993. Species Evolution: the role of chromosome change. Cambridge University Press, Cambridge.
- KNOTT, D.R., 1987. Transferring alien genes to wheat. ble. 462-471. *In*: E.G. Heyne (red.).Wheat and wheat improvement, 2de uitg., Am. Soc. Agro., Madison, Wisconsin.
- KNOTT, D.R., 1989. The Wheat Rusts-Breeding for Resistance. Springer-Verlag Uitgewers, Berlyn Heidelberg, Duitsland.
- KNOTT, D.R. & DVORÁK, J., 1981. Agronomic and quality characteristics of wheat lines with leaf rust and derived from *Triticum speltoides*. *Can. J. Genet. Cytol.* 23, 475-480.
- KORSWAGEN, H.C., SMITS, M.T., DURBIN, R.M., *et al.*, 1996. Transposon *Tc1*-derived, sequence-tagged sites in *Caenorhabditis elegans* as markers for gene mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14680-14685.
- KOTA, R.S. & DVORÁK, J., 1988. Genomic instability in wheat induced by Chromosome 6B^s of *Triticum speltoides*. *Genetics* 120, 1085-1094.

- KOTA, R.S., GILL, K.S., GILL, B.S., *et al.*, 1993. A cytogenetically based physical map of chromosome 1B in common wheat. *Genome* 36, 548-554.
- KUMAR, A., PEARCE, S.R., MCLEAN, K., *et al.*, 1997. *Tyl-copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100, 205-217.
- KUMAR, A. & BENNETZEN, J.L., 1999. Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33, 479-532.
- KUNZE, R., SAEDLER, H. & LONNING, W.E., 1997. Plant transposable elements. *Adv. Bot. Res.* 27, 331-470.
- NAGAKI, K., TSUJIMOTO, H. & SASAKUMA, T., 1998. Dynamics of tandem repetitive Afa-family sequences in Triticeae, wheat-related species. *J. Mol. Evol.* 47, 183-189.
- LANDER, E.S., LINTON, L.M., BIRREN, B., *et al.*, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- LANGDON, T., JENKINS, G., HASTEROK, R., *et al.*, 2003. A High-Copy-Number CACTA family transposon in temperate grasses and cereals. *Genetics* 163, 1097-1108.
- LARGE, E.C., 1940. 'The Advance of the fungi'. Jonathan Cape, London.
- LEETON, P.R.J. & SMYTH, D.R., 1993. An abundant LINE-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum*. *Mol. Gen. Genet.* 237, 97-104.
- LEONARDO, T.E. & NUZHIDIN, S.V., 2002. Intracellular battlegrounds: conflict and cooperation between transposable elements. *Genet. Res. Camb.* 80, 155-161.
- LEVIN, D.A., 2002. The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford University Press, Oxford.
- LEWIS, H. & RAVEN, P.H., 1958. Rapid evolution in *Clarkia*. *Evolution* 12, 319-336.
- LUKASZEWSKI, A.J., 1995. Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticale. *Theor. Appl. Genet.* 90, 714-719.
- MAAN, S.S., 1975. Exclusively preferential transmission of an alien chromosome in wheat. *Crop Sci.* 15, 287-292.
- MAAN, S.S., 1980. Alteration of sporophytic sterility mechanism in wheat. *J. Hered.* 71, 75-82.

- MAESTRA, B. & NARANJO, T., 2000. Genome evolution in *Triticeae*. *Chromosome Today* 13, 155-167.
- MALIK, H.S. & EICKBUSH, T.H., 1998. The *RTE* class of non-LTR retrotransposons in widely distributed in animals and is the origin of many *SINEs*. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1123-1134.
- MANNINEN, O., KALENDAR, R., ROBINSON, J., *et al.*, 2000. Application of *BARE-1* retrotransposon markers to map a major and gene for net blotch in barley. *Mol. Gen. Genet.* 264, 325-334.
- MARAIS, G.F. & PRETORIUS, Z.A., 1996. Gametocidal effects and resistance to wheat leaf rust and stem rust in derivatives of a *Triticum turgidum* ssp. *Durum* /*Aegilops speltoides* hybrid. *Euphytica* 88, 117-124.
- MARAIS, G.F., PRETORIUS, Z.A., MARAIS, A.S., *et al.*, 2003. Transfer of rust and genes from *Triticum* species to common wheat. *S. Afr. J. Plant Soil* 20, 103-110.
- MARILLONNET, S. & WESSLER, S.R., 1998. Extreme structural heterogeneity among the members of a maize retrotransposon family. *Genetics* 150, 1245-1256.
- MARSHALL, E., 1997. The hunting of the SNP. *Science* 278, 2047.
- MATSUOKA, Y. & TSUNEWAKI, K., 1996. Wheat retrotransposon families identified by reverse transcriptase domain analysis. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1384-1392.
- MCCLINTOCK, B., 1946. Maize genetics. *Carnegie Inst. Washington Year Book* 45, 176-186.
- MCCLINTOCK, B., 1947. Cytogenetic studies of maize and *Neurospora*. *Carnegie Inst. Washington Year Book* 46, 146-152.
- MCCLINTOCK, B., 1948. Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Washington Year Book* 47, 155-169.
- MCCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 16, 13-47.
- MCDONALD, J.F., 1995. Transposable elements: possible catalysts of organismic evolution. *Trends Ecol. Evol.* 10, 123-126.
- MCDONALD, J.F., MATYUNINA, L.V., WILSON, S., *et al.*, 1997. LTR retrotransposons and the evolution of eukaryotic enhancers. *Genetica* 100, 3-13.
- MCINTOSH, R.A., WELLINGS, C.R. & PARK, R.F., 1995. Wheat rusts: An atlas of resistance genes. CSIRO Publikasies, Australië.

- MENDENDEZ, C.M., HALL, A.E. & GEPTS, P., 1997. A genetic-linkage map of cowpea (*Vigna-Unguiculata*) developed from a cross between 2 inbred, domesticated lines. *Theor. Appl. Genet.* 95, 1210-1217.
- MEYERS, B.C., TINGEY, S.V. & MORGANTE, M., 2001. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Res.* 11, 1660-1676.
- MIDDELTON, F.L., 1998. A study of gametocidal and resistance genes which were transferred to wheat through interspecific hybridisation. M.Sc. Tesis, Stellenbosch Universiteit, Stellenbosch, Suid-Afrika.
- MILLER, T.E., 1983. Preferential transmission of alien chromosomes in wheat. Kew Chromosome Conference II, Londen.
- MILLER, T.E., HUTCHINSON, J. & CHAPMAN, V., 1982. Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 61, 27-33.
- MUNIZ, L.M., CUADRADO, A., JOUVE, N., *et al.*, 2001. The detection, cloning, and characterisation of WIS 2-1A retrotransposon-like sequences in *Triticum aestivum* L. and X *Triticosecale* Wittmack and an examination of their evolution in related *Triticeae*. *Genome* 44, 979-989.
- MURAI, K., TAKETA, S., ISLAM, A.K.M.R., *et al.*, 1997. A simple procedure for the production of wheat-barley 5H chromosome recombinant lines utilizing 5B nullisomy and 5H-specific molecular markers. *Wheat Inf. Serv.* 84, 53-55.
- NALAM, V.J., VALES, M.I., WATSON, C.J.W., *et al.*, 2006. Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 112, 373-381.
- NANDI, S., SUBUDHI, P.K., SENADHIRA, D., *et al.*, 1997. Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol. Gen. Genet.* 255, 1-8.
- NARANJO, T. & FERNÁNDEZ-RUEDA, P., 1996. Pairing and recombination between individual chromosomes of wheat and rye in hybrids carrying the *Ph1b* mutation. *Theor. Appl. Genet.* 93, 242-248.
- NASUDA, S., FRIEBE, B. & GILL, B.S., 1998. Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat. *Genetics* 149, 1115-1124.

- NIKIFOROV, T.T., RENDLE, R.B., GOELET, P., *et al.*, 1994. Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucl. Acids Res.* 22, 4167-4175.
- NUZHIDIN, S.V. & PETROV, D., 2002. Transposable elements in clonal population: lethal hangover from sex. *Biological Journal of the Linnean Society*.
- OGIWARA, I., MIYA, M., OHSHIMA, K., *et al.*, 1999. Retropositional parasitism of SINEs on LINEs: identification of SINEs and LINEs in elasmobranchs. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1238-1250.
- PANSTRUGA, R., BÜSCHGES, R., PIFFANELLI, P., *et al.*, 1998. A contiguous 60 kb genomic stretch from barley reveals molecular evidence for gene islands in a monocot genome. *Nucl. Acids Res.* 26, 1056-1062.
- PARAN, I., & MICHELMORE, R.W., 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew and genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85, 985-993.
- PARKS, C., CHANG, L.-S. & SHENK, T., 1991. A polymerase chain reaction mediated by a single and: cloning of genomic sequences adjacent to a serotonin receptor protein coding region. *Nucl. Acids Res.* 19, 7155-7160.
- PASYUKOVA, E.G., NUZHIDIN, S.V., MOROZOVA, T.V., *et al.*, 2002. Accumulation of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster* is associated with a decrease in fitness. *Molecular & General Genetics*.
- PEARCE, S.R., HARRISON, G., LI, D., *et al.*, 1996. The *Ty1-copia* group of retrotransposons in *Vicia* species: Copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Mol. Gen. Genet.* 205, 305-315.
- PIANKA, E.R., 2000. *Evolutionary ecology*, 6de uitg., Benjamin Cummings, San Francisco, Kalifornië.
- PLASCHKE, J., GANAL, M. & RÖDER, M., 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91, 1001-1007.
- POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., *et al.*, 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding* 2, 225-238.
- POWELL, W., THOMAS, W.T.B., BAIRD, E., *et al.*, 1997. Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity* 79, 48-59.

- PRICE, Z., SCHULMAN, A.H. & MAYES, S., 2003. Development of new marker methods-an example from oil palm. *Plant Genet. Resour.*
- QI, L., ECHALIER, B., FRIEBE, B., GILL, B.S., 2003. Molecular characterization of a set of wheat deletion stocks for use in chromosome bin mapping of ESTs. *Funct. Integr. Gen.* 3, 39-55.
- QI, X., STAM, P. & LINDHOUT, P., 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet.* 96, 376-384.
- RAJARAM, S., MANN, C.E., ORTIZ-FERRARA, G., *et al.*, 1983. Adaptation, stability and high yield potential of certain IB/IR CIMMYT wheats. ble. 613-621. *In*: S. Sakamoto (red.). Proceedings of the 6th International Wheat Genetics Symposium. 28 November-3 December 1983, Kyoto, Japan, Plant Germplasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto Universiteit, Kyoto, Japan.
- RAMSAY, L., MACAULAY, M., CARLE, L., *et al.*, 1999. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. *Plant J.* 17, 415-425.
- RASKINA, O., BELYAYEV, A. & NEVO, E., 2002. Repetitive DNAs of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and their relation to S-genome species: molecular cytogenetic analysis. *Genome* 45, 391-401.
- RASKINA, O., BELYAYEV, A. & NEVO, E., 2004a. Activity of the *En/S.p.m.*-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Res.* 12, 153-161.
- RASKINA, O., BELYAYEV, A. & NEVO, E., 2004b. Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA clusters variability in natural populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14818-14823.
- REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMANN, K.A., *et al.*, 1991. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1477-1481.
- REITER, R., 2001. PCR-based marker systems., ble.9-29. *In*: R.L. Phillips en I.K. Vasil (reds.). Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, vol.6: DNA-Based Markers in Plants. 2de uitgawe., Kluwer Akademische Uitgewers, Dordrecht, Nederland.

- RILEY, R., CHAPMAN, V., & JOHNSON, R., 1968. Introduction of yellow rust and of *Aegilops comosa* into wheat by genetically induced homoeologous recombination. *Nature (London)* 217, 383-384.
- RILEY, R., UNRAU, J. & CHAPMAN, V., 1958. Evidence on the origin of the B genome of wheat. *J. Hered.* 49, 91-98.
- RÖDER, M.S., KORZUN, V., WENDEHAKE, K., *et al.*, 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149, 2007-2023.
- RÖDER, M.S., PLASCHKE, J., KÖNIG, S.U., *et al.*, 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246, 327-333.
- ROELFS, A.P., SINGH, R.P. & SAARI, E.E., 1992. 'Rust Diseases of Wheat, Concepts and Methods of Disease Management.' CIMMYT, Meksiko.
- SABOT, F., SOURDILLE, P., CHANTRET, N., *et al.*, 2006. Morgane, a new LTR retrotransposon group, and its subfamilies in wheats. *Genetica* 128, 439-447.
- SALINA, E.A., ADONINA, I.G., VATOLINA, T.Y. *et al.*, 2004. A comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch. and related species. *Genetica* 122, 227-237.
- SALINA, E.A., PESTSOVA, E.G. & VERSHININ, A.V., 1997. Spelt1 – new family of cereal tandem repeats. *Russ. J. Genet.* 33, 352-357. (Artikel in Russies).
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SANMIGUEL, P., TIKHONOV, A., JIN, Y.K., *et al.*, 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274, 765-768.
- SANMIGUEL, P. & BENNETZEN, J.L., 1998. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Ann. Bot.* 82, 37-44.
- SANMIGUEL, P., GAUT, B.S., TIKHONOV, A., *et al.*, 1998. The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature Genet.* 20, 43-45.
- SASANUMA, T., MIYASHITA, N.T. & TSUNEWAKI, K., 1996. Wheat phylogeny determined by RFLP analyse van nuclear DNA. 3. Intra- and interspecific variations of the five *Aegilops-Sitopsis* species. *Theor. Appl. Genet.* 92, 928-934.
- SCHULMAN, A.H., FLAVELL, A.J. & ELLIS, T.H.N., 2004. The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants. ble.145-188. In: W. J. Miller en P. Capy (reds.). *Methods in Molecular Biology*, vol.260: Mobile Genetic Elements. Humana Pers Geïnk., Totowa, New Jersey.

- SCOLES, G.J. & KIBIRGE-SEBUNYA, I.N., 1983. Preferential abortion of gametes in wheat induced by an *Agropyron* chromosome. *Can. J. Genet. Cytol.* 25, 1-6.
- SEARS, E.R., 1956. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellutata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.* 9, 1-22.
- SEARS, E.R., 1972. Chromosome engineering in wheat. *Stadler Genet. Symp.* 4, 23-38.
- SEARS, E.R., 1976. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annu. Rev. Genet.* 10, 31-51
- SEARS, E.R., 1981. Transfer of alien genetic material to wheat. ble. 75-89. In: L.T. Evans en W.J. Peacock (reds). Wheat science-today and tomorrow. Cambridge Universiteits Pers, Cambridge
- SEARS, E.R., 1984. Mutations in wheat that raise the level of meiotic chromosome pairing. *Stadler Gent. Symp.* 16, 295-300.
- SEARS, E.R., 1993. Use of radiation to transfer alien segments to wheat. *Crop Sci.* 33, 897-901.
- SEBESTA, E.E., WOOD, E.A., PORTER, D.R., *et al.*, 1995. Registration of Amigo wheat germplasm resistant to greenbug. *Crop Sci.* 35, 293.
- SHAH, M.M., GILL, K.S., BAENZIGER, P.S., *et al.*, 1999. Molecular mapping of loci for agronomic traits on chromosome 3A of bread wheat. *Crop. Sci.* 39, 1728-1732.
- SHEDLOCK, A.M. & OKADA, N., 2000. *SINE* insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays* 22, 148-160.
- SHIRASU, K., SCHULMAN, A.H., LAHAYE, T., *et al.*, 2000. A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res.* 10, 908-915.
- SINGH, R.J., 2003. Plant cytogenetics, 2de uitg., CRC Pers, Boca Raton, Fla.
- SOMERS, D.J., ISSAC, P & EDWARDS, K., 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109, 1105-114.
- SOURDILLE, P., SINGH, S., CALDALEN, T., *et al.*, (2004). Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct. Integr. Gen.* 4, 12-25.
- SPIRITO, F., 2001. The role of chromosomal change in speciation. ble. 320-329. In: D.J. Howard en S.H. Berlocher (reds.), Endless Forms, Oxford Universiteits Pers, New York.

- STAGINNUS, C., HUETTEL, B., DESEL, C., *et al.*, 2001. A PCR-based assay to detect *En/Spm*-like transposon sequences in plants. *Chromosome Res.* 9, 591-605.
- SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K., ARNA, T., *et al.*, 1996. Retrotransposon *BARE-1* is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. *Plant Mol. Biol.* 30, 1321-1329.
- THOMAS, C.A., 1971. The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 5, 237-256.
- TIMOFEEFF-RESSOVSKY, N.W., VORONTSOV, N.N. & YABLOKOV, A.V., 1977. Evolutionary Theory Essay. Moscow: Nauka [Artikel in Russies].
- TINGEY, S.V., RAFALSKI, J.A. & WILLIAMS, J.G.K., 1992. Genetic analysis with RAPD markers. ble. 3-8. In: Proceedings of the Symposium, Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Crop Sci. Soc./Amer. Soc. Hort. Sci./Amer. Genet. Assoc.
- TORADA, A., KOIKE, M., MOCHIDA, K., *et al.*, 2006. SSR-based linkage map with new markers using an intraspecific population of common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 112, 1042-1051.
- TSUJIMOTO, H., 1995. Gametocidal genes in wheat and its relatives. IV. Functional relationships between six gametocidal genes. *Genome* 38, 283-289.
- TSUJIMOTO, H. & TSUNEWAKI, K., 1983. Genetic analyses on a gametocidal gene originated from *Aegilops aucheri*. ble. 1077-1081. In: Proceedings of the 6th International Wheat Genetics Symposium, Kyoto, Japan,
- TSUJIMOTO, H. & TSUNEWAKI, K., 1984. Gametocidal genes in wheat and its relatives. I. Genetic analysis in common wheat of a gametocidal gene derived from *Aegilops speltoides*. *Can. J. Genet. Cytol.* 26, 78-84.
- TSUJIMOTO, H. & TSUNEWAKI, K., 1985a. Hybrid dysgenesis in common wheat caused by gametocidal genes. *Jpn. J. Genet.* 60, 565-578.
- TSUJIMOTO, H. & TSUNEWAKI, K., 1985b. Gametocidal genes in wheat and its relatives. II. Suppressor of the chromosome 3C gametocidal gene of *Aegilops triuncialis*. *Can. J. Genet. Cytol.* 27, 178-185.
- TSUJIMOTO, H. & TSUNEWAKI, K., 1988. Gametocidal genes in wheat and its relatives. III. Chromosome location and effects of two *Aegilops speltoides*-derived gametocidal genes in common wheat. *Genome* 30, 239-244.
- TSUNEWAKI, K. (red.), 1980. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. Jpn. Soc. Promo. Sci. ,Tokyo.

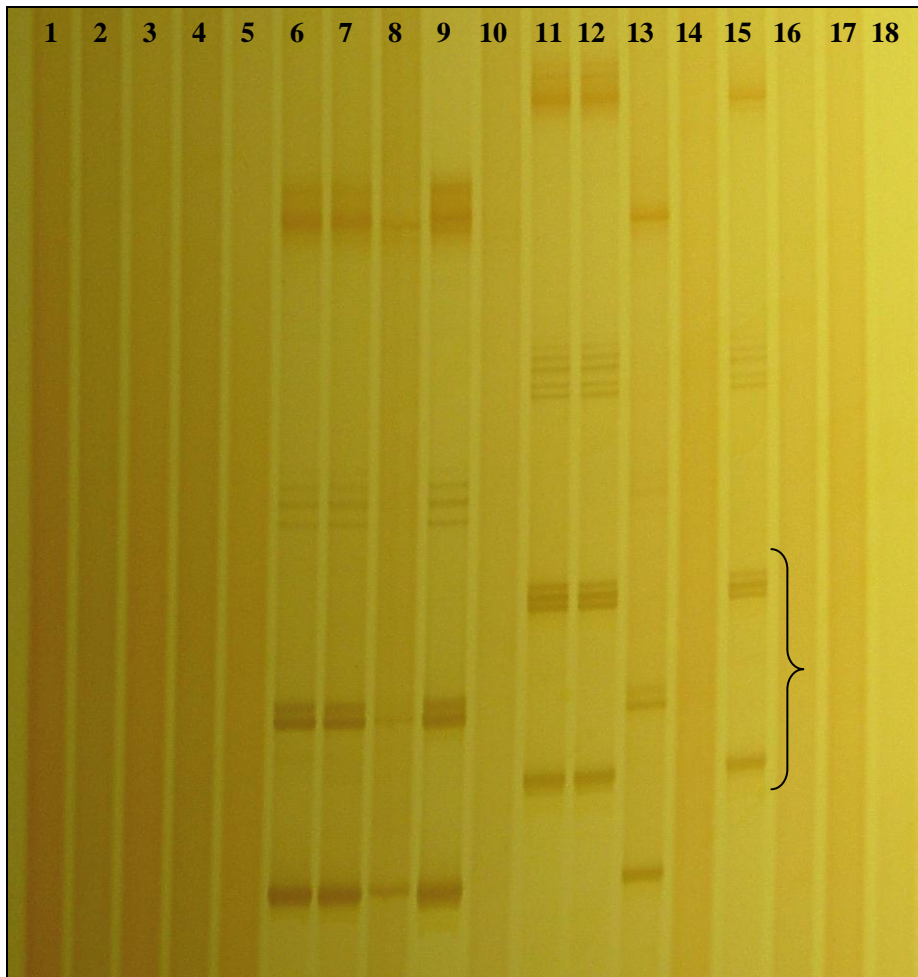
- TURCOTTE, K., SRINIVASAN, S. & BUREAU, T., 2001. Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *Plant J.* 25, 169-179.
- UNSAI, K. & MORGAN, G.T., 1995. A novel group of families of short interspersed repetitive elements (SINEs) in *Xenopus*: evidence of a specific target site for DNA-mediated transposition of inverted-repeat SINEs. *J. Mol. Biol.* 248, 812-823.
- VAN DEN BROECK, D., MAES, T., SAUER, M., *et al.*, 1998. Transposon Display identifies individual transposable elements in high copy number lines. *Plant J.* 13, 121-129.
- VARAGONA, M.J., PURUGGANAN, M. & WESSLER, S.R., 1992. Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into maize *waxy* gene. *Plant Cell* 4, 811-820.
- VENTER, J.C., ADAMS, M.D., MYERS, E.W., *et al.*, 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science* 291, 1304-1351.
- VINCIENT, C.M., SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K., *et al.*, 1999. Retrotransposon *BARE-1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *Plant Cell* 11, 1769-1784.
- VICIENT, C.M., JÄÄSKELÄINEN, M., KALENDAR, R., *et al.*, 2001. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiol.* 125, 1283-1292.
- VILLAREAL, R.L., BANUELOS, O., MUJEEB-KAZI, A., *et al.*, 1998. Agronomic performance of chromosomes 1B and TIBL.1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82. *Euphytica* 103, 195-202.
- VOGEL, J.M. & MORGANTE, M., 1992. A microsatellite-based multiplexed genome assay. *In: Plant Genome III Conference, San Diego, Kalifornië.*
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., *et al.*, 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 21, 4407-4414.
- VUYLSTEKE, M., ANONISE, R., BASTIAANS, E., *et al.*, 1997. A high density AFLP Linkage map of *Zea mays* L. bl. 104. *In: Final Program and Abstracts Guide, Plant and Animal Genome V, Abs. P206.*
- WANG, E., XING, H., WEN, Y., *et al.*, 1998. Molecular and biochemical characterization of a non-Robertsonian wheat-rye chromosome translocation line. *Crop Sci.* 38, 1076-1080.

- WANG, D., SAPOLSKY, R., SPENCER, J., *et al.*, 1996. Toward a third generation genetic map of the human genome based on bi-allelic polymorphisms. *Am. J. Human Genet.*, 59 supplement p. A3.
- WAUGH, R., MCLEAN, K., FLAVELL, A.J., *et al.*, 1997. Genetic distribution of *BARE-1*-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (SSAP). *Mol. Gen. Genet.* 253, 687-694.
- WESSLER, S.R., 1988. Phenotypic diversity mediated by the maize transposable elements *Ac* and *Smp*. *Science* 242, 399-405.
- WESSLER, S.R., BUREAU, T.E. & WHITE, S.E., 1995. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 814-821.
- WHITE, M.J.D., 1978. Modes of Speciation. WH Freeman, San Francisco, Kalifornië.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18, 6531-6535.
- WITTE, C.P., LE, Q.H., BUREAU, T., *et al.*, 2001. Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 13778-13783.
- WRIGHT, S.I., LE, Q.H., SCHOEN, D.J., *et al.*, 2001. Population dynamics of an *Ac*-like transposable element in self-and cross-pollinating *Arabidopsis*. *Genetics* 158, 1279-1288.
- YOSHIOKA, K., HONMA, H., ZUSHI, M., *et al.*, 1990. Virus-like particle formation of *Drosophila* copia through autocatalytic processing. *EMBO J.* 9, 535-541.
- YOSHIOKA, Y., MATSUMOTO, S., KOJIMA, S., *et al.*, 1993. Molecular characterization of a short interspersed repetitive element from tobacco that exhibits sequence homology to specific tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6562-6566.
- YU, G.X. & WISE R.P., 2000. An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid *Avena*. *Genome* 43, 736-749.
- ZELLER, F.J., & HSAM, S.L.K., 1983. Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. ble. 161-173. *In*: S. Sakamoto (red.). Proceedings of the 6th International Wheat Genetics Symposium. 28 November – 3 December 1983, Plant Germplasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto Universiteit, Kyoto, Japan.

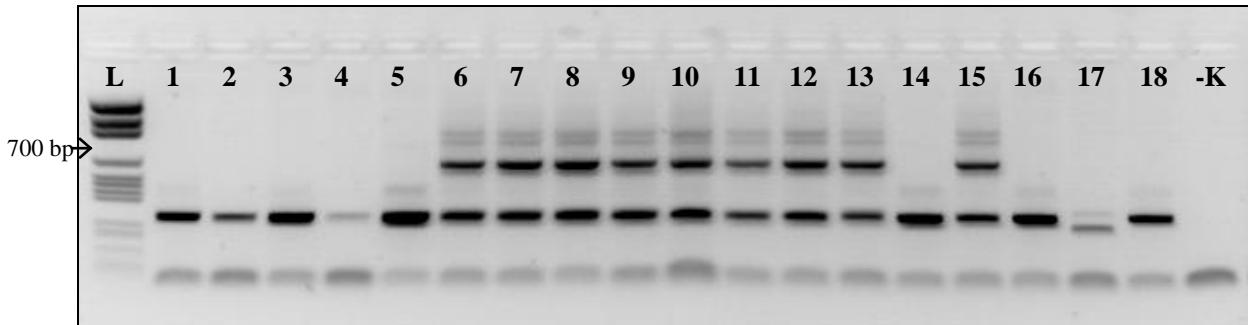
- ZHANG, Q., ARBUCKLE, J. & WESSLER, S.R., 2000. Recent, extensive and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family *Heartbreaker (Hbr)* into genic regions of maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 1160-1165.
- ZHOU, R.H., & DONG, Y.S., 1993. Exploration and identification of wild Triticeae germplasm of Northern China. pp. 105-110. In: Proceedings of the 8th International Wheat Genetics Symposium, Beijing, China.

ADDENDUM A

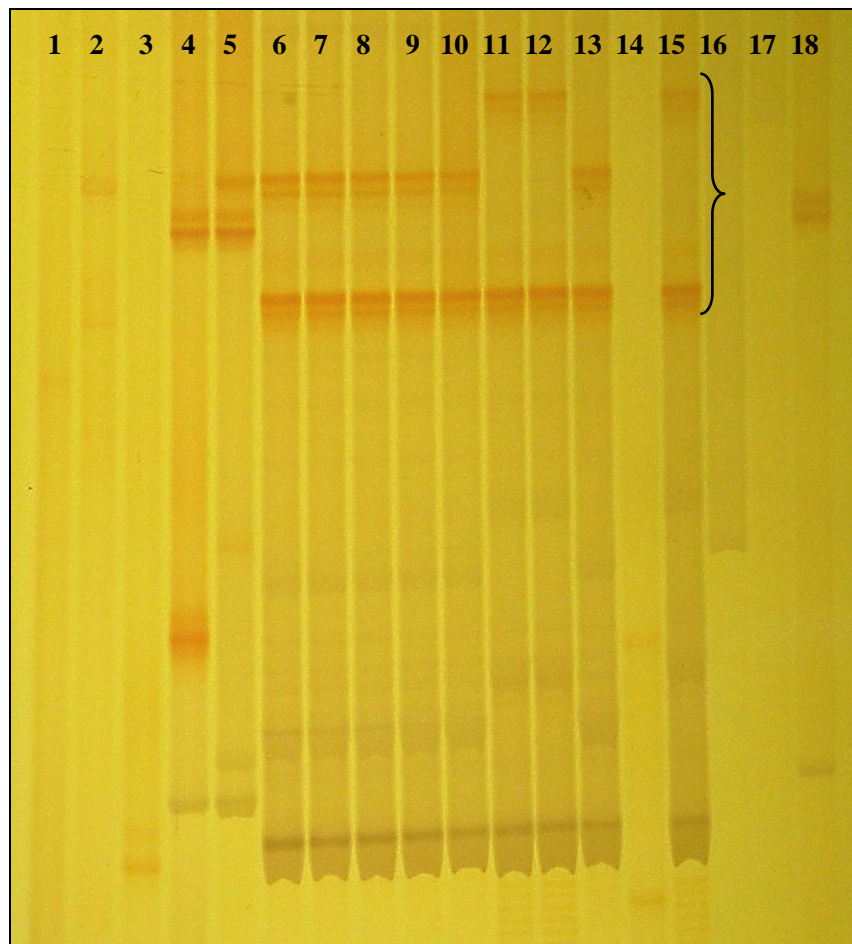
Agarose en poli-akriëlamied jelfoto's gebruik om die mikrosatellietmerkers te evalueer en Tabel 8 op te stel.



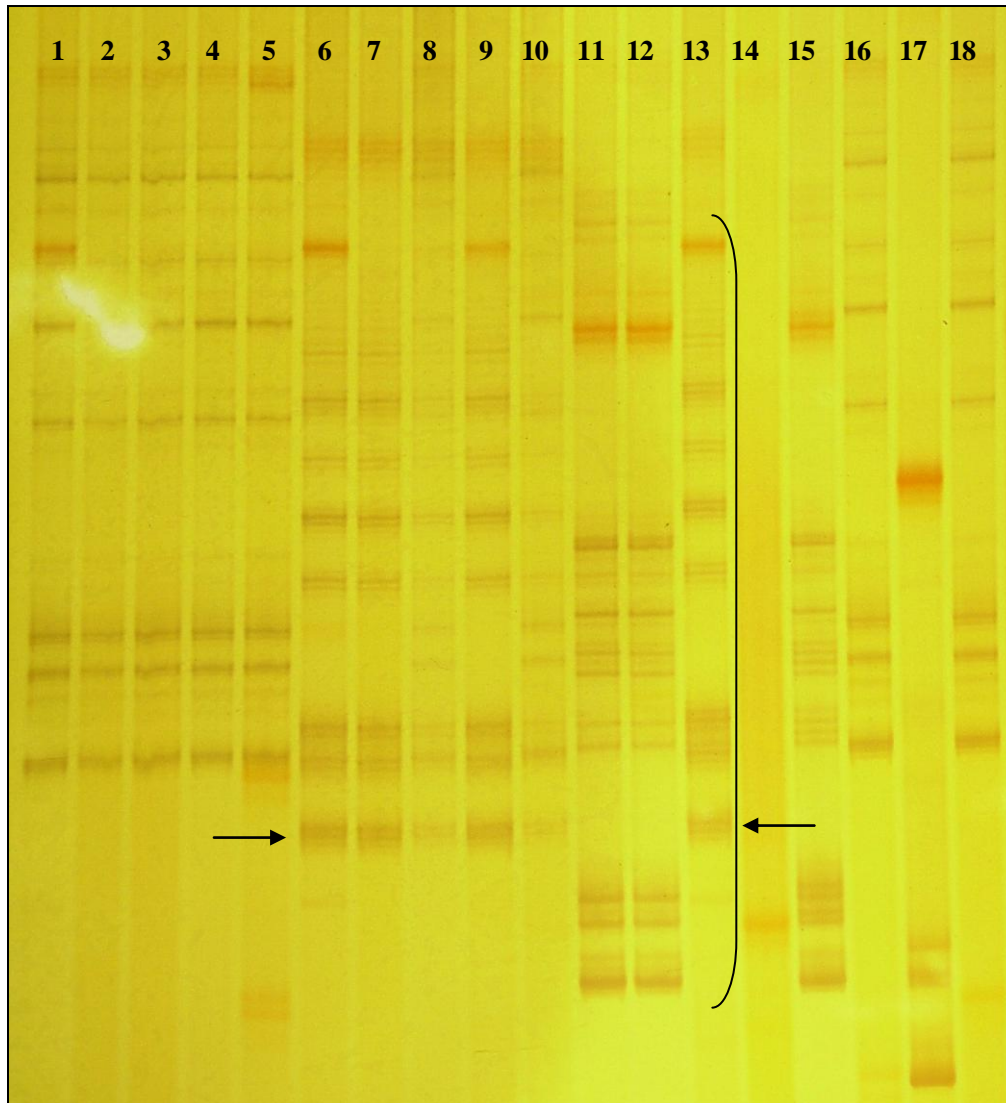
Figuur A1: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc57*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Kontrole-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



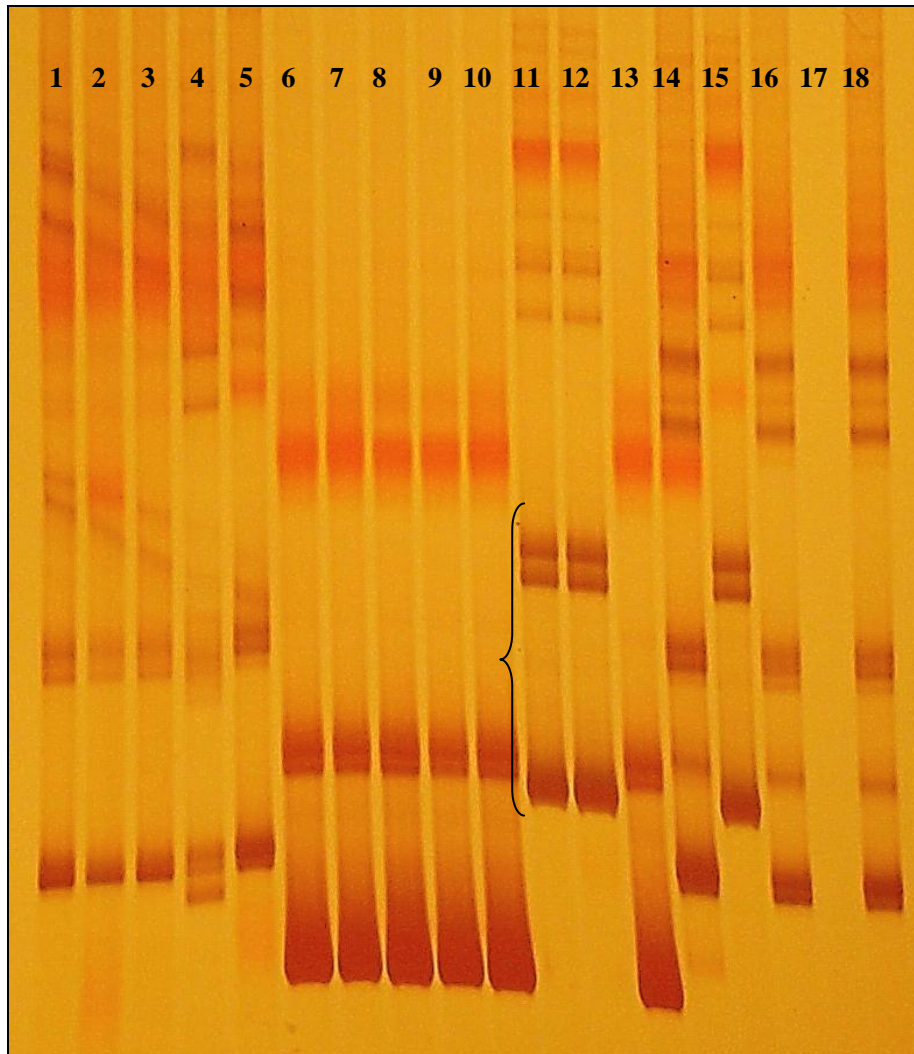
Figuur A2: Agarose jelfoto van RFLP-merker *XgIk683*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie. L – pGEM[®] 50 µg leer (pGEM[®] DNS Merkers; Sambrook *et al.*, 1989); -K – negatieve controle (water).



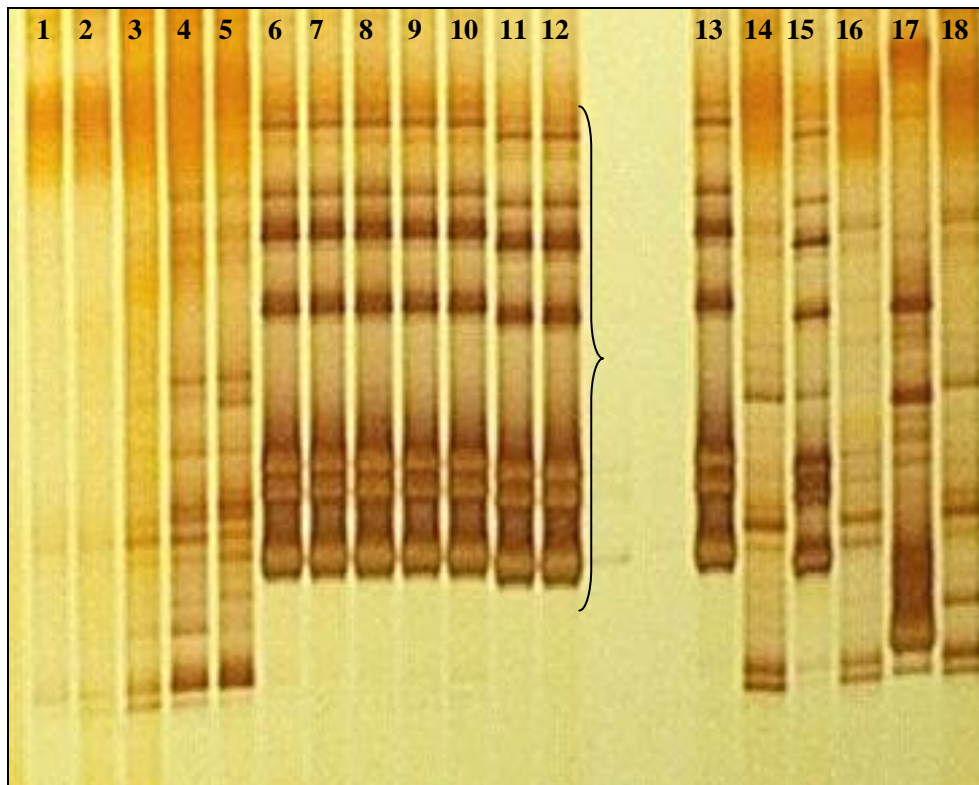
Figuur A3: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc294*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



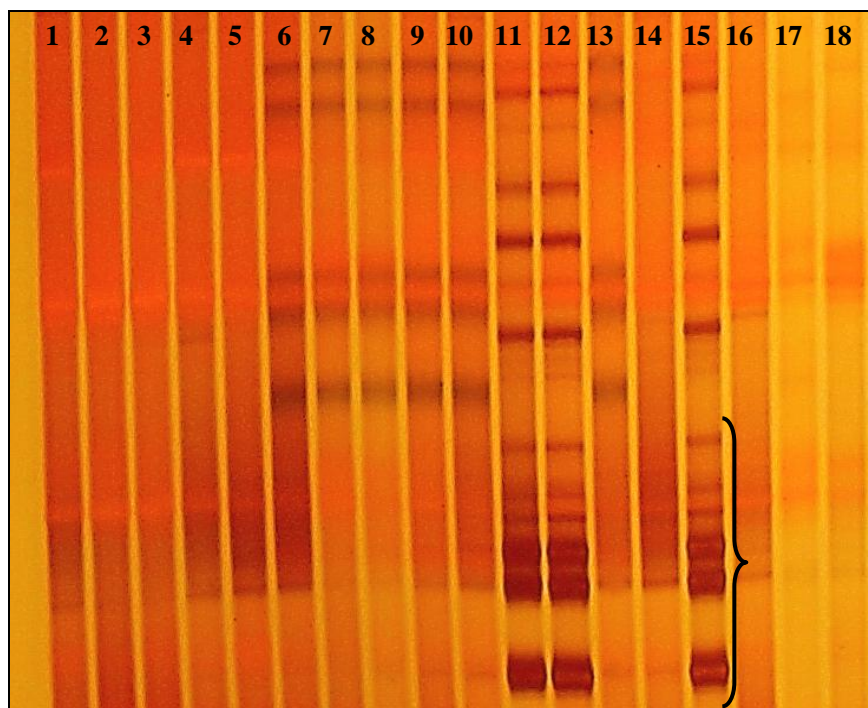
Figuur A4: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc310*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



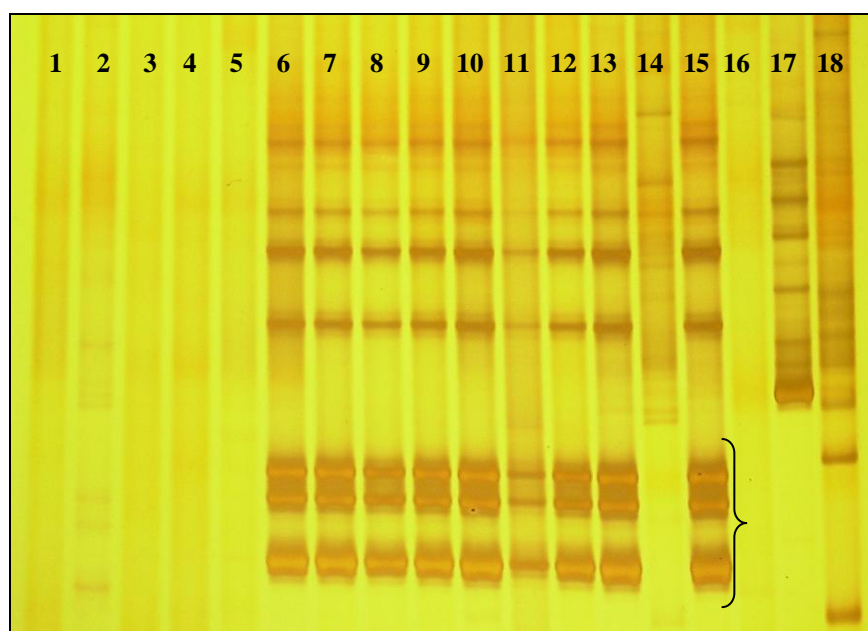
Figuur A5: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc12*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



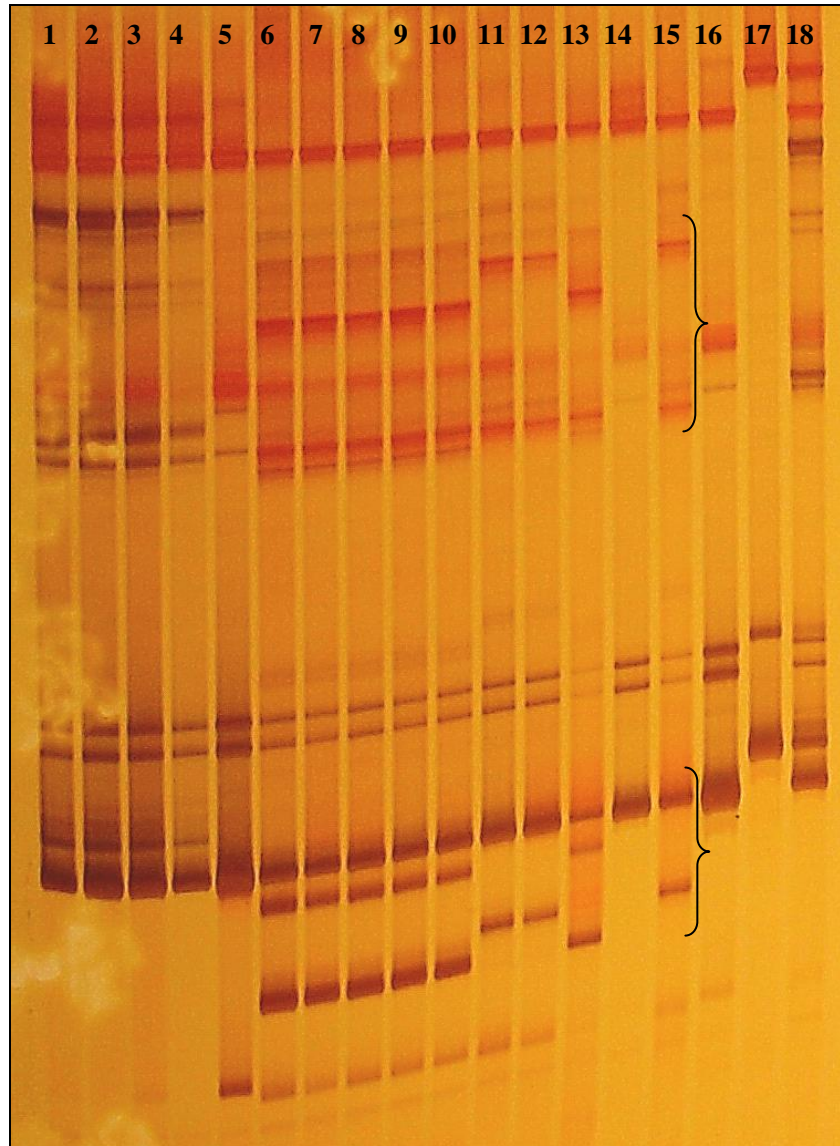
Figuur A6: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xwmc532*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



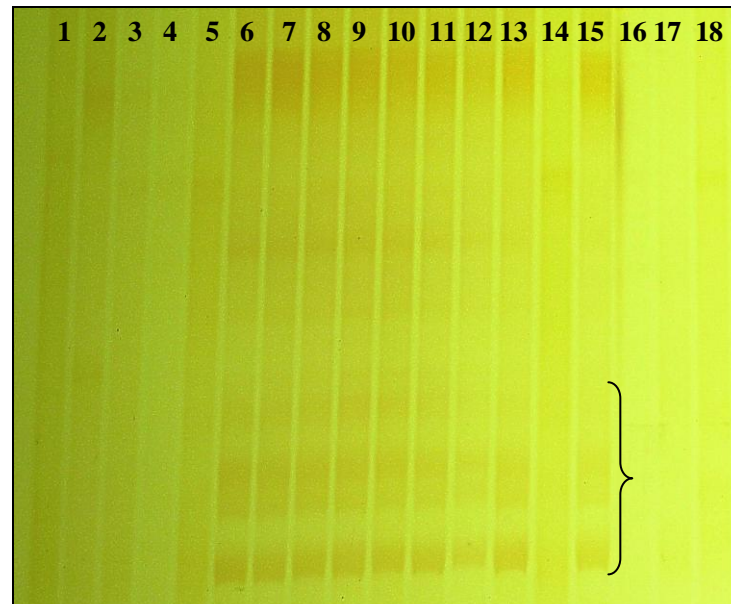
Figuur A7: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm369*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



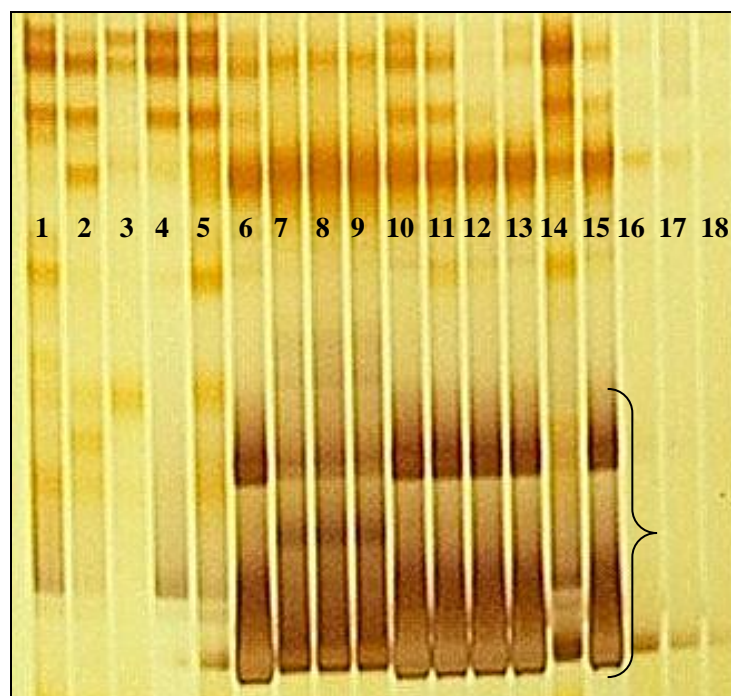
Figuur A8: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm218*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



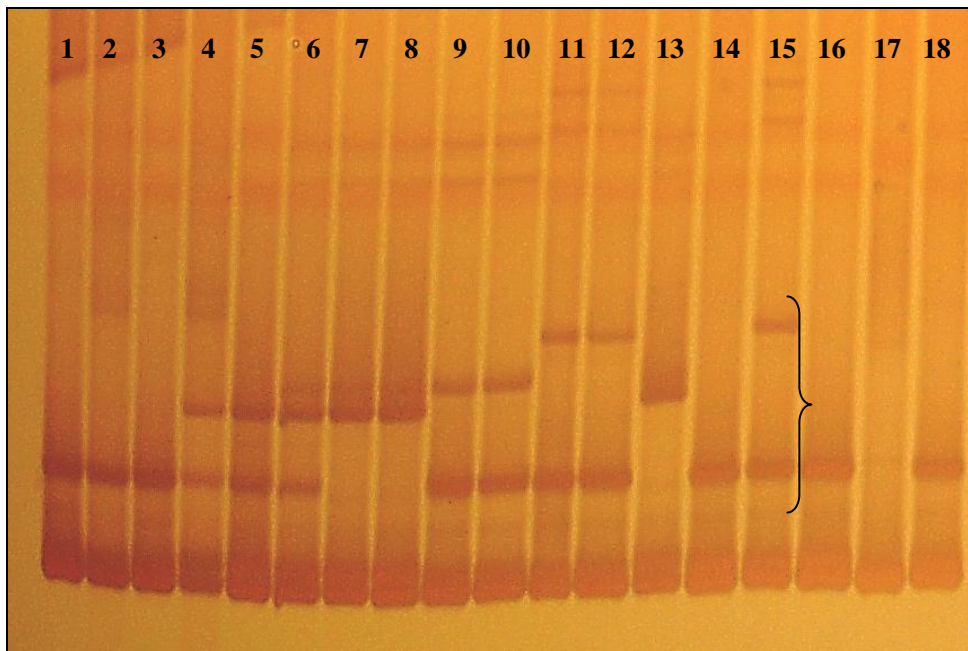
Figuur A9: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm2*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



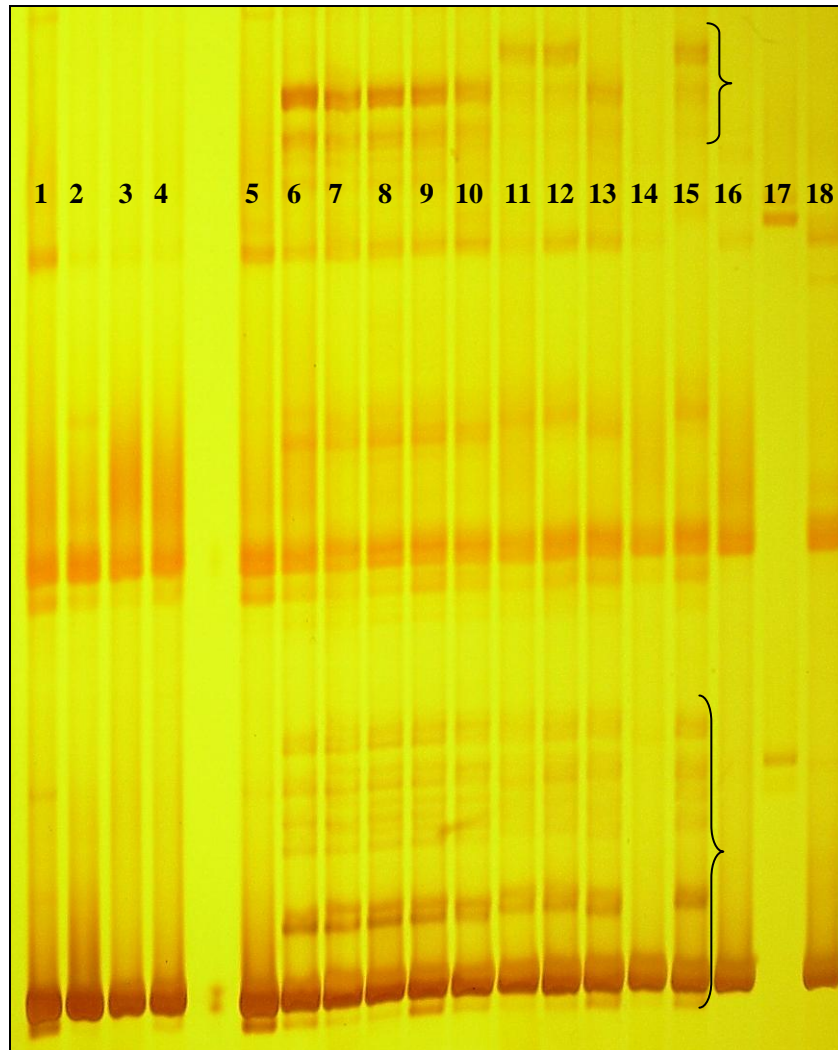
Figuur A10: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm5*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



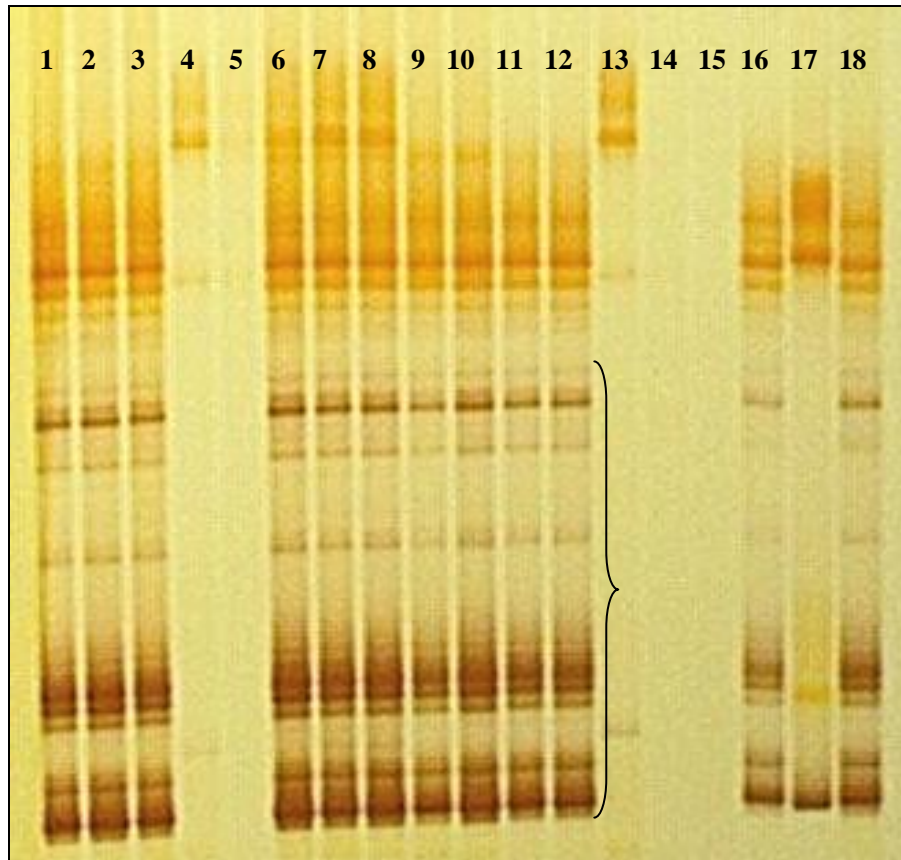
Figuur A11: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc45*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



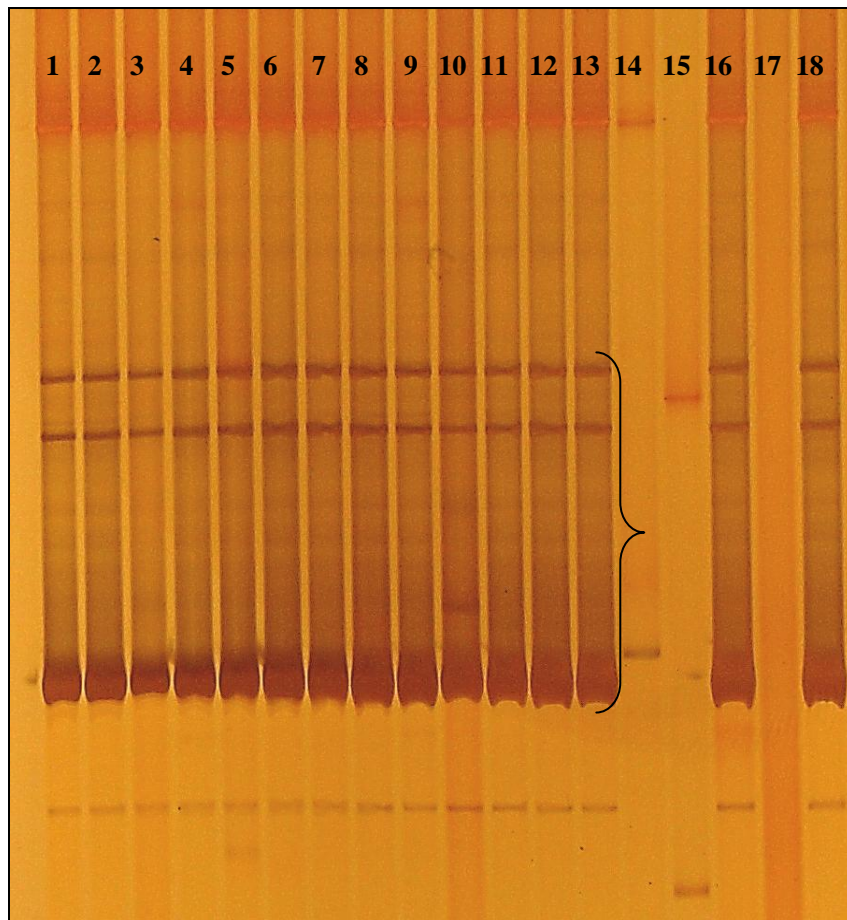
Figuur A12: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc19*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



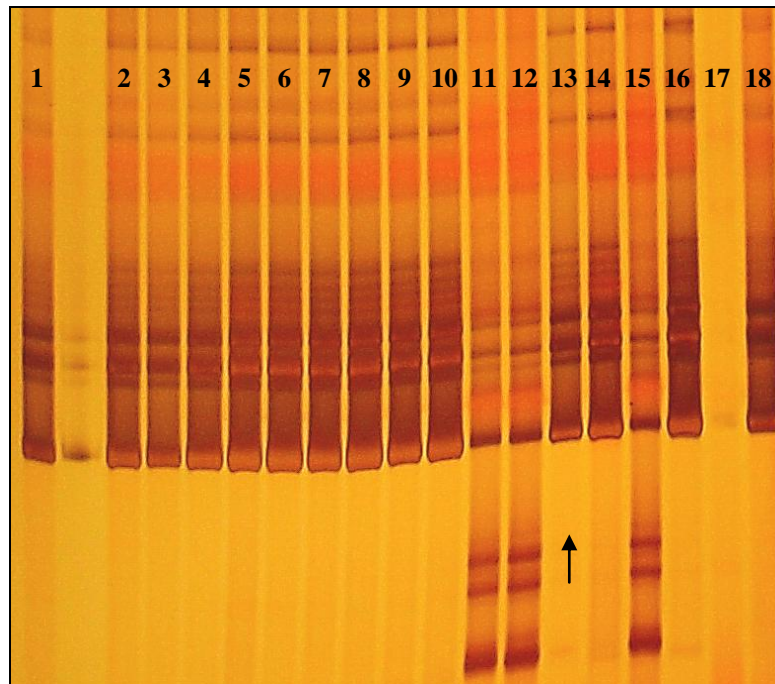
Figuur A13: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm674*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



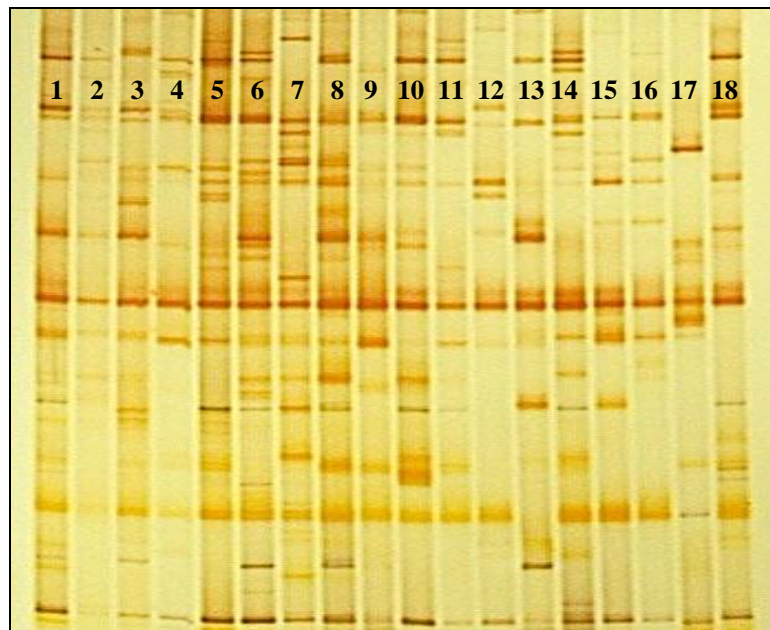
Figuur A14: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm391*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2); (11) CS. Controle-paneel; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



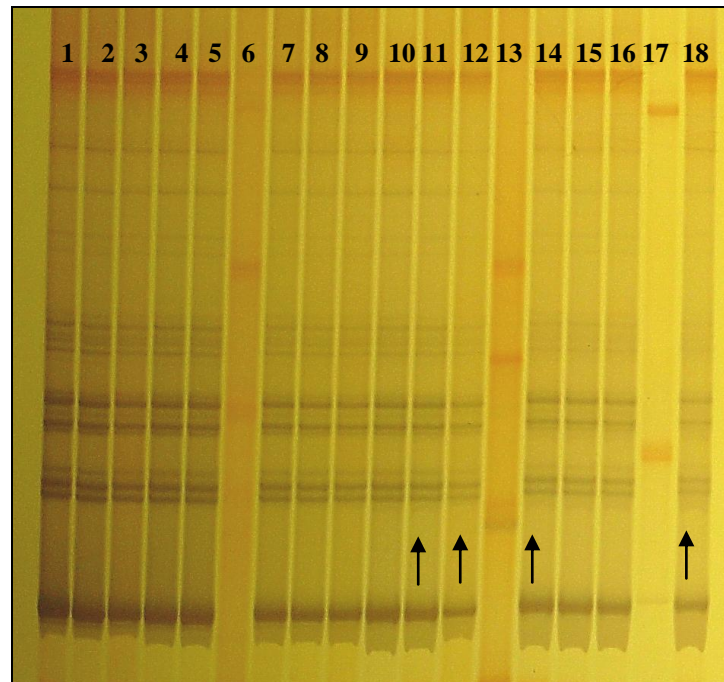
Figuur A15: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc1021*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) CSDT3AL/04M127-3A (1); (7) CSDT3AL/04M127-3A (2); (8) CSDT3AL/04M127-3A (3); (9) CSDT3AL/04M127-3F (1); (10) CSDT3AL/04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



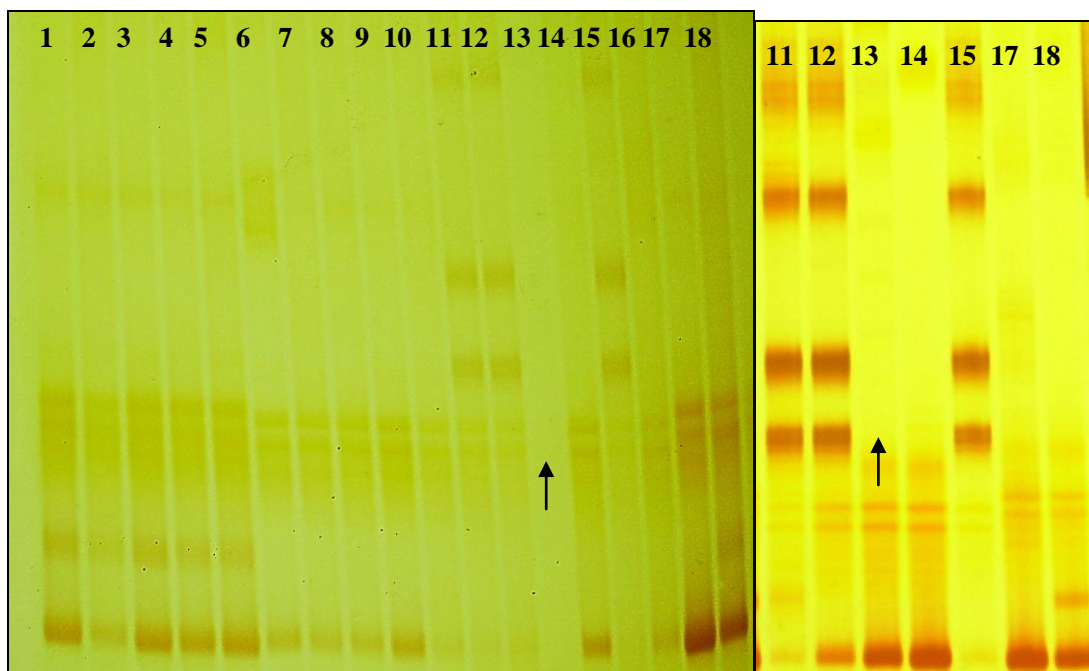
Figuur A16: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xwmc11*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-3A (1); (7) 04M127-3A (2); (8) 04M127-3A (3); (9) 04M127-3F (1); (10) 04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



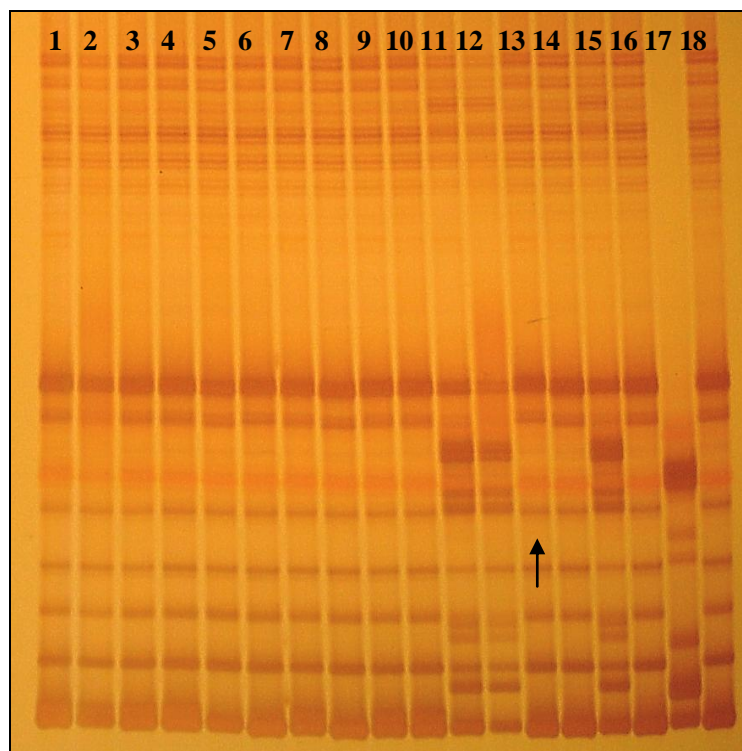
Figuur A17: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xcfd79*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-3A (1); (7) 04M127-3A (2); (8) 04M127-3A (3); (9) 04M127-3F (1); (10) 04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



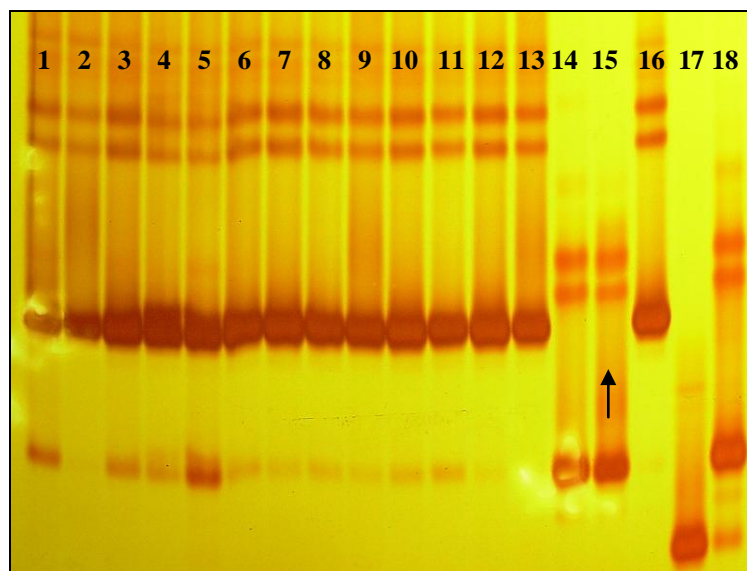
Figuur A18: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc284*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) 04M127-3A (1); (7) 04M127-3A (2); (8) 04M127-3A (3); (9) 04M127-3F (1); (10) 04M127-3F (2) Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



Figuur A19: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xwmc050*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL//W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL//W84-17/04M127-4; (6) 04M127-3A (1); (7) 04M127-3A (2); (8) 04M127-3A (3); (9) 04M127-3F (1); (10) 04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



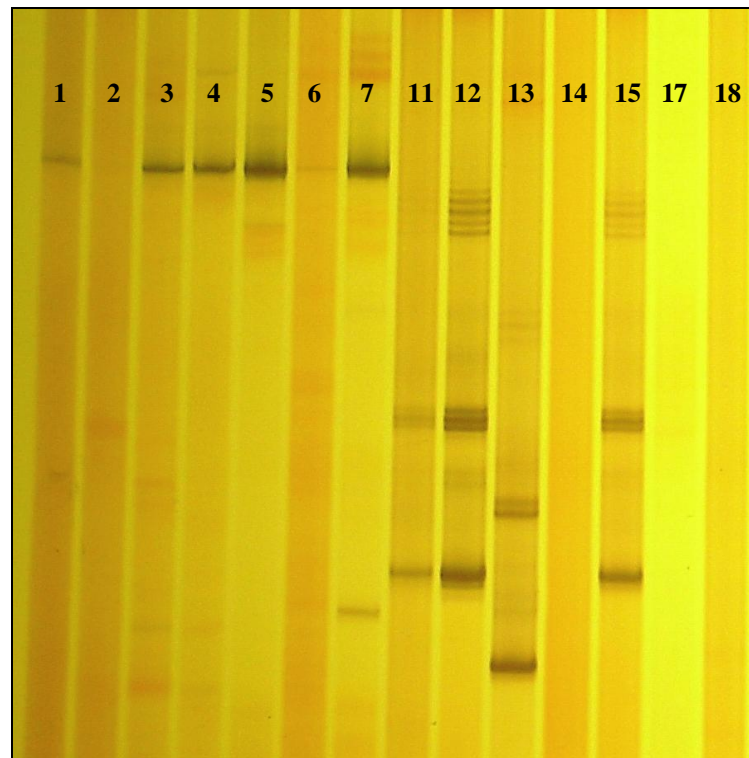
Figuur A20: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmarker *Xwmc475*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-3A (1); (7) 04M127-3A (2); (8) 04M127-3A (3); (9) 04M127-3F (1); (10) 04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



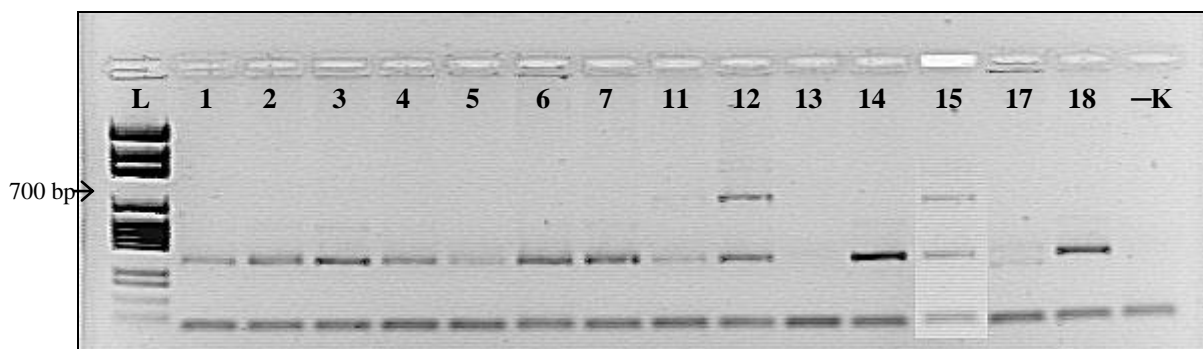
Figuur A21: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmarker *Xbarc67*. (1) CSDT3AL/04M127-1N; (2) CSDT3AL/W84-17/04M127-1; (3) CSDT3AL/04M127-2; (4) CSDT3AL/04M127-4; (5) CSDT3AL/W84-17/04M127-4; (6) 04M127-3A (1); (7) 04M127-3A (2); (8) 04M127-3A (3); (9) 04M127-3F (1); (10) 04M127-3F (2). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (16) CSDT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.

ADDENDUM B

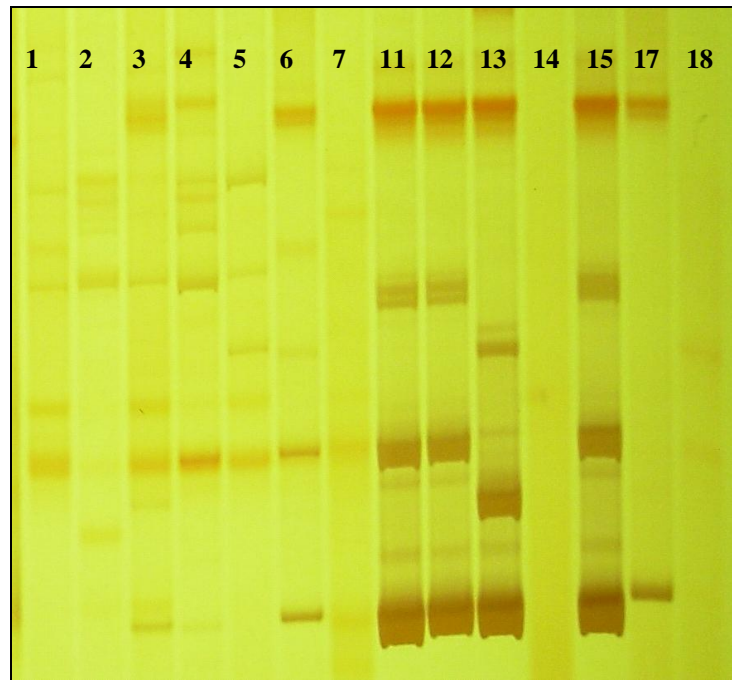
Agarose en poli-akriëlamied jelfoto's gebruik om Tabel 10 (rekombinante 3, 7, 11 en 12 asook die kontrole-paneel) op te stel.



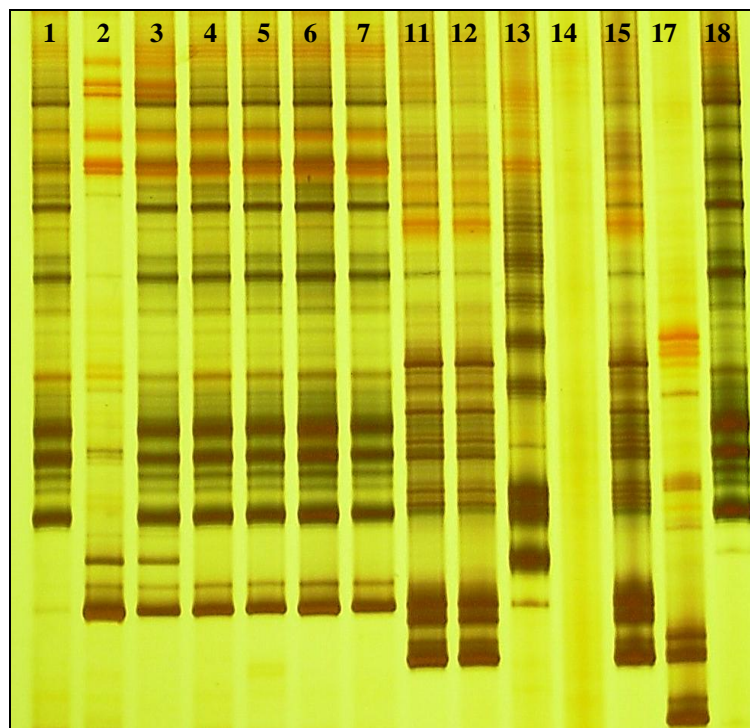
Figuur B1: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc57*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Kontrole-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSdT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



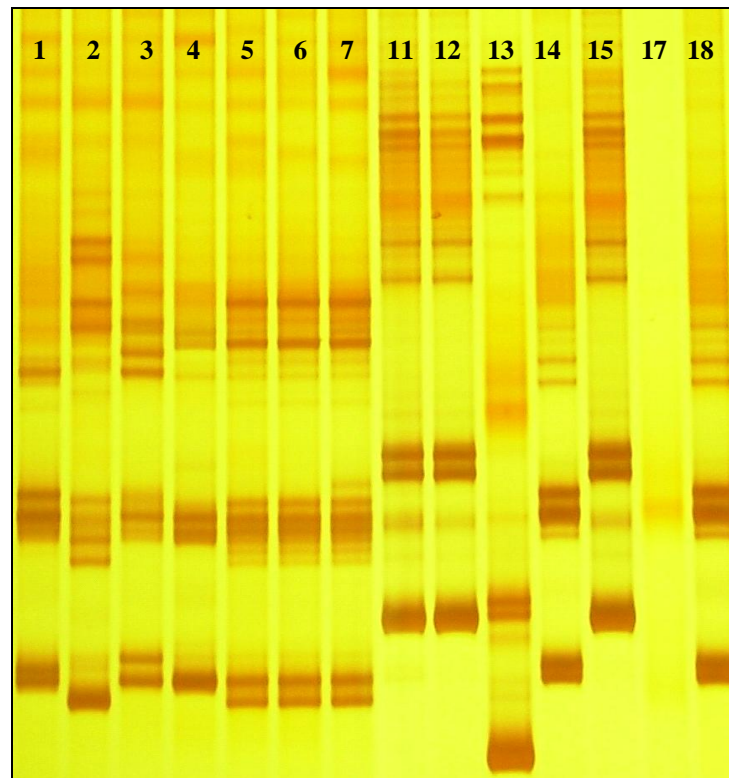
Figuur B2: Agarose jelfoto van RFLP-merker *Xglk683*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Kontrole-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSdT3AS; (16) CSdT3AL; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie. L – pGEM[®] 50 µg leer (pGEM[®] DNS Merkers; Sambrook *et al.*, 1989); -K – negatiewe kontrole (water).



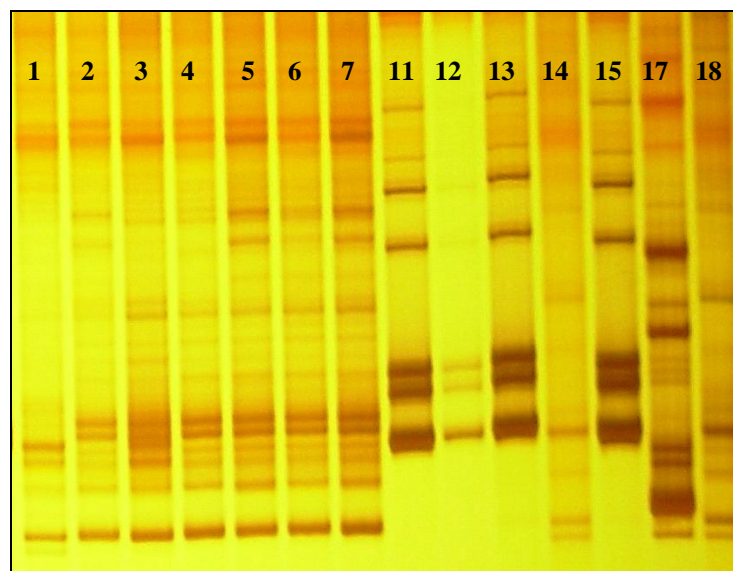
Figuur B3: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc294*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



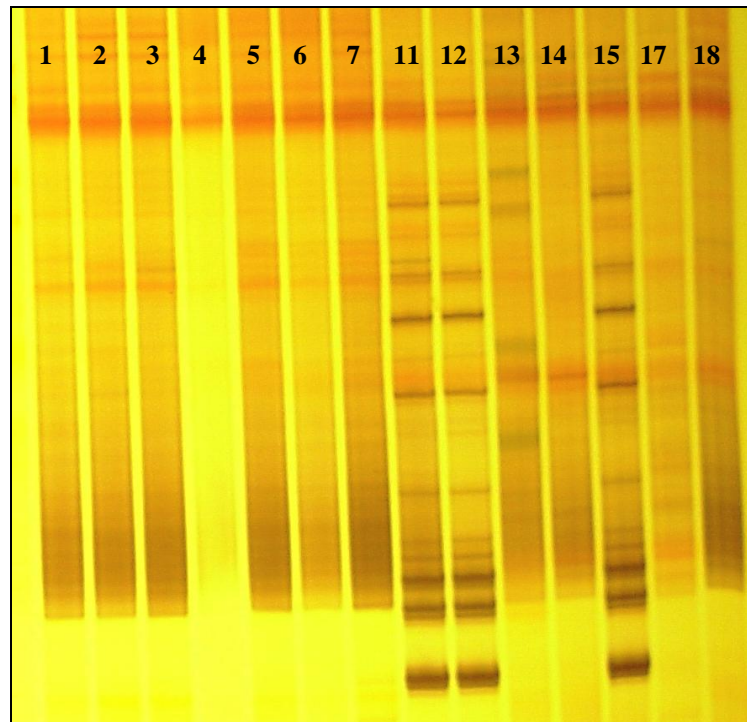
Figuur B4: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc310*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



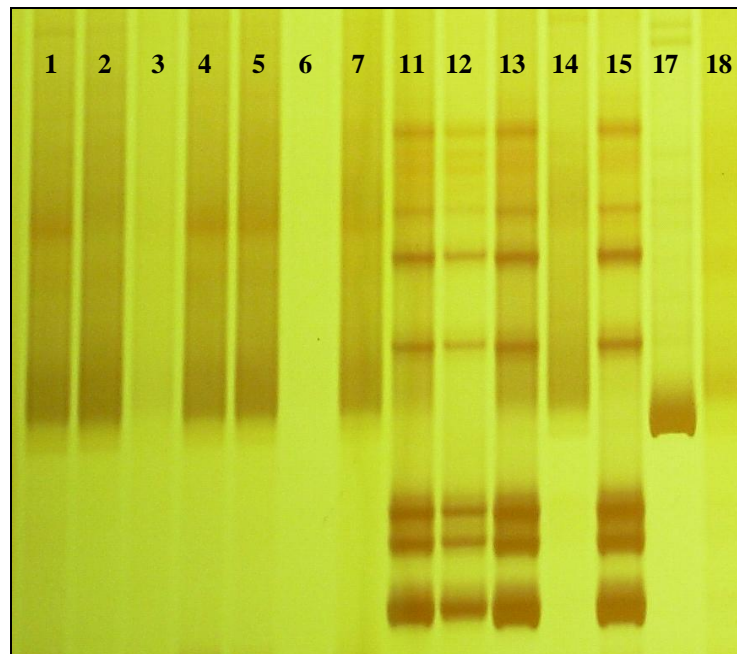
Figuur B5: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc12*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



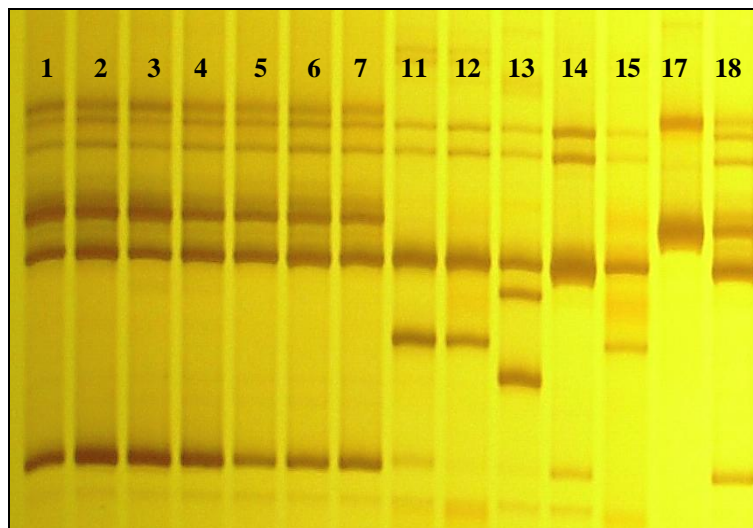
Figuur B6: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xwmc532*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



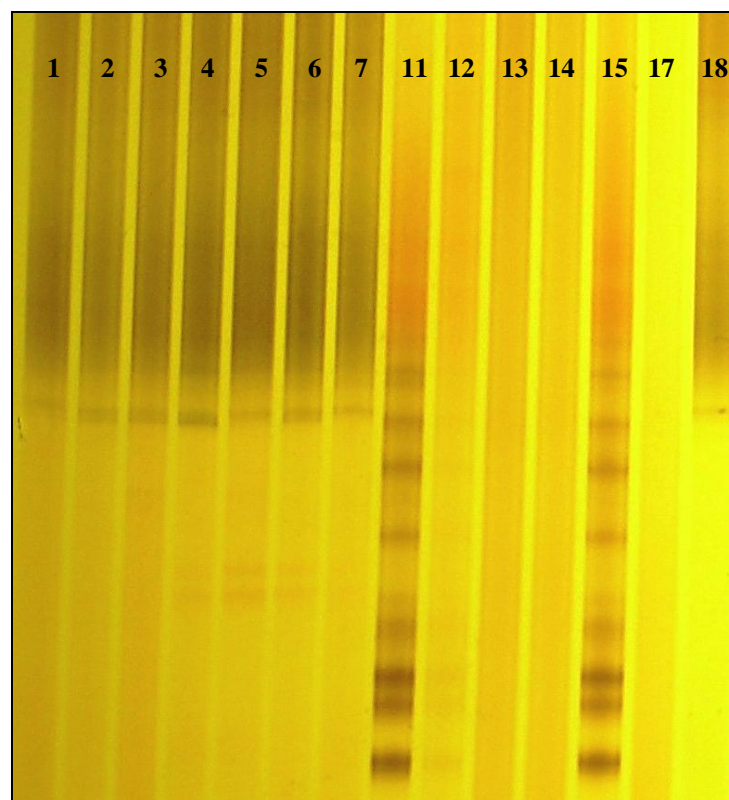
Figuur B7: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm369*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



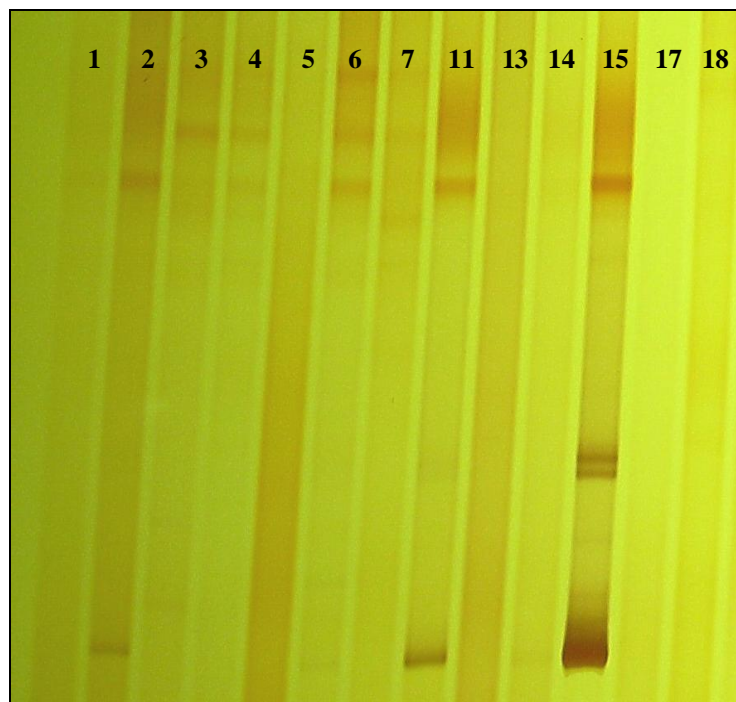
Figuur B8: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm218*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



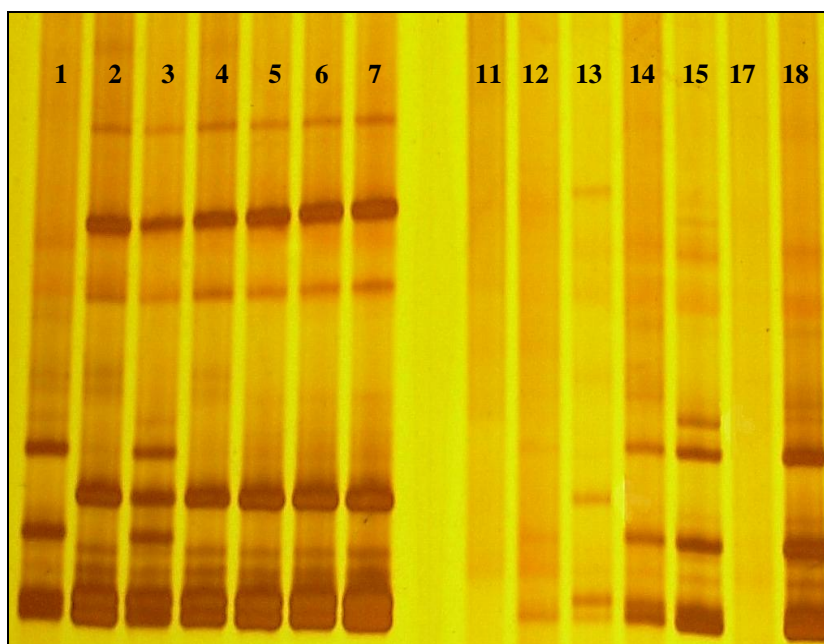
Figuur B9: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmarker *Xgwm2*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



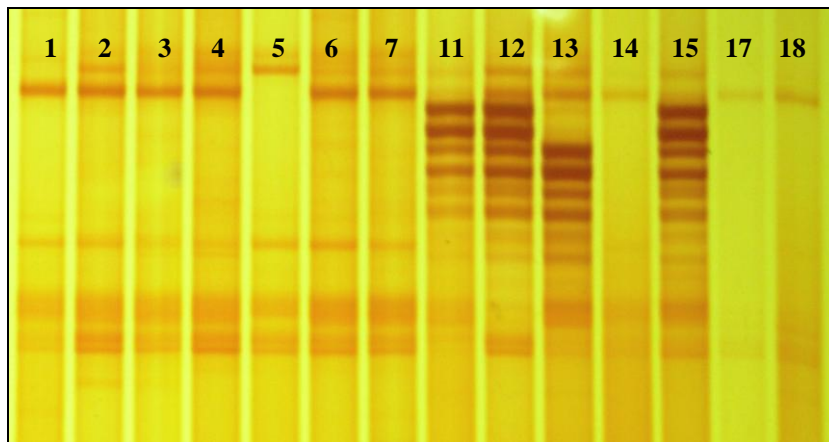
Figuur B10: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmarker *Xgwm5*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



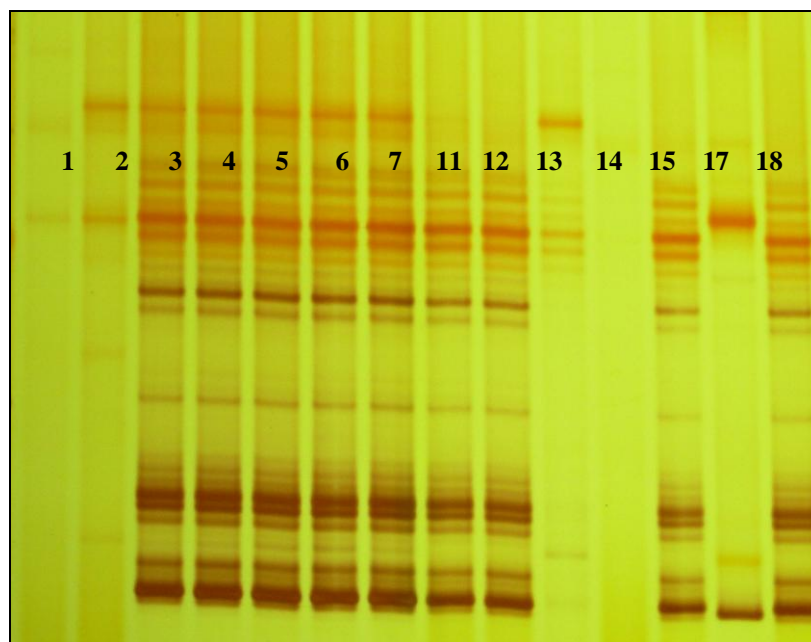
Figuur B11: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc45*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie. (Amplifikasie reaksies is herhaal en voorheen vermiste data is herwin en gebruik om Tabel 9 op te stel.)



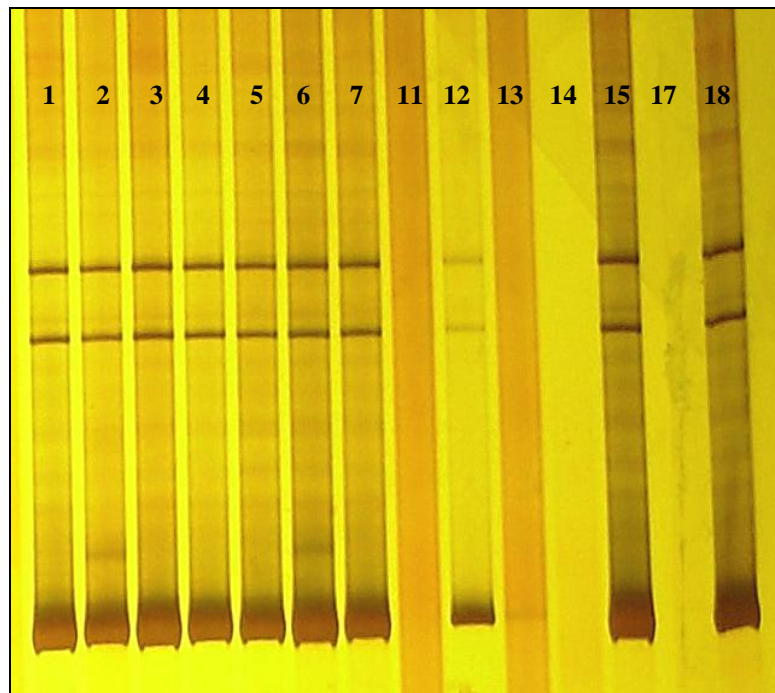
Figuur B12: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc19*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



Figuur B13: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm674*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



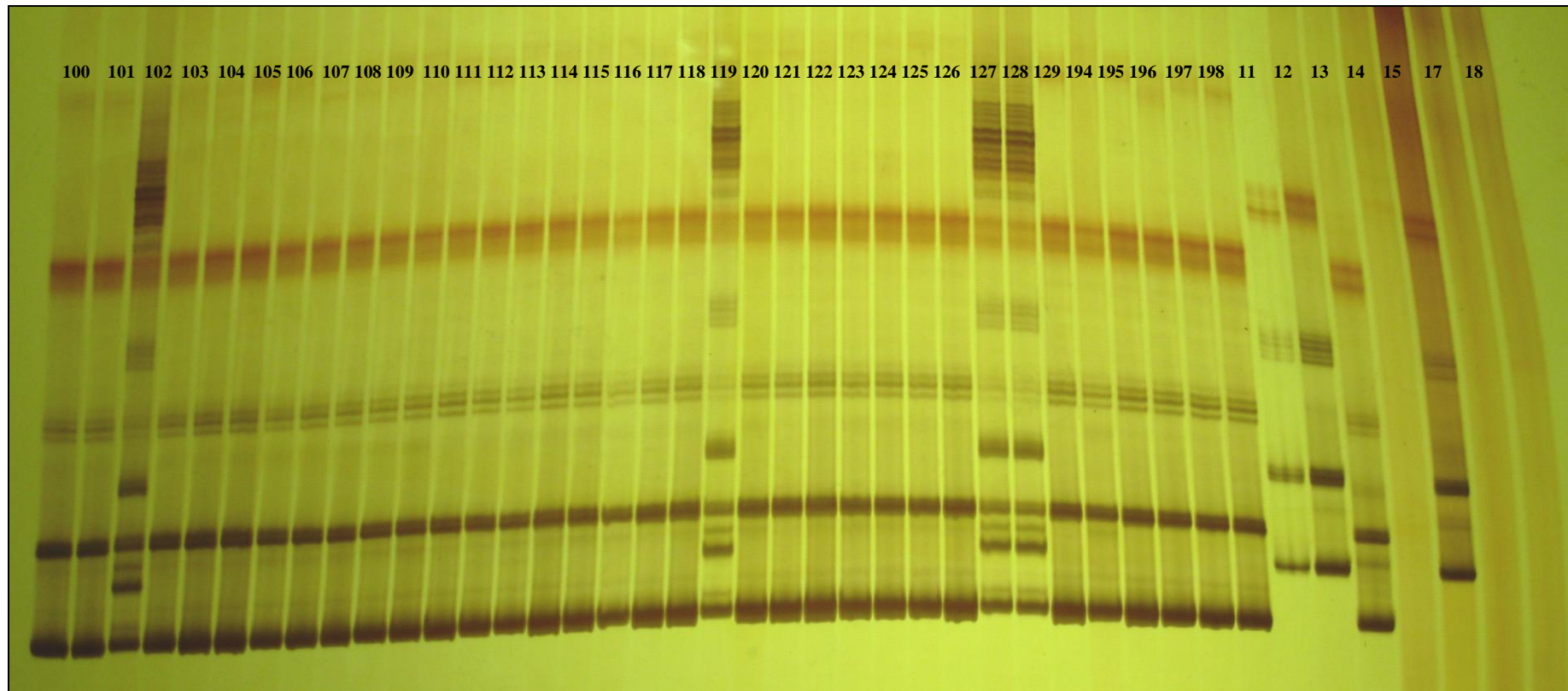
Figuur B14: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xgwm391*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.



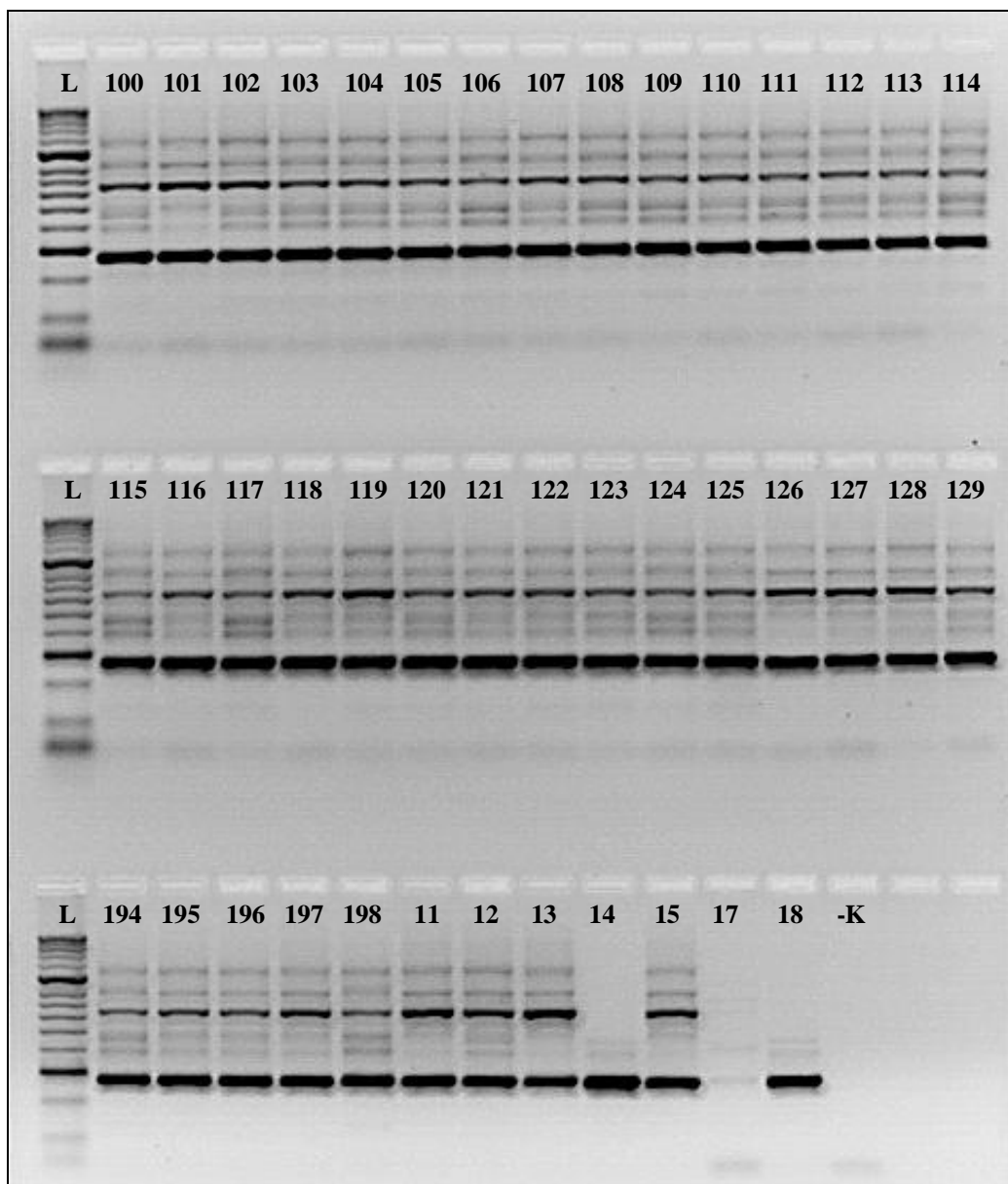
Figuur B15: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietmerker *Xbarc1021*. (1) 04M127-7; (2) 04M127-11; (3) 04M127-12; (4) 04M127-3A (1); (5) 04M127-3A (2); (6) 04M127-3A (3); (7) 04M127-3A (4). Controle-paneel: (11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.

ADDENDUM C

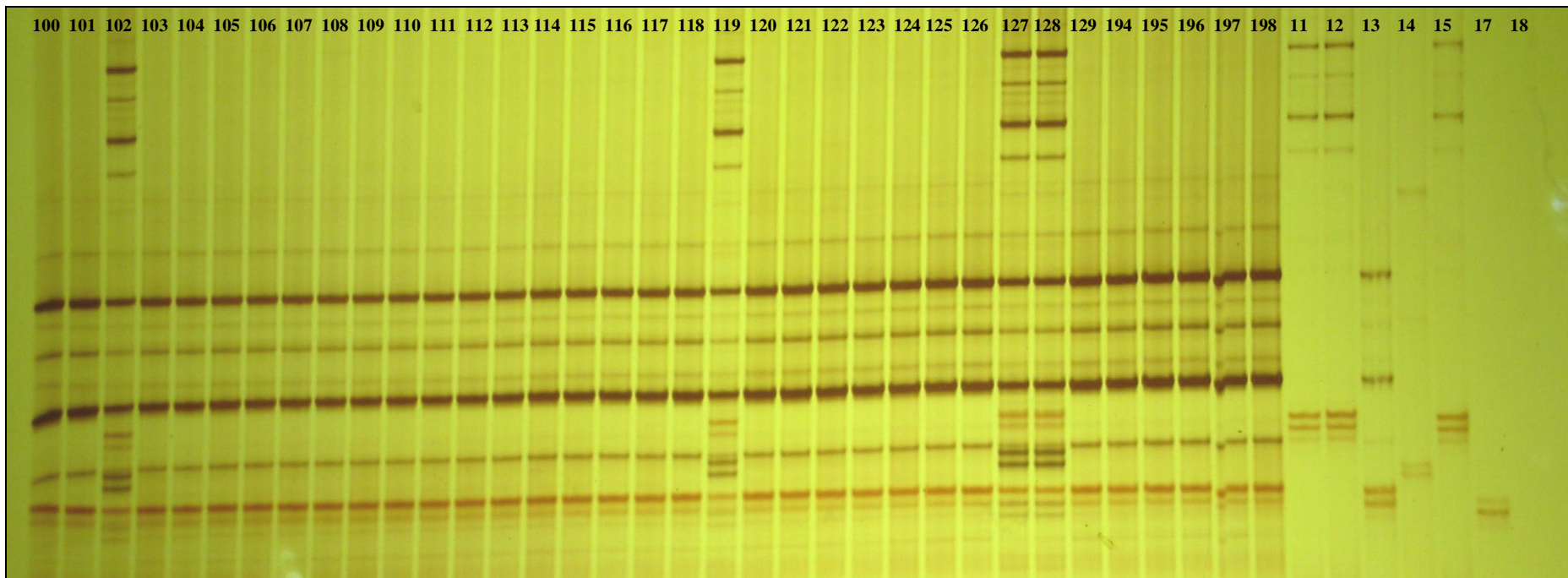
Agarose en poli-akriëlamied jelfoto's gebruik om Tabel 11 (35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante asook die kontrole-paneel) op te stel.



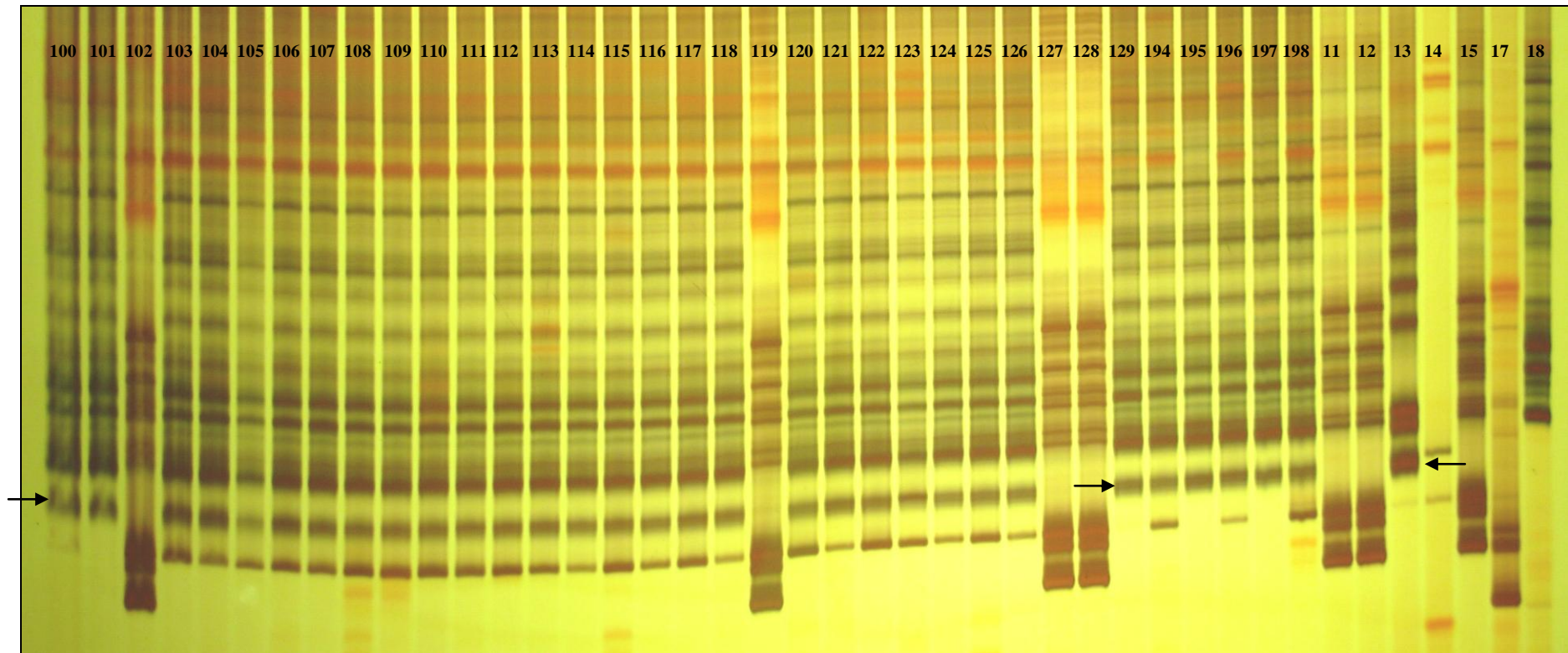
Figuur C1: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **BARC57**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



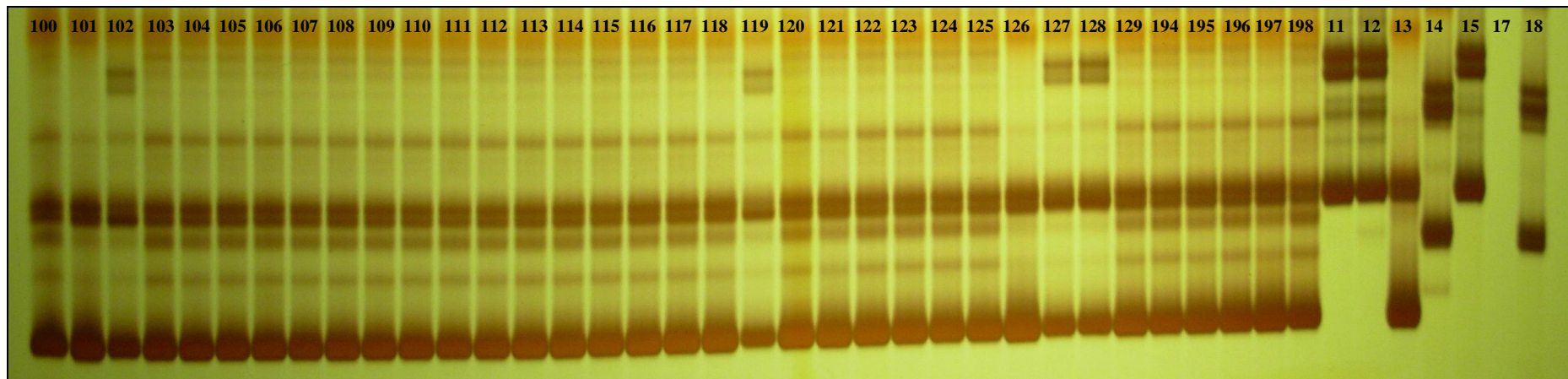
Figuur C2: Agarose jelfoto van amplificasieprodukte verkry met gebruik van RFLP inleierstel **GLK683**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie. L – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); -K – negatiewe kontrole (water).



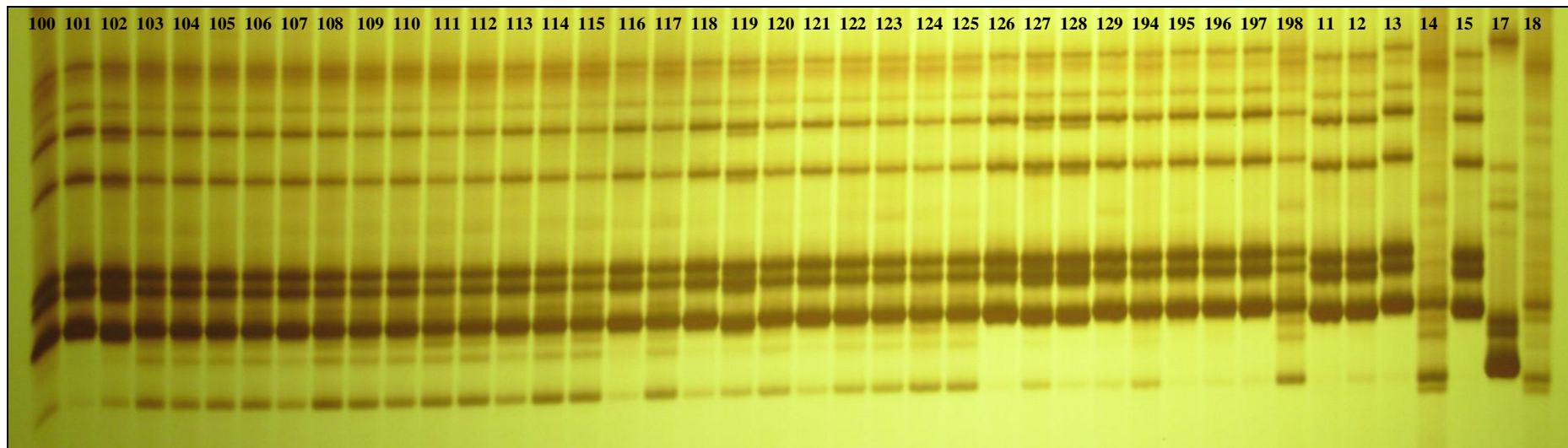
Figuur C3: Poli-akrielamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **BARC294**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



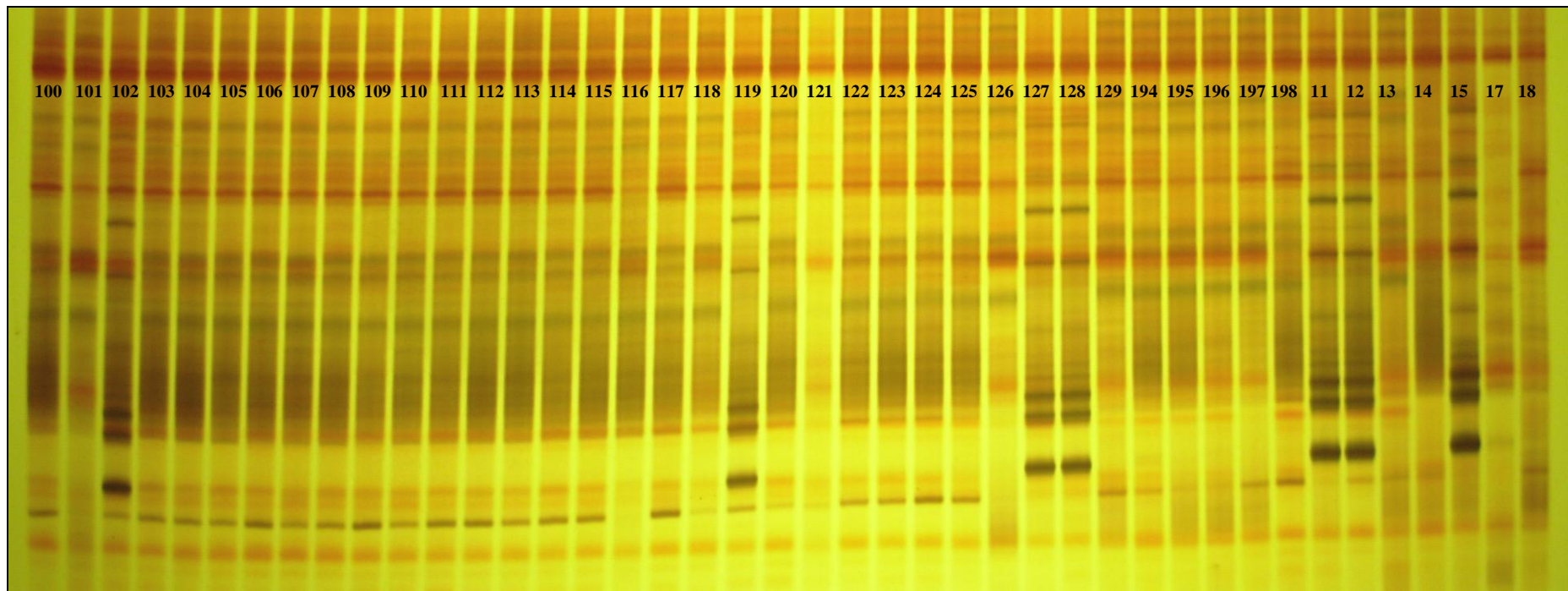
Figuur C4: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **BARC310**. Die lane bevat die profile van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



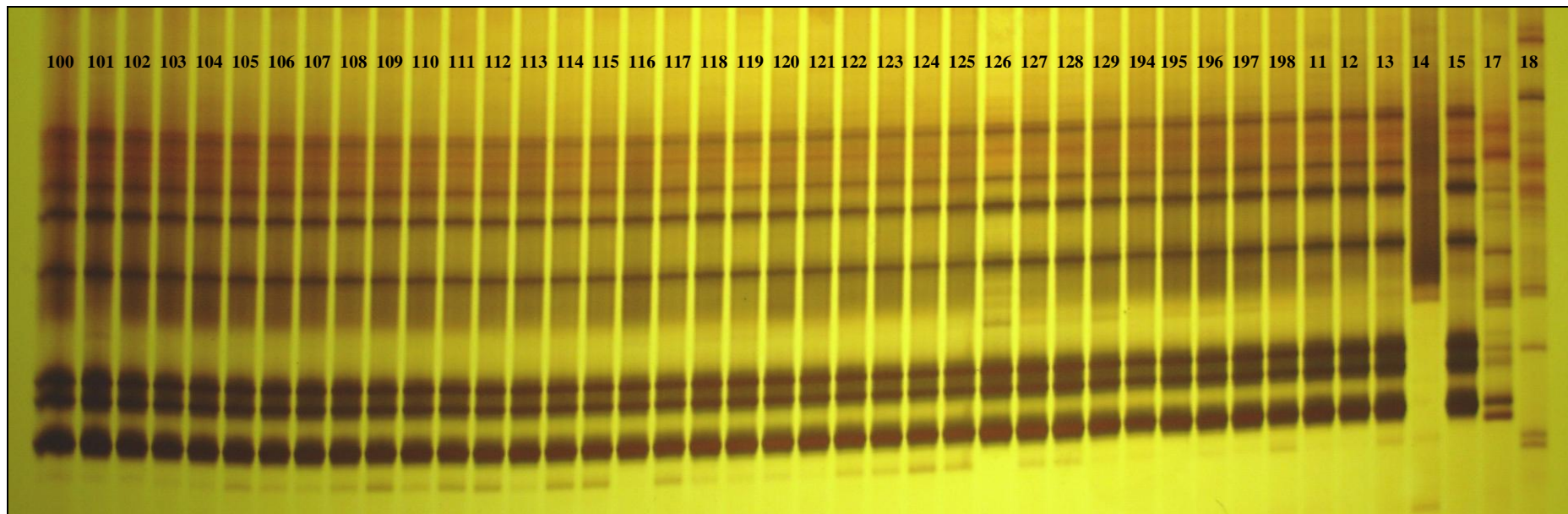
Figuur C5: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **BARC12**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CS3AT3A; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



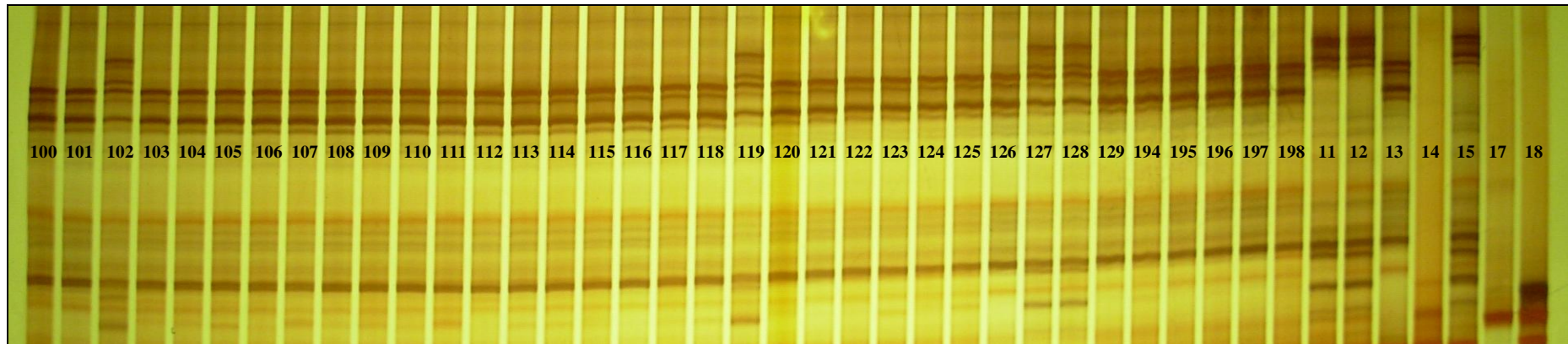
Figuur C6: Poli-akrielamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **WMC532**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



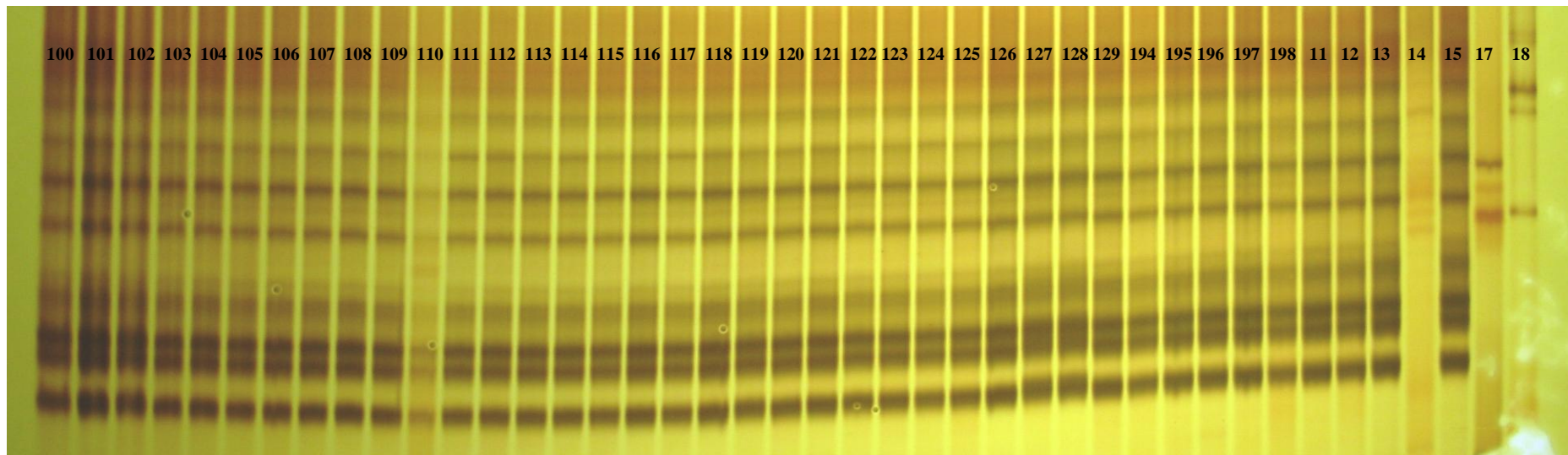
Figuur C7: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **GWM369**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



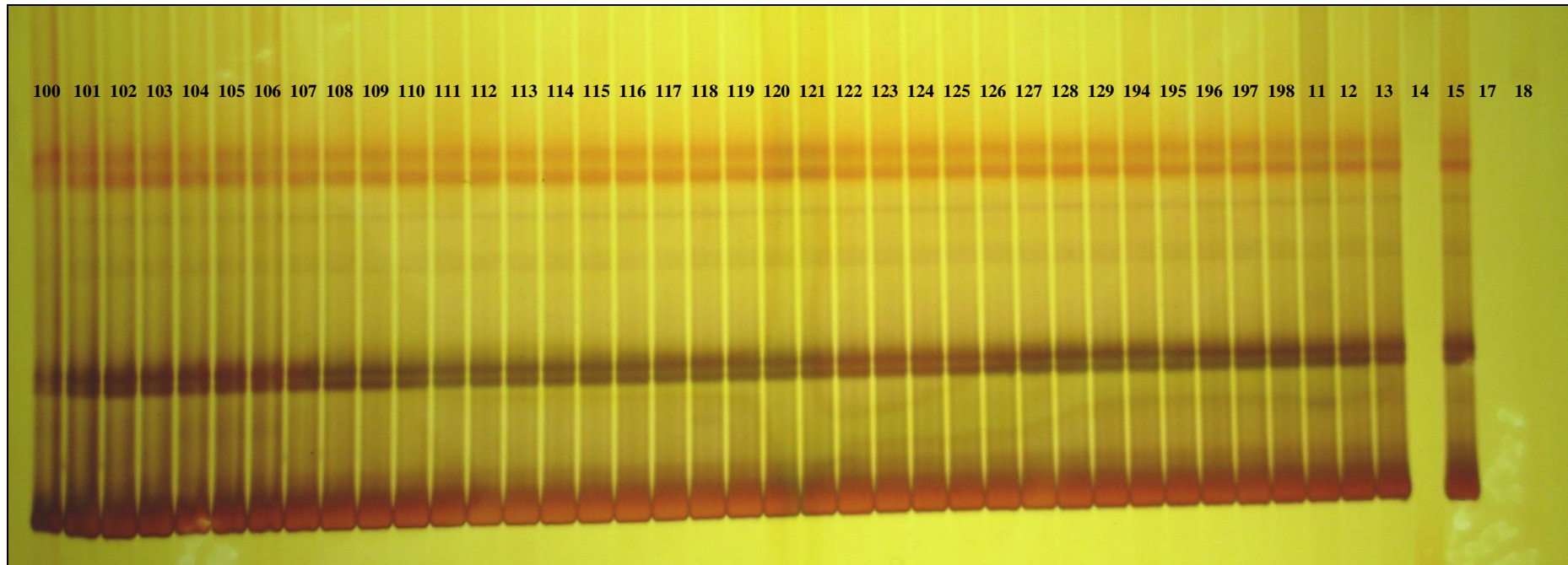
Figuur C8: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **GWM218**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSdT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



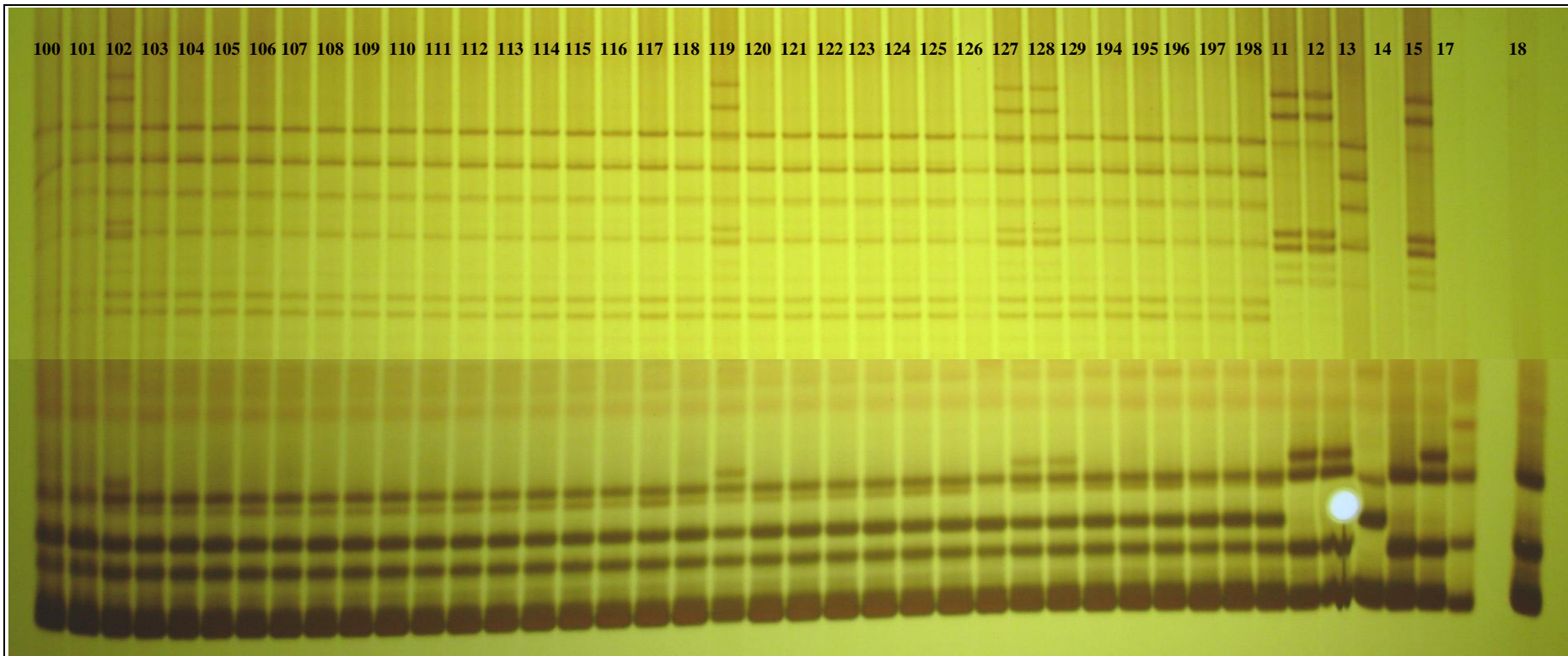
Figuur C9: Poli-akrielamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **GWM2**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSNT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



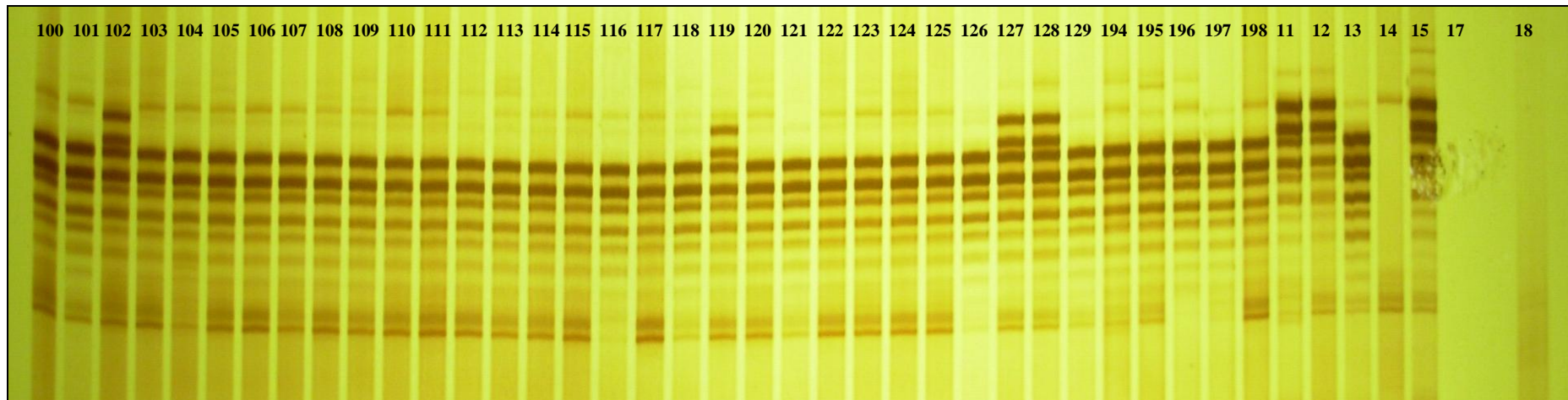
Figuur C10: Poli-akrielamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **GWM5**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



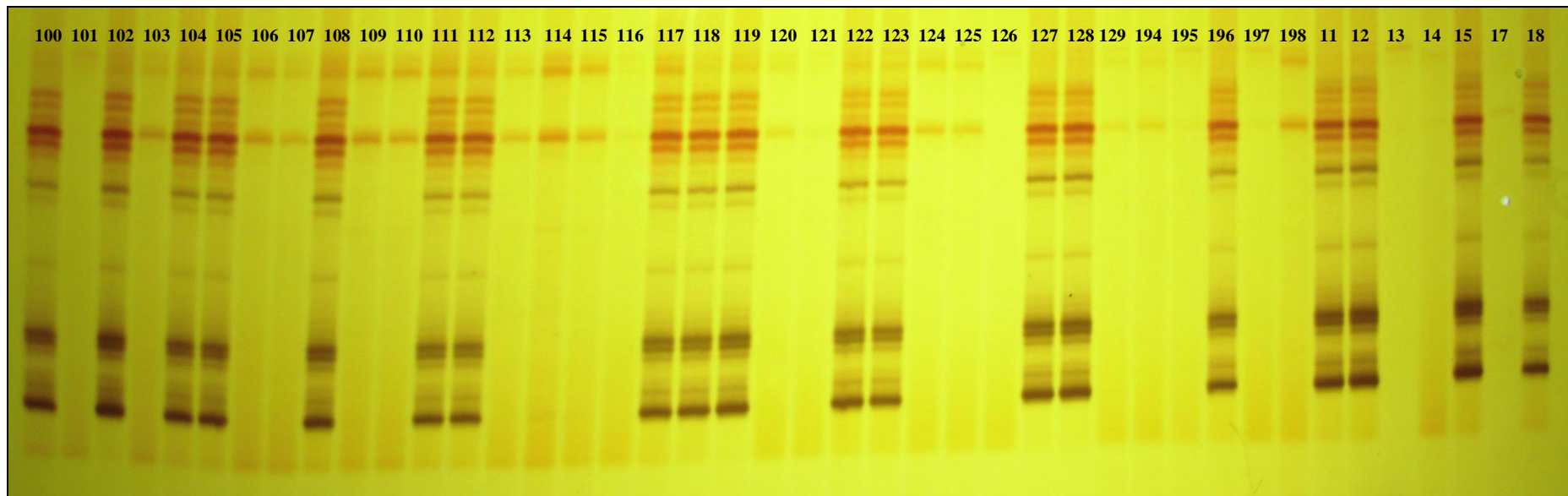
Figuur C11: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **BARC45**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translomasie.



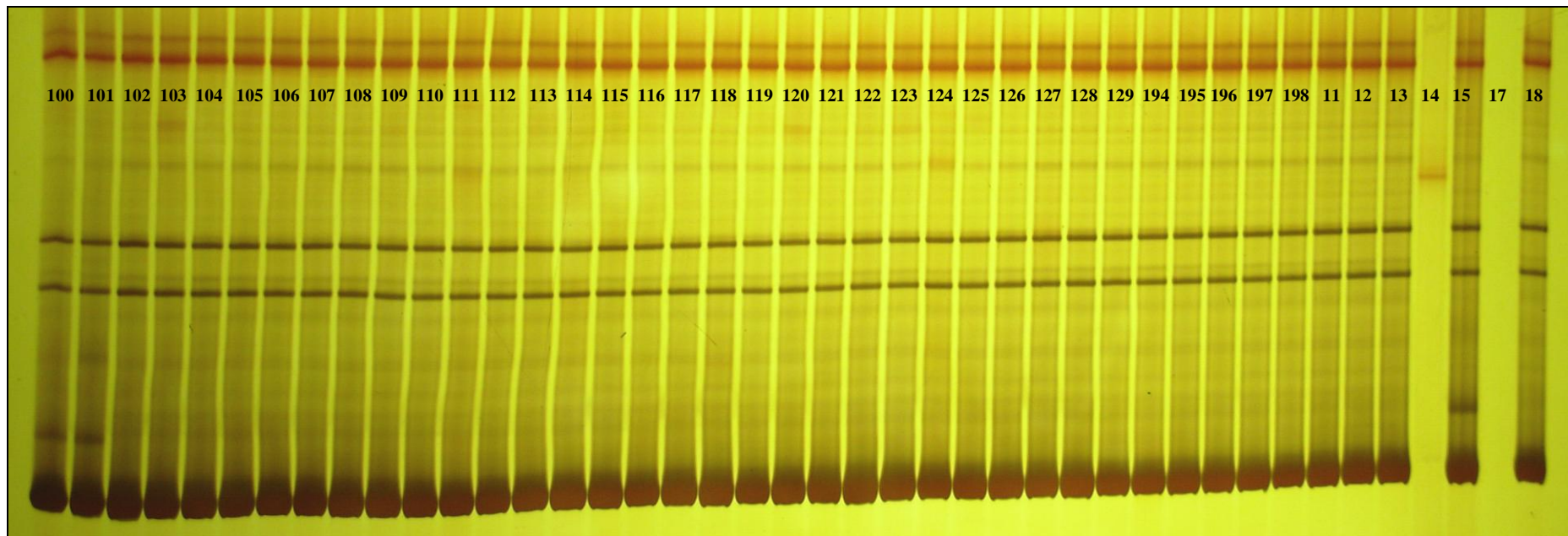
Figuur C12: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **BARC19**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



Figuur C13: Poli-akrielamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **WGM674**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



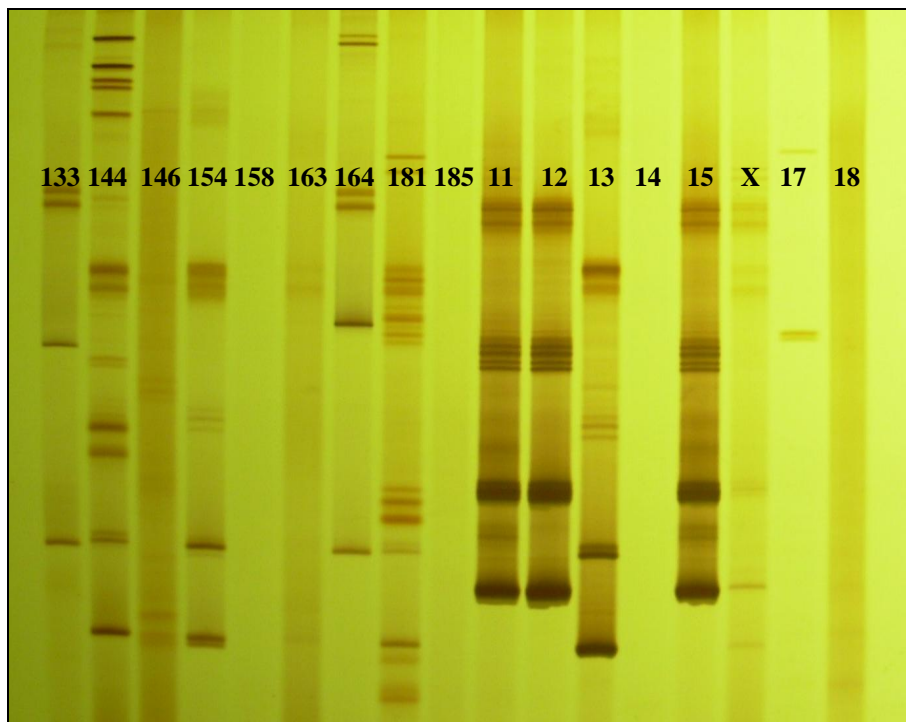
Figuur C14: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **GWM391**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.



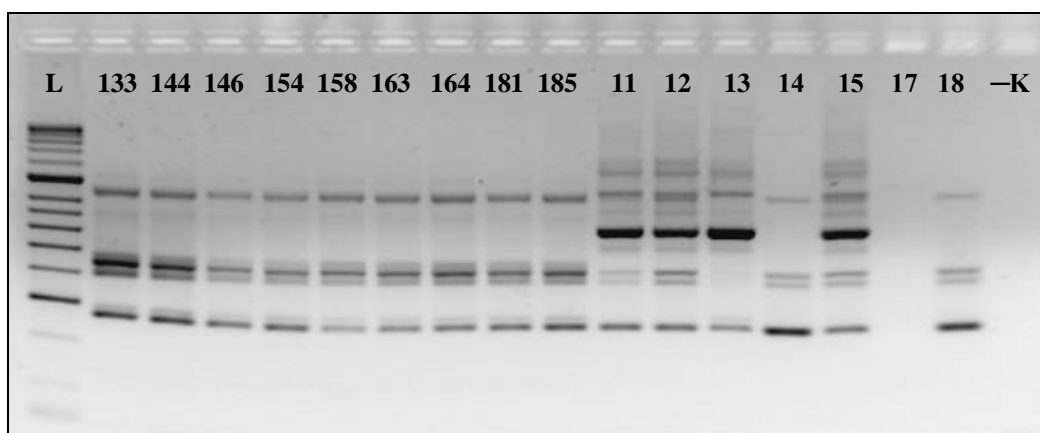
Figuur C15: Poli-akriëlamied jelfoto van amplifikasieprodukte verkry met gebruik van mikrosatelliet inleierstel **BARC1021**. Die lane bevat die profiele van 35 bestande toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante (**100-129, 194-198**) en die kontrole-paneel: (**11**) CS; (**12**) CS-S; (**13**) W84-17; (**14**) CSN3AT3B; (**15**) CSDT3AS; (**17**) *Ae. speltoides*; (**18**) S13 translokasie.

ADDENDUM D

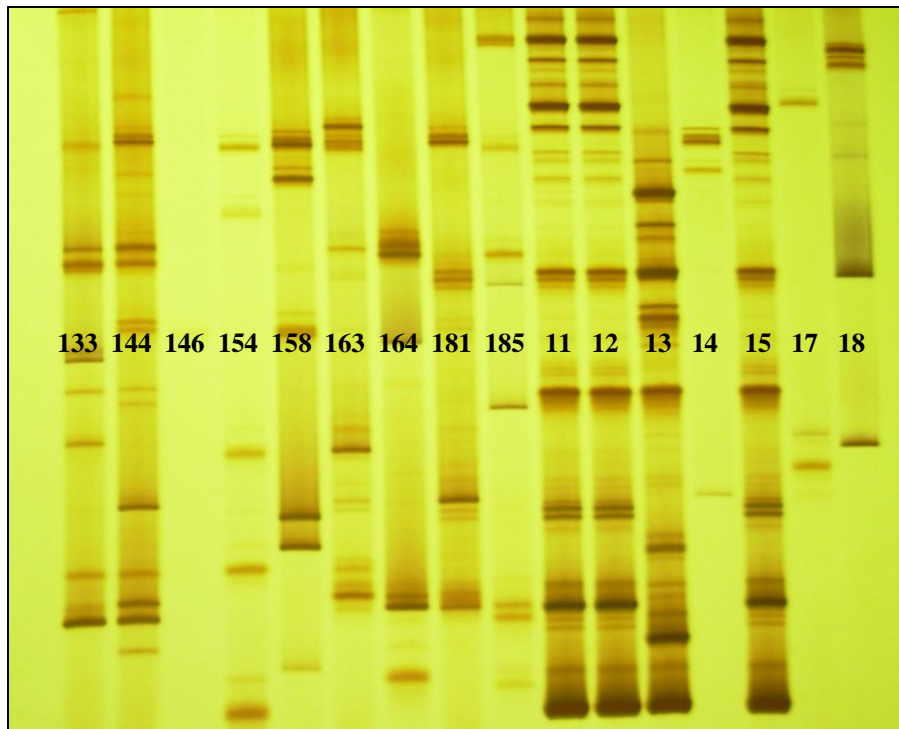
Agarose en poli-akrielamied jelfoto's gebruik om Tabel 11 [9 vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante asook die kontrole-paneel] op te stel.



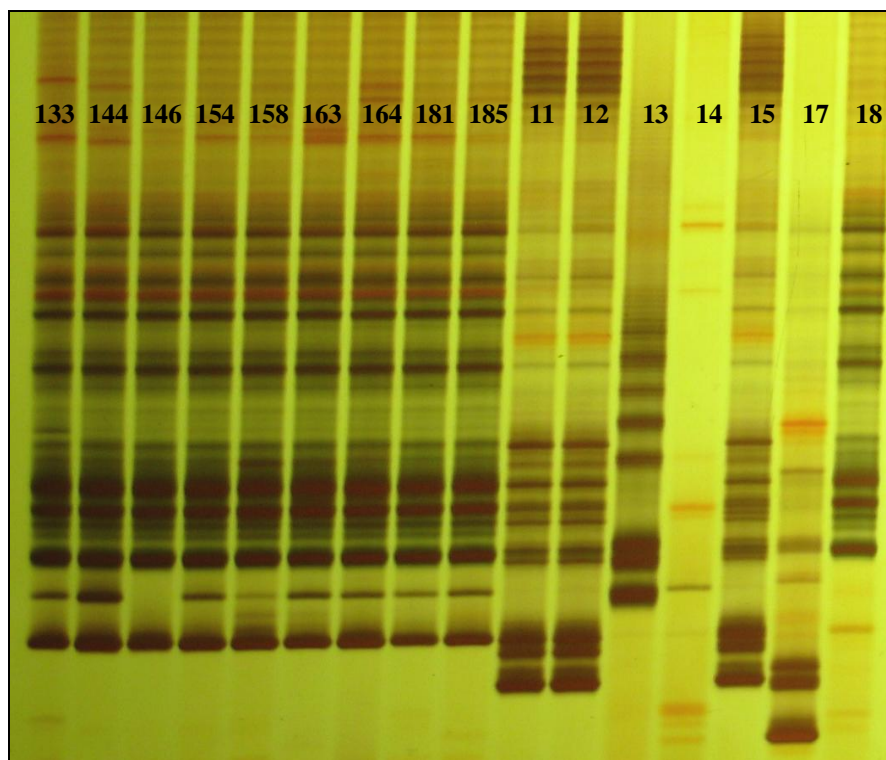
Figuur D1: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneer met inleierstel **BARC57**. Die lane bevat profiele van negte vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**.



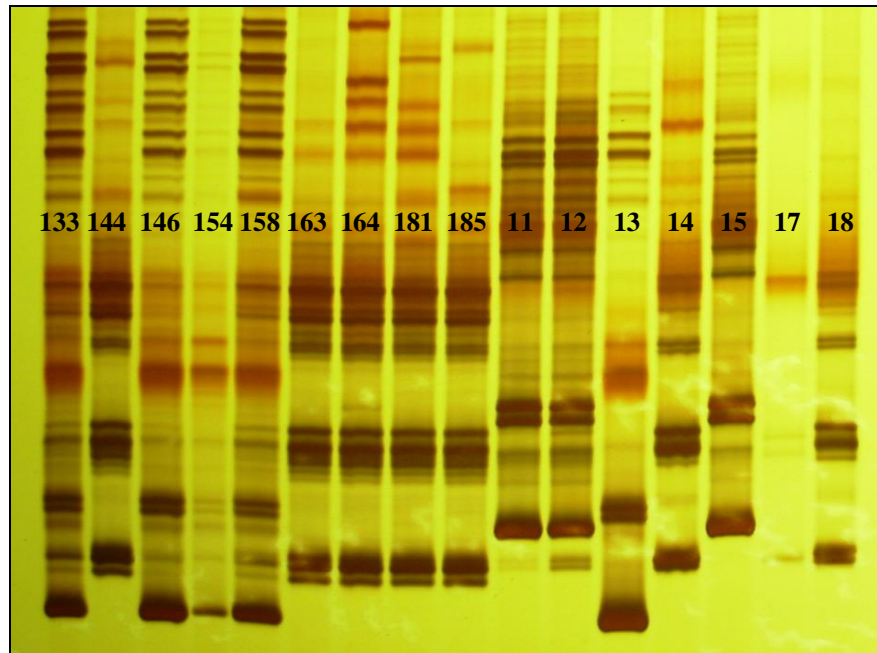
Figuur D2: Agarose jelfoto van RFLP-bande gegeneer met inleierstel **GLK683**. Die lane bevat profiele van negte vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**. **L** – 100bp leer (HPLII, *Bioline*); **-K** – negatiewe kontrole (water).



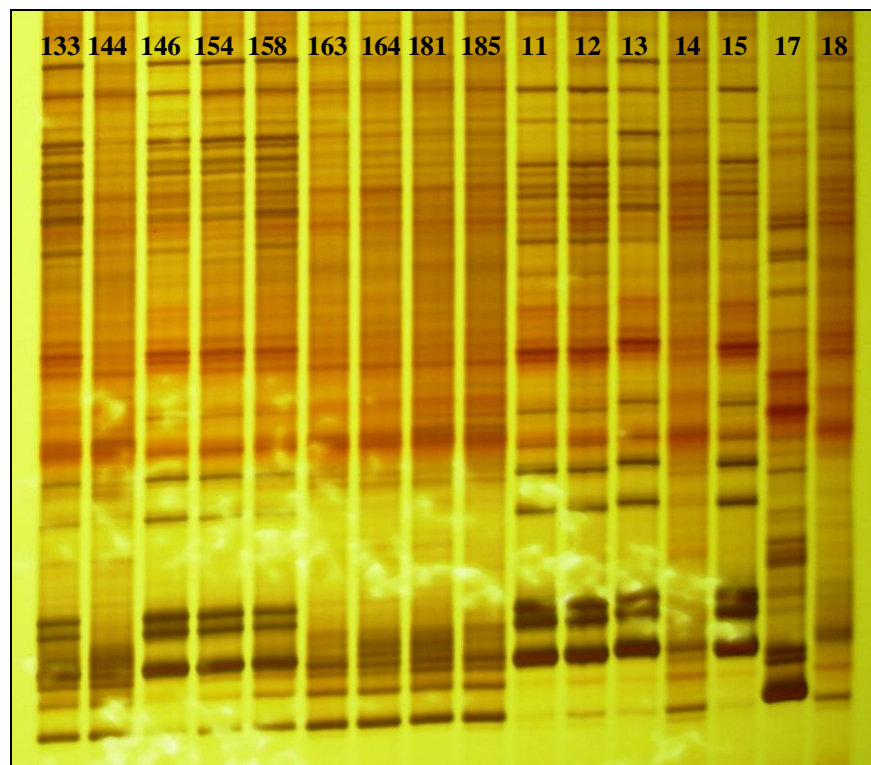
Figuur D3: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneer met inleierstel **BARC294**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Controle-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.**



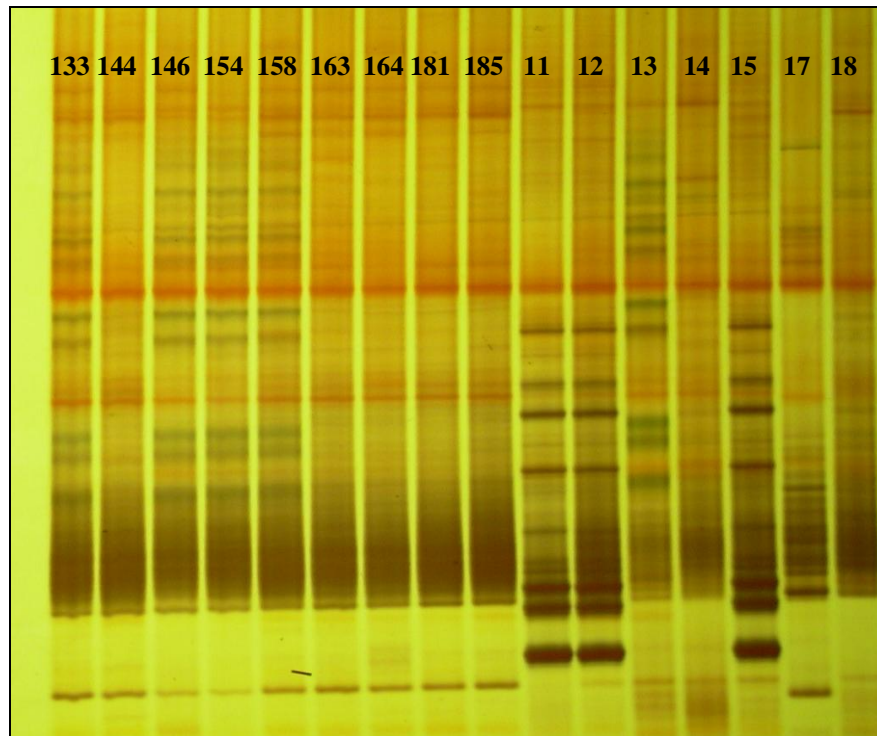
Figuur D4: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneer met inleierstel **BARC310**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Controle-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.**



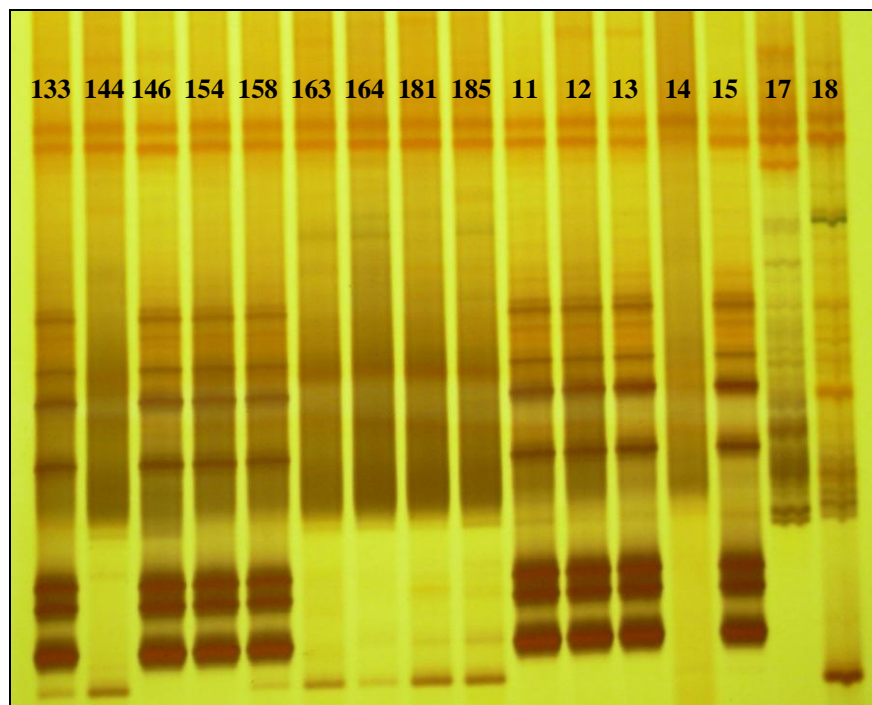
Figuur D5: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietbande gegenereer met inleierstel **BARC12**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**.



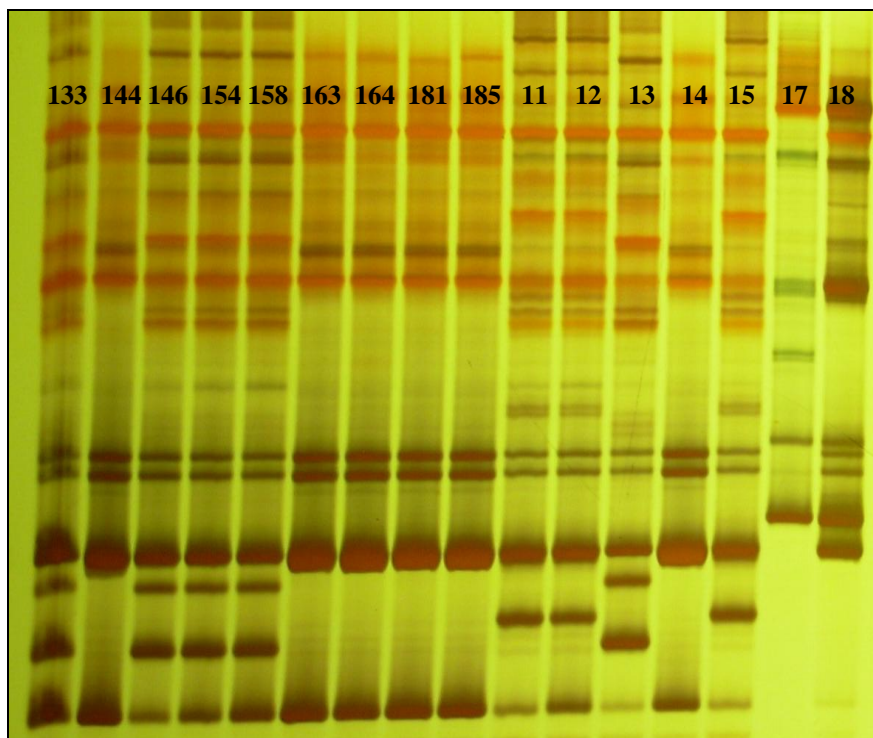
Figuur D6: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietbande gegenereer met inleierstel **WMC532**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**.



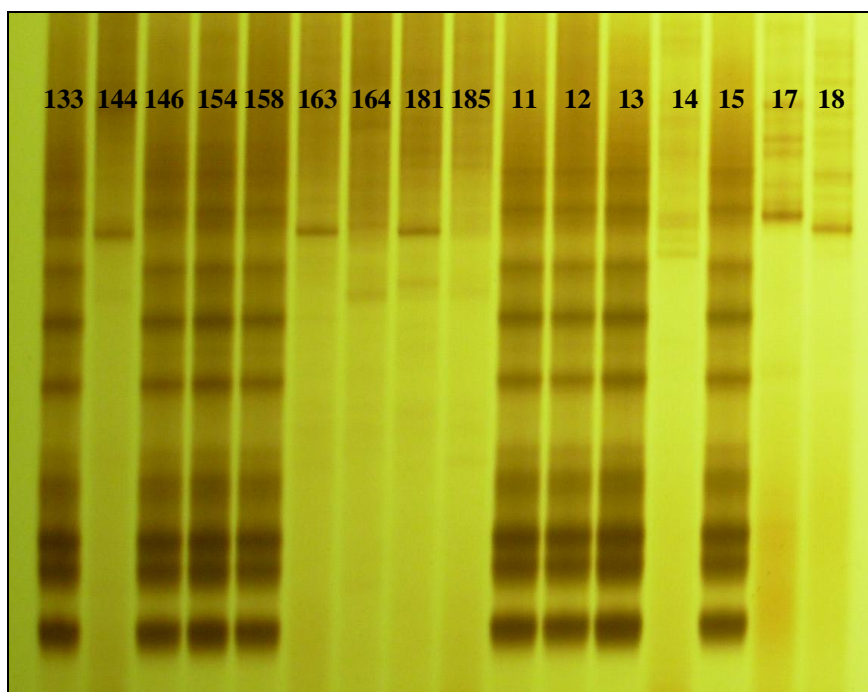
Figuur D7: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneereer met inleierstel **GWM369**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**.



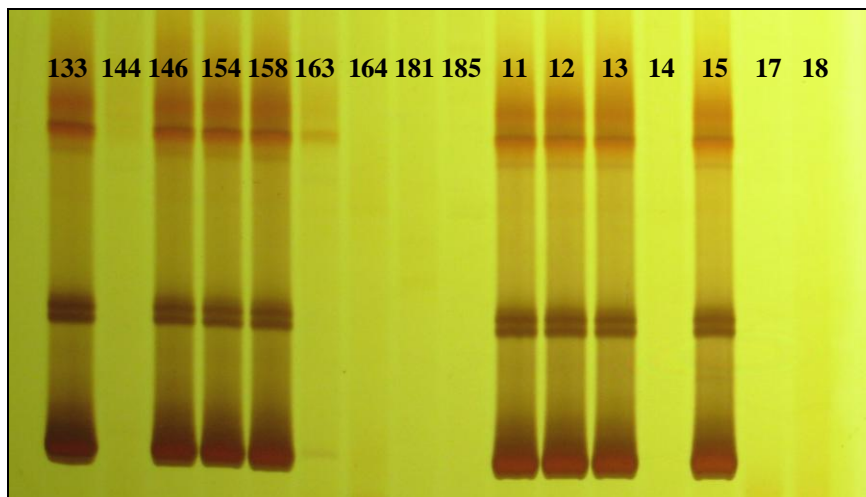
Figuur D8: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneereer met inleierstel **GWM218**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**.



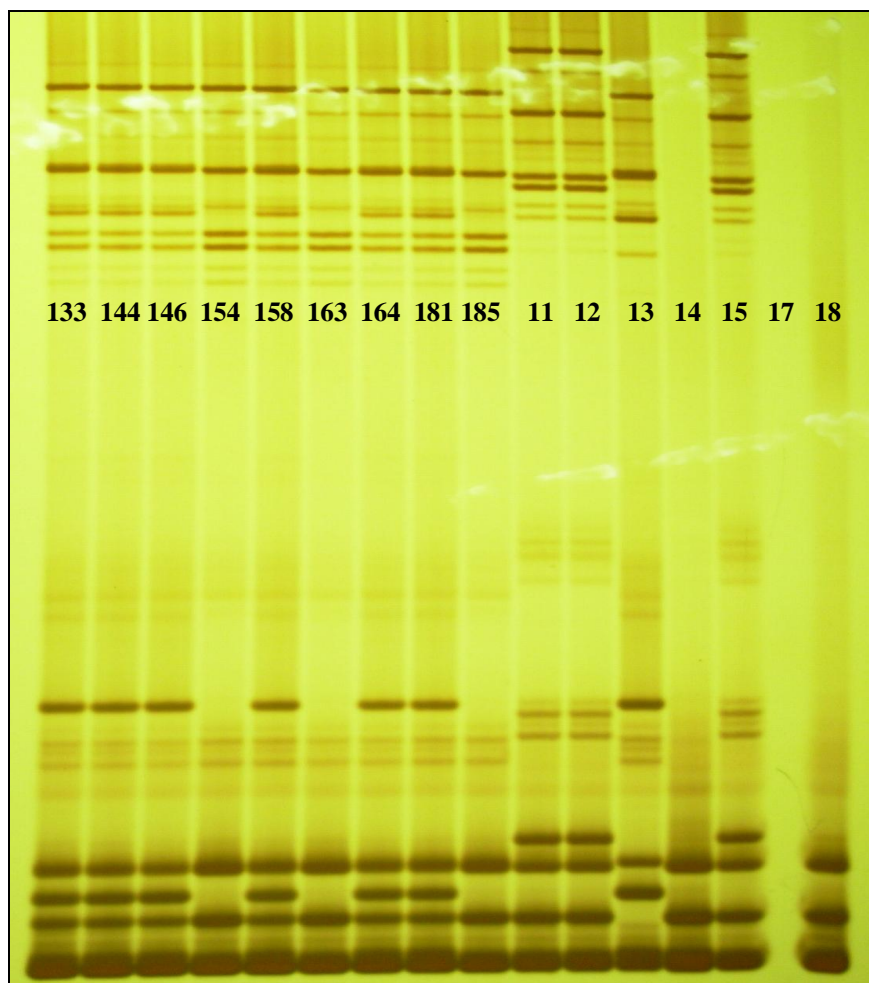
Figuur D9: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneer met inleierstel **GWM2**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.**



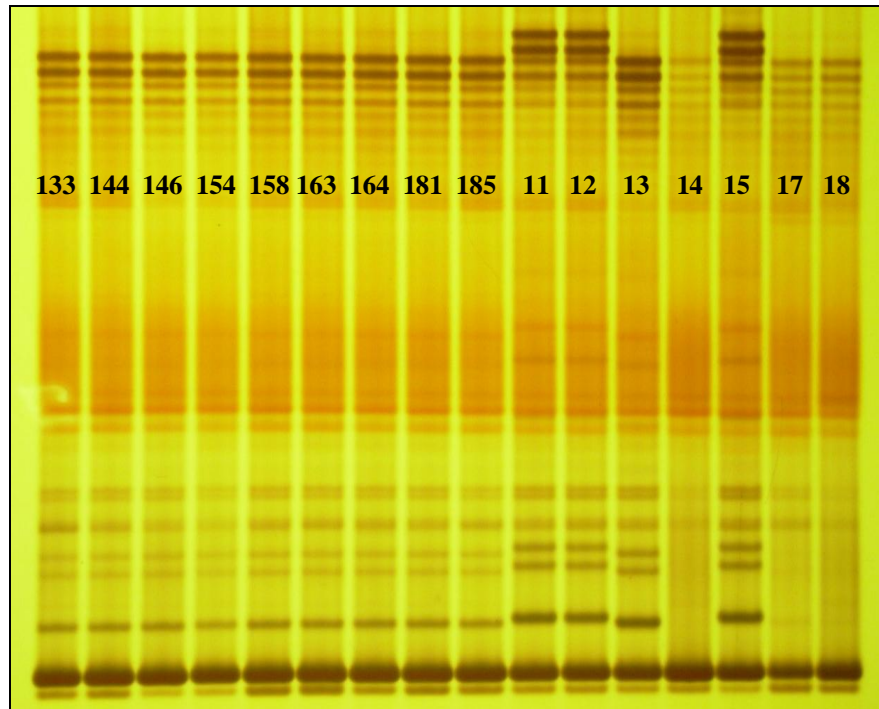
Figuur D10: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneer met inleierstel **GWM5**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.**



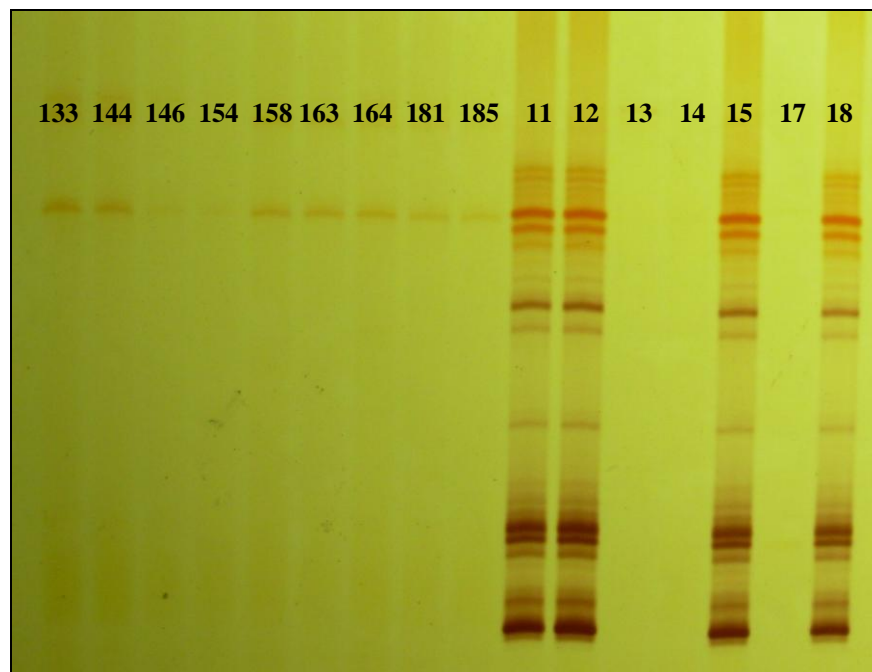
Figuur D11: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietbande gegenereer met inleierstel **BARC45**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.**



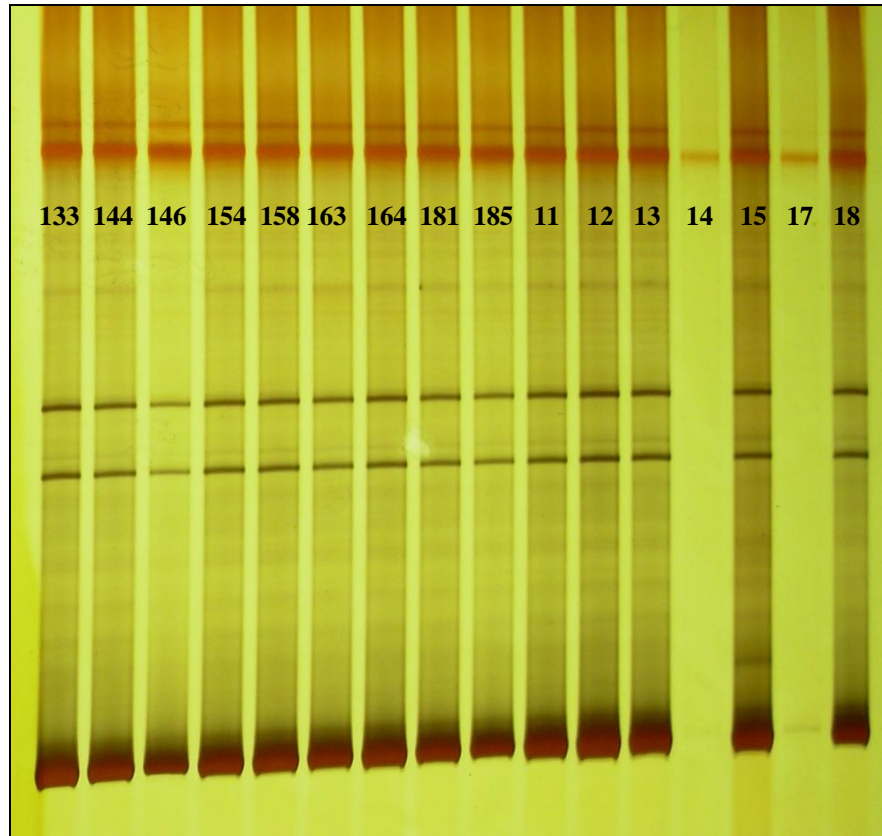
Figuur D12: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietbande gegenereer met inleierstel **BARC19**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.**



Figuur D13: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneer met inleierstel **GWM674**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**.



Figuur D14: Poli-akrielamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneer met inleierstel **GWM391**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSDT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie**.



Figuur D15: Poli-akriëlamied jelfoto van mikrosatellietbande gegeneereer met inleierstel **BARC1021**. Die lane bevat profiele van nege vatbare toetskruis (04M127-3A/W84-17//CSN3AT3D) F₁ plante: **133, 144, 146, 154, 158, 163, 164, 181, 185**. Kontrole-paneel bestaan uit: **(11) CS; (12) CS-S; (13) W84-17; (14) CSN3AT3B; (15) CSNT3AS; (17) *Ae. speltoides*; (18) S13 translokasie.**

