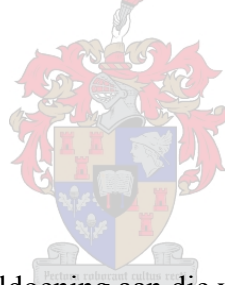


**DIE ONTWIKKELING VAN MOLEKULÊRE MERKERS VIR
WILDE-SPEISIE-VERHAALDE
WEERSTANDSGEENKOMPLEKSE VAN GEWONE KORING**

deur

Aletta Eksteen



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

Departement Genetika

Natuurwetenskappe

Studieleier: Prof G.F. Marais

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: 24 Februarie 2009

OPSOMMING

Wêreldwyd dra roessiektes jaarliks by tot aansienlike koring oesverliese (Wallwork 1992; Chrispeels & Sadava 1994). Die benutting van gasheerplant weerstand om hierdie verliese te beperk is van groot belang aangesien biologiese beheer die nadelige omgewingsimpak van landboukundige chemikalieë vermy (Dedryver *et al.* 1996).

Die wilde koring-verwante spesies huisves 'n ryk bron van gene vir weerstand teen insekte en siektes. 'n Groot mate van geensintenie bestaan nog tussen graangewasse en hul wilde spesie naverwante (Newbury & Paterson 2003). Dit is daarom moontlik om 'n chromosoomsegment wat nuttige gene bevat oor te dra na 'n homoloë streek in die ontvanger sonder ernstige ontwinging van genetiese inligting. Spesiale sitogenetiese tegnieke is reeds ontwikkel om sodanige oordragte te bewerkstellig (Knott 1989). Ongelukkig mag die oordra van nuttige gene soms gepaard gaan met die gelyktydige oordrag van ongewenste gene en oortollige, vreemde chromatieë wat vervolgens gekarteer en verwyder moet word (Feuillet *et al.* 2007). DNS-merkers dien as die essensiele beginpunt vir die karakterisering en verkorting van genomiese streke wat die gene van belang bevat (Ranade *et al.* 2001), en vind ook nuttige toepassing in merkerbemiddelde seleksie wanneer die oorgedraagde gene kommersieël benut word.

Agt koringlyne met translokasies/introgressies van weerstandsgene uit verskillende grasspesies is deur die departement Genetika (US) ontwikkel. Hierdie lyne is tans in verskillende stadiums van kartering en beskrywing en pogings word ook aangewend om die betrokke translokasies te verkort. Die doel van hierdie studie was om DNS-merkers (RAPD en RGAP) vir die onderskeie translokasies op te spoor en dit om te skakel na meer betroubare SCAR-merkers wat gebruik kan word vir verdere karakterisering en verbetering van die weerstandsbronne.

'n Totaal van 260 RAPD- en 21 RGAP inleiers is gebruik om die agt translokasies te sif en polimorfiese produkte wat met elk van die translokasies (uitgesonderd *Lr19*) geassosieerd was, is gevind. Hierdie polimorfismes kon egter nie almal omgeskakel word na meer robuuste SCAR-merkers nie. Die vernaamste rede hiervoor was swak herhaalbaarheid van die waargenome bande. Sekere merkers was wel herhaalbaar maar kon nie geredelik na SCAR-merkers omgeskakel word nie; sommige hiervan kan egter steeds direk (in RAPD of RGAP reaksies) as merkers aangewend word. Die *Lr19* translokasie wat gebruik is, is *Lr19-149-299*. Die spesifieke rekombinant is 'n aansienlik verkorte weergawe van die oorspronklike *Lr19* translokasie en die onvermoë om merkers daarvoor te vind was waarskynlik aan die relatiewe klein grootte te wyte. Die volgende

aantalle herhaalbare merkers (direk en omgeskakel na SCAR) is geïdentifiseer: S8-introgressie (*Triticum dicoccoides*) = een RAPD en twee SCARs; S13-translokasie (*Aegilops speltoides*) = vier RAPDs, drie RGAPs en vyf SCARs; S15-translokasie (*Ae. peregrina*) = een RAPD en twee SCARs; S20-translokasie (*Ae. neglecta*) = twee RAPDs, twee RGAPs en een bestendige SCAR. Hierdie merkers vind reeds aanwending in lopende projekte vir die kartering en verkorting van bogenoemde translokasies. Sommige van hierdie merkers is boonop geskik vir gebruik in multipleksreaksies. Geen nuttige (herhaalbare) merkers kon vir die oorblywende vier translokasies (S12 uit *Ae. sharonensis*; S14 uit *Ae. kotschyi*; Smac uit *Ae. biuncialis* en Lr19-149-299 uit *Thinopyrum ponticum*) opgespoor word nie.

ABSTRACT

Worldwide, the rust diseases cause significant annual wheat yield losses (Wallwork 1992; Chrispeels & Sadava 1994). The utilization of host plant resistance to reduce such losses is of great importance particularly because biological control avoids the negative environmental impact of agricultural chemicals (Dedryver *et al.* 1996).

The wild relatives of wheat are a ready source of genes for resistance to disease and insect pests. A large degree of gene synteny still exists among wheat and its wild relatives (Newbury & Paterson 2003). It is therefore possible to transfer a chromosome segment containing useful genes to a homologous region in the recipient genome without serious disruption of genetic information. Special cytogenetic techniques are employed to transfer genes from the wild relatives to the wheat genomes (Knott 1989). Unfortunately the transfer of useful genes may be accompanied by the simultaneous transfer of undesirable genes or redundant species chromatin which has to be mapped and removed (Feuillet *et al.* 2007). DNA markers are extremely useful for the characterisation and shortening of introgressed regions containing genes of interest (Ranade *et al.* 2001), and may also be used for marker aided selection of the resistance when the genes are employed commercially.

Eight wheat lines containing translocations/introgressions of wild species-derived resistance genes were developed by the Department of Genetics (SU). These lines are presently being characterized and mapped and attempts are also being made to shorten the respective translocations. This study aimed to find DNA markers for the various translocations and to convert these into more reliable SCAR markers that can be used in continued attempts to characterize and improve the respective resistance sources.

A total of 260 RAPD and 21 RGAP primers were used to screen the eight translocations and, with the exception of *Lr19*, it was possible to identify polymorphic bands associated with each translocation. However, it was not possible to convert all of these into more reliable SCAR markers. The primary reason for this was the low repeatability of most of the bands. Certain marker fragments turned out to be repeatable but could not be converted successfully. Some of the latter can, however, be used directly (in RAPD or RGAP reactions) as markers. The *Lr19* translocation used in the study (*Lr19-149-299*) is a significantly reduced version of the original translocation and failure to identify polymorphisms associated with it can probably be ascribed to its small size. The following numbers of markers (direct and converted into SCARs) were

identified: S8-introgression (*Triticum dicoccoides*) = one RAPD and two SCARs; S13-translocation (*Aegilops speltoides*) = four RAPDs, three RGAPs and five SCARs; S15-translocation (*Ae. peregrina*) = one RAPD and two SCARs; S20-translocation (*Ae. neglecta*) = two RAPDs, two RGAPs and one SCAR. The markers are already being employed in current projects aiming to map and shorten these translocations. Some of the markers can be combined in multiplex reactions for more effective mass screening. No repeatable markers could be identified for the four remaining translocations (S12 from *Ae. sharonensis*; S14 from *Ae. kotschyi*; Smac from *Ae. biuncialis* and *Lr19-149-299* from *Thinopyrum ponticum*).

BEDANKINGS

- Prof GF Marais vir sy toesig en leiding, maar veral vir sy geduld en aanmoediging as my studieleier.
- Mev. Ansie Marais vir tegniese ondersteuning en aanmoediging.
- Wintergraantrust en Nasionale Navorsingsstigting vir befondsing.
- Lab 239: Elsabet, Ian, Jorik, Luigia, Pieter, Tamrin en spesiale dank aan Jenn vir hulle vriendskap.
- Makkers: Angie, Maretha, Mariana en Niël.
- Die ma en die pa vir hul oneindige liefde en ondersteuning.
- Ons Hemelse Vader vir sy genade en liefde.

LYS VAN AFKORTINGS

AA	Akrielamied
AFLP	Geamplifiseerde Fragment-Lengte Polimorfisme
Amp	Ampisillien
ATP	Adenosien trifosfaat
A ₆₀₀	Absorpsie waarde by 600 nm
BAA	Bis-Akrielamied
B-ME	β-merkpto-etanol
bp	Basispaar
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimetiel Ammoniumbromied
CSDM	Chinese Spring dubbel monosoom
°C	Grade Celsius
DNS	Deoksiribonukleïensuur
dNTP	Deoksinukleotied trifosfaat
ddH ₂ O	Dubbel gedistilleerde water
NA ₂ EDTA	Etileendiamientetra-asynsuur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Etanol
g	Gram
h	Uur(e)
IPTG	Isopropiel B-D thio-galakto-pianosied
l	Liter
m/v	Massa/volume
M	Molaar
mg	Milligram
min	Minuut
ml	Milliliter
mM	Millimolaar
mV	Millivolt
NaCl	Natriuchloried
ng	Nanogram
OD	Optiese Digtheid
PKR	Polimerase kettingreaksie
pmol	Pikomol
RAPD	Lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNS
RFLP	Restriksie Fragment-Lengte Polimorfisme
RGAPs	Weerstandsgen Analoog Polimorfismes
SSR	Eenvoudige Volgorde Herhaling
SCAR	Volgorde Gekarakteriseerde Geamplifiseerde DNS
sek	Sekonde
<i>Taq</i> DNA pol	<i>Thermus aquaticus</i> DNS polimerase
TBE-buffer	Tris-boraat EDTA buffer

TK	Terugkruising
Tris	2-Amino-2-(hidroksiemetiel-1,3-propandiol)
μ l	Mikroliter
US	Universiteit Stellenbosch
UV	Ultraviolet
vol	Volume
v/v	Volume/volume

INHOUDSOPGAWE

VERKLARING	i
OPSOMMING	ii
ABSTRACT	iv
BEDANKINGS	vi
LYS VAN AFKORTINGS	vii
INHOUDSOPGAWE	ix
HOOFSTUK 1: LITERATUURSTUDIE	1
1.1 INLEIDING	1
1.2 DIE KORING ROESSIEKTES	2
1.2.1 Die patogene	4
1.2.1.1 Blaarroes	4
1.2.1.2 Stamroes	5
1.2.1.3 Streeproes	6
1.2.2 Lewensiklus	7
1.2.3 Verandering in virulensie en populasiesamestelling van roespatogene	8
1.2.3.1 Mutasie	8
1.2.3.2 Migrasie	9
1.2.3.3 Somatiese verbastering	9
1.2.3.4 Seleksie	10
1.2.3.5 Geslagtelike rekombinasie	10
1.2.4 Weerstand teen roespatogene	10
1.2.4.1 Ras spesifieke weerstand (hoofgeen weerstand; vertikale weerstand)	11
1.2.4.2 Ras nie-spesifieke weerstand (nie-hoofgeen weerstand; horisontale weerstand)	12
1.2.5 Beheer van roessiektes	12
1.2.5.1 Verbouingspraktyke	12
1.2.5.2 Chemiese beheer	13
1.2.5.3 Genetiese beheer	13

1.3 DIE OORDRAG VAN ROESWEERSTANDSGENE VANAF <i>TRITICUM</i> EN <i>AEGILOPS</i> SPESIES NA GEWONE KORING	14
1.3.1 Wilde spesie-verhaalde weerstandsgeenkomplekse in hierdie studie gebruik	16
1.3.1.1 Die <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i> introgressie bekend as S8 (<i>Lr53/Yr35</i>)	17
1.3.1.2 Die <i>Aegilops sharonensis</i> translokasie bekend as S12 (<i>Lr56/Yr38</i>)	18
1.3.1.3 Die <i>Aegilops speltoides</i> var. <i>ligustica</i> translokasie bekend as S13 (<i>LrS13/SrS13/YrS13</i>)	19
1.3.1.4 Die <i>Aegilops kotschy</i> translokasie bekend as S14 (<i>Lr54/Yr37</i>)	19
1.3.1.5 Die <i>Aegilops peregrina</i> translokasie bekend as S15 (<i>LrS15</i>)	20
1.3.1.6 Die <i>Aegilops buincialis</i> translokasie bekend as Smac (<i>Lrmac</i>)	20
1.3.1.7 Die <i>Aegilops neglecta</i> translokasie bekend as S20 (<i>LrS20/YrS20</i>)	21
1.4 MOLEKULÊRE MERKERS	21
1.4.1 Proteïen-merkers	23
1.4.2 DNS-merkers	23
1.4.3 PKR-gabaseerde DNS- merkers	24
1.4.3.1 Teiken-gerigte PKR-merkers	25
1.4.3.1.1 <i>Mikrosatelliete</i>	25
1.4.3.2 Lukrake PKR-merkers	26
1.4.3.2.1 <i>RAPD (Lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNS)</i>	27
1.4.3.2.2 <i>SCARs (Volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde streke)</i>	29
1.4.3.2.2.1 <i>CAPS (Gekliefde, Geamplifiseerde Polimorfiese Volgordes)</i>	29
1.4.3.2.3 <i>AFLP (Geamplifiseerde fragment-lengte polimorfisme)</i>	30
1.4.3.3 <i>RGAPs (Weestandsgeen Analoog Polimorfismes)</i>	32
1.5 TOEPASSINGS VAN DNS-MERKERS IN KORINGTEELT	33
1.5.1 Merkerbemiddelde seleksie	33
1.5.1.1 DNS-genotipering	34
1.5.1.2 DNS-merkers vir siekteweerstandgene en merkerbemiddelde geenstapeling	34
1.5.1.3 Kartering	35
1.5.2 Beperkings van merkerbemiddelde seleksie in koring	35
1.6 STUDIE DOELWITTE	36

HOOFSTUK 2: MATERIAAL EN METODEDES	37
2.1 OPSPORING EN MODIFIKASIE VAN RAPD-EN RGAP-MERKERS VIR KORING WEERSTANDSGEENKOMPLEKSE	37
2.1.1 Plantmateriaal vir RAPD-en RGAP-analise	37
2.1.2 Plantmateriaal vir bevestiging van RAPD- en RGAP-merkers	38
2.1.3 Plant genomiese DNS-ekstraksie	38
2.1.4 Analise van lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNS (RAPD)	39
2.1.4.1 Inleiers	39
2.1.4.2 Amplifikasie	39
2.1.4.3 Agarose jel-elektroforese en visualisering	40
2.1.4.4 Bevestiging van RAPD-polimorfismes	40
2.1.5 Analise van Weerstandsgen Analooë Polimorfismes (RGAP)	40
2.1.5.1 Inleiers	40
2.1.5.2 Amplifikasie	41
2.1.5.3 Denaturerende Poli-akrielamied-jel elektroforese (PAGE) en silwer-kleuring	42
2.1.5.4 Bevestiging van RGAP-polimorfismes	43
2.1.6 Suiwering van PCR-fragmente	43
2.1.6.1 Agarose jel	43
2.1.6.2 Poli-akrielamied jel	43
2.1.7 DNS-kwantifisering	44
2.1.8 Klonering van gesuiwerde PCR-produkte in “PGEM[®]-T EASY Vector”	44
2.1.8.1 Ligasie	44
2.1.8.2 Voorbereiding van kompetente selle	45
2.1.8.3 <i>Escherichia coli</i> transformasie	45
2.1.8.4 Sifting van positiewe wit kolonies met PCR	45
2.1.8.5 Plasmied DNS suiwering	46
2.1.9 Volgorde bepaling	47
2.1.10 Volgorde analise	47

2.1.11 Volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde DNS (SCAR) ontwerp en analise	47
2.1.11.1 SCAR-inleiers	47
2.1.11.2 Bevestiging van SCAR-merkers	48
2.1.11.2.1 Amplifikasie	48
HOOFSTUK 3: RESULTATE EN BESPREKING	50
3.1 OPSPORING EN MODIFIKASIE VAN RAPD-EN RGAP-MERKERS VIR KORING WEERSTANDSGEENKOMPLEKSE	50
3.1.1 Plant genomiese DNS-ekstraksies	50
3.1.2 RAPD-analise	50
3.1.2.1 Amplifisering en jel-elektroforese	50
3.1.2.2 Bevestiging van RAPD-polimorfisme	51
3.1.3 RGAP-analise	51
3.1.3.1 Amplifisering en PAGE-analise	51
3.1.3.2 Bevestiging van polimorfisme	51
3.2 RAPD-, RGA, EN SCAR-MERKERS OPGESPOOR VIR DIE ONDERSKEIE INTROGRESSIES	54
3.2.1 Die <i>Triticum dicoccoides</i> introgressie (S8)	54
3.2.1.1 RAPD-analise	54
3.2.1.2 SCAR-ontwerp en analise	55
3.2.1.3 RGAP-analise	59
3.2.2 Die <i>Aegilops sharonensis</i> translokasie (S12)	59
3.2.2.1 RAPD-analise	59
3.2.2.2 RGAP-analise	59
3.2.3 Die <i>Aegilops speltoides</i> translokasie (S13)	60
3.2.3.1 RAPD-analise	60
3.2.3.2 SCAR-ontwerp en analise	62
3.2.3.3 RGAP-analise	65
3.2.3.4 SCAR-ontwerp en analise	66

3.2.4 Die <i>Aegilops kotchy</i> translokasie (S14)	72
3.2.4.1 RAPD-analise	72
3.2.4.2 RGAP-analise	72
3.2.5 Die <i>Aegilops peregrina</i> translokasie (S15)	72
3.2.5.1 RAPD-analise	72
3.2.5.2 SCAR-ontwerp en analise	73
3.2.5.3 RGAP-analise	73
3.2.6 Die <i>Aegilops biuncialis</i> translokasie (Smac)	77
3.2.6.1 RAPD-analise	77
3.2.6.2 RGAP-analise	78
3.2.7 Die <i>Aegilops neglecta</i> translokasie (S20)	78
3.2.7.1 RAPD-analise	78
3.2.7.2 SCAR-ontwerp en analise	79
3.2.7.3 RGAP-analise	82
3.2.7.4 SCAR-ontwerp en analise	83
3.3 SAMEVATTING	88
HOOFSTUK 4. ADDENDUMS	91
4.1 ADDENDUM A: RAPD-INLEIERSTELLE	91
4.2 ADDENDUM B: RAPD-AMPLIFIKASIE PRODUKTE	96
4.3 ADDENDUM C: RGAP-PROFIELE	123
5. HOOFSTUK 5: VERWYSINGS	145

HOOFSTUK 1: LITERATUURSTUDIE

1.1 INLEIDING

Die doel met planteteelt is om voortreflike kultivars van 'n gewas te ontwikkel wat aangepas is by spesifieke omgewingstoestande en wat geskik is vir ekonomiese produksie in 'n kommersiële verbouingsstelsel. Planteteelt het reeds begin toe die eerste primitiewe landbouers doelbewus begin het om die nageslag van spesifieke plante, wat byvoorbeeld groter en beter sade gelewer het, te behou terwyl die swakker plante uitgeskakel is. Hedendaagse planteteelt is dus 'n versnelde weergawe van 'n natuurlike seleksieproses wat reeds sedert die verskyning van plante op aarde bestaan, en wat die manipulasie van genetiese variasie binne 'n gewas en die seleksie van voortreflike rekombinante vanuit die variasie, behels (Duvick 2002). Natuurlike seleksie behou die bes-aangepaste plante, waarvan die fenotipes die grootste kans op oorlewing, reproduksie en verspreiding van nageslag onder heersende biotiese en abiotiese omgewingstoestande het. In teenstelling hiermee is menslike seleksie gewoonlik nie op oorlewing van die plante in hul natuurlik habitat gefokus nie. Menslike seleksie was tot onlangs primêr gefokus op die uniforme uitdrukking van verskeie verlangde eienskappe, soos sade en vrugte wat almal dieselfde grootte en of vorm het, gelyktydig rypword, groter opbrengste lewer en die oes daarvan vergemaklik (Brown & Caligari 2008). Hierdie benadering het egter veroorsaak dat verboude kultivars nie dieselfde inherente vermoë as hul wilde naverwante behou het om hulself teen natuurlike patogene (waarvan roessiektes in die geval van graangewasse die vernaamste is) te beskerm nie. Moderne verbouingspraktyke waarvolgens 'n beperkte aantal homogene genotipes (kultivars) oor groot geografiese gebiede verbou word, gepaard met erodering van natuurlike variasie binne die koring geenpoel het daartoe gelei dat die aantal effektiewe weerstandsgene wat in teling benut kan word baie beperk is (Feuillet *et al.* 2007). Na raming mag roessiektes teen 2016 verantwoordelik wees vir 'n jaarlikse verlies van 25 miljoen ton van die wêreld se koringopbrengs (Durable Rust Resistance in Wheat project 2008). Wilde grasspesies, wat verwant is aan verboude koring, stel 'n ryk bron van nuttige, bykomstige variasie daar wat in koringteelt benut sou kon word (Jiang *et al.* 1994; Merezhko 1998). Weerstandsgene kan vanuit hierdie wilde verwantes na koring oorgedra word en gepaste tegnieke om dit te bewerkstellig is reeds ontwikkel (Knott 1989; Chrispeels & Sadava 1994). Die oordrag van weerstandsgene mag egter gepaard gaan met die gelyktydige oordrag van ongewenste gene en oortollige, vreemde chromatien wat nadelige effekte soos verlaagde opbrengs tot gevolg kan hê (Graybosch 2001; Walsh 2008). Onlangse, sterk ontwikkeling van molekulêre merkertegnieke het egter meegehelp om die opsporing van

weerstandsgene, oordrag daarvan na verboude koring asook die karakterisering en modifikasie van translokasies te vergemaklik (Feuillet *et al.* 2007). Merkerbemiddelde oordrag en seleksie het egter ook meegehelp om sommige van die ander probleme wat in weerstandsteling ervaar word, te oorbrug. Hierdie sluit in: dat die teenwoordigheid van die oorgedraagde weerstandsgene slegs waargeneem kon word in die teenwoordigheid van die patogeen; dat die effek van sommige weerstandsgene oorskadu word wanneer meer as een weerstandsgen oorgedra word; en dat die teenwoordigheid van hierdie gene dan nie maklik opspoorbaar is in die nageslag nie (Hospital 2003).

Terwyl die eerste plantetelers staatgemaak het op sigbare fenotipiese kenmerke wat direk of indirek geassosieerd was met sekere agronomies-belangrike kenmerke, het die vooruitgang in molekulêre biologie dit egter moontlik gemaak om gedetailleerde inligting rakende die posisie en funksie van gene te bekom. Molekulêre merkers word toenemend deur plantetelers gebruik vir die seleksie (direk of indirek) van kenmerke wat moeilik is om te evalueer, of waarvan die toetsing tydrowend of nie koste-effektief is (Koebner & Summers 2003). Deur gebruik te maak van DNS-merkers wat nou gekoppel is met weerstandsgene, kan nageslagspopulasies akkuraat gesif word vir die teenwoordigheid van meer as een weerstandsgen, en in die afwesigheid van die patogeen. DNS merkerbemiddelde seleksie kan boonop in enige ontwikkelingsfase van die plant gebruik word, wat beteken dat seleksie reeds in die saailingfase gedoen kan word en plante sonder die verlangde gene nie tot volwassenheid gekweek hoef te word nie (Anderson & Lübberstedt 2003). Dit maak ook versnelde terugkruising moontlik om die genetiese materiaal van die herhalende ouer te herwin en oortollige, ongewenste DNS te verwyder (Hospital 2003). Molekulêre merkertegniese bied dus die potensiaal om kultivars te skep met presiese kombinasies van verlangde eienskappe en genotipes deur die akkuraatheid en effektiwiteit van merkerbemiddelde seleksie te verfyn (Belzile 2002).

1.2 DIE KORING ROESSIEKTES

Blaarroes, stamroes en streeproes (Figuur 1.1) is die drie roessiektes wat op koring (*Triticum aestivum*) voorkom. Dit is van die oudste bekende siektes en epidemies met gepaardgaande, algehele oesverliese is al sedert antieke tye aangeteken. Alhoewel wêreldwye epidemiese oesverliese nie hedendaags algemeen voorkom nie, word noemenswaardige vlakke van skade aangerig in spesifieke koring verbouingstreke.

Blaarroes en streeproes kom hoofsaaklik op die blare voor terwyl stamroes op beide die blare en stamme ontwikkel. Tydens sporulasie bars die epidermis oop om spore vry te stel. Die spoorliggame kan dan die vorm van roeskleurige kolle/puisies (blaar en stamroes) aanneem of longitudinale strepe (streeproes). Die roes beskadig die gasheer epidermis wat veroorsaak dat transpirasie en respirasie verhoog en dat fotosintese afneem. Die gevolg hiervan is 'n afname in die plant se groeikragtigheid en saadset. Die graad van infeksie en gevolglike skade aangerig varieer na gelang van verskille in die aanvang van infeksie, koringkultivar, omgewingskondisies en roespatotipes. Die infeksiefenotipes kan varieer van geel chlorotiese vlekke en nekrotiese vlekke tot sporulerende uridiospore van verskillende groottes (Russel 1978; Wiese 1987).

Benewens die verlies in saadopbrengs en blaarmassa verlaag roessiektes ook die waarde van koring as 'n weidingsgewas. Die teenwoordigheid van die roes verlaag die plant se smaaklikheid en mag soms selfs toksies wees vir vee. Die roes mag verder ook die plant meer vatbaar maak vir sekondêre infeksie deur ander patogene (Wiese 1987).



Figuur 1.1 Die drie roessiektes veroorsaak deur lede van die *Puccinia* genus: A) Blaarroes, *P. triticina*. B) Stamroes, *P. graminis*. C) Streeproes, *P. striiformis* (Fotos: Ida Paul, plantpatoloog LNR-Kleingraaninstituut, Stellenbosch).

1.2.1 Die patogene

Koringroes word veroorsaak deur hoogs gespesialiseerde swamme wat aan die genus *Puccinia* behoort. Die swamme is verpligte biotrofe parasiete wat slegs kan groei en voortplant op lewende gasheer (Staples 2003). Die verskillende *Puccinia* spesies verskil ten opsigte van morfologie, lewensiklus en optimale groeitoestande (Wiese 1987; Kolmer 2005).

Blaarroes word veroorsaak deur *P. triticina*, stamroes deur *P. graminis* en streeproes deur *P. striiformis*. Elke een van hierdie spesies bestaan uit fisiologies verskillende vorms bekend as patotipes of rasse wat van mekaar verskil ten opsigte van hul vermoë om 'n spesifieke gasheerreeds te parasiteer. Die infeksietipe veroorsaak deur elke patotipe is die gevolg van 'n spesifieke interaksie tussen die produkte van 'n geen vir virulensie in die patogeen en 'n weerstandsgeen in die gasheer (Wiese 1987; Kolmer 2005).

1.2.1.1 Blaarroes

Blaarroes, ook bekend as bruin-, dwerg-, of oranje-roes is die mees algemene en wydverspreide van die drie roestipes. Dit is veral prominent in gematigde klimaatstoestande waar koring laat in die seisoen ryp word. Die lande waar blaarroes as die prominentste roespatogeen voorkom sluit in Oos-Europa, Egipte, Suid-Amerika en die VSA (Wiese 1987; Murray *et al.* 1998). In die Wes-Kaap, en ook winterreënvalstreek van Suid-Afrika, word ongeveer 300 000 ha lentekoring verbou onder gematigde tot hoë risiko omgewingskondisies wat gunstig is vir die ontwikkeling van blaarroes. 'n Studie onderneem deur Boshoff *et al.* (2002a) het gevind dat blaarroes ernstige opbrengsverliese in vatbare kultivars, wat verbou word in die streek, tot gevolg kan hê indien langdurige toestande, gunstig vir siekteontwikkeling sou voortduur.

Hoë humiditeit, tesame met temperature van 15°C tot 22°C skep die optimale omgewing vir siekte-ontwikkeling. Onder hierdie kondisies kan nuwe spore elke 7-10 dae gevorm word wat kan veroorsaak dat die siekte binne 'n paar weke tot 'n epidemie ontwikkel in vatbare kultivars. Afhangende van die kultivar vatbaarheid is verliese van tussen 7 % tot 63 % aangeteken (Murray *et al.* 1998, Boshoff *et al.* 2002a).

Tipiese simptome van die siekte is ronde tot ovaalvormige, oranje-rooi uridia wat verspreid of saamgegroepeer, hoofsaaklik op die boonste oppervlaktes van die blare en blaarskede voorkom.

Onder hoë siektedruk mag die aar ook geïnfecteer word (Knott 1989; Murray *et al.* 1998). Die grootste skade word aangerig weens afsterwing en gevolglike uitdroging van die blare wat die fotosintetiserende vermoë van die plant strem en aanleiding gee tot die vorming van verkrimpte koringpitte (Wiese 1987; Knott 1989). Die uridia van *P. triticina* is tot 1.5 mm in deursnee, word dikwels omring deur chlorotiese selle en produseer massas rooi-bruin sferiese uridiospore 15-30 µm in deursnee. Aan die einde van die groeiseisoen ontwikkel telia (van dieselfde grootte as die uridia) wat later swart teliospore sal vorm (Wiese 1987; Knott 1989; Murray *et al.* 1998).

Die hoof gashere van blaarroes is koring, korog en gars. Die alternatiewe gasheer is spesies van die genus *Thalictrum* (Knott 1989). Die swam is egter tot dusvêr nog nie op een van die plaaslike spesies aangetref nie. In Suid-Afrika oorleef die swam as dormante miselium (massas ineengestremde swamdrade) of uridiospore op opslagkoring in die afseisoen (Kilian & Burger 2008).

1.2.1.2 Stamroes

Stamroes is ook bekend as swartroes of swart-stamroes. Hierdie siekte, veroorsaak deur *P. graminis*, kan afhangende van die groeistadium van die plant of graad van infeksie, algehele oesverliese tot gevolg hê (Wiese 1987; Knott 1989). Stamroes ontwikkel optimaal by 26°C, maar word geïnhibeer benede 15°C en bo 40°C. Die siekte is dus 'n groter bedreiging in somer- as winterreënvalstreke (Murray *et al.* 1998). Die areas waar stamroes jaarliks die grootste oesverliese veroorsaak sluit in Australië, Nieu-Seeland, die suide van Indië, Suid-Afrika, die VSA en Kanada (Knott 1989). Gemiddelde opbrengsverliese van 35 % is al weens stamroes oor 'n wye reeks koringkultivars in Suid-Afrika aangeteken (Pretorius *et al.* 2007).

Die langwerpige en donker, bruin-rooi uridia van *P. graminis* kan op die stingels, beide oppervlakte van die blaar, blaarskedes en selfs die are voorkom. Die uridia is relatief groot (3 mm x 10 mm), verhewe en laat 'n kenmerkende letsel in die plantweefsel soos dit deur die epidermis bars. Die uridiospore self is oranje-rooi, ovaalvormige of ellipsoïede struktuurtjies van 15-20 µm x 40-60 µm (Wiese 1987; Knott 1989). Veroudering van die uridia inisieer die vorming van grys-swart teliospore wat aanleiding gegee het tot die algemene gebruiksnaam van swartroes (Murray *et al.* 1998). Stamroes infeksie veroorsaak dat fotosintese afneem, vervoer van water en voedingstowwe deur die plant ontwig word, wortelgroei gestrem word en die stingel uiteindelik

knak of omval. Laasgenoemde faktor maak dit ook moeilik om die sade te oes wat verder bydra tot verlaagde opbrengs (Knott 1989).

Die roes is gewoonlik beperk tot koring, maar kom ook op gars, hawer, rog en korog voor (Pretorius *et al.* 2007). Stamroes, net soos blaarroes, vereis 'n alternatiewe gasheer vir sy geslagtelike stadium. In die geval van stamroes dien suurdoring (*Berberis vulgaris*) as die tussengasheer. Geen inheemse alternatiewe gasheer kom in Suid-Afrika voor nie en die swam kan sodoende nie sy lewensiklus voltooi nie. Die uridiospore is dus die enigste bron van innokulum vir die siekte (Kilian & Burger 2008).

1.2.1.3 Streeproes

In teenstelling met blaar- en stamroes is streeproes, ook bekend as geelroes, beperk tot koeler klimaatstreke. Temperature tussen 10°C en 15°C, gepaard met hoë humiditeitstoestande, is optimaal vir die ontwikkeling van epidemies (Murray *et al.* 1998). Die wêrelddele waar streeproes die grootste skade aan oeste aanrig sluit in China, Europa, Wes-Asië, Ethiopië, Kenia, die westelike state van die VSA, hoërliggende gedeeltes van Meksiko, Suid-Amerika, Egipte en Australië (Knott 1989). Streeproes is in 1996 vir die eerste keer in Suid-Afrika, op koring in die Wes-Kaap aangetref. Die epidemie wat dieselfde jaar daar uitbreek het, was 'n aanduiding dat streeproes een van die belangrikste blaarsiektes van koring in Suid-Afrika kon word. Die roes het sedertdien na al die belangrike verbouingsgebiede, naamlik die Oos-Kaap, dele van die Vrystaat en Kwazulu-Natal versprei (Boshoff *et al.* 2002b).

Streeproes infekteer koring, gars en verskeie ander grasspesies (Boshoff *et al.* 2002b). Infeksiesimptome is kenmerkende langwerpige, geel uridia (0.5 µm x 1 µm) wat in strepe tussen die nerwe van die blare gerangskik is. In weerstandbiedende gasheerplante word die infeksiepunt omring deur chlorotiese of nekrotiese vlekke. Alle plantorgane insluitend die koringkorrels kan egter geïnfekteer word. Die uridiospore is geel-oranje, sferies en is 20 µm-30 µm in deursnee (Wiese 1987; Knott 1989). Telia, wat swart teliospore produseer word laat in die seisoen gevorm in nekrotiese weefsel en veroorsaak donker strepe op die blare (Knott 1989; Murray *et al.* 1998).

'n Alternatiewe gasheer en gepaardgaande geslagtelike fase is nog nie vir *P. striiformis* geïdentifiseer nie, maar die swam plant ongeslagtelik voort deur herhaalde siklusse van uridiavorming (Wiese 1987; Knott 1989). Die swam oorleef as dormante miselium of uridiospore

op opslagkoring in die afseisoen (Murray *et al.* 1998). Verlies in opbrengs word, soos met blaarroes, veroorsaak deur blaarverlies en reduksie van die grootte van die koringkorrels (Knott 1989).

1.2.2 Lewensiklus

Roesswamme het komplekse lewensiklusse bestaande uit ongeslagtelike en geslagtelike voortplantings-stadiums waartydens vyf verskillende soorte spore gevorm kan word. Die ongeslagtelike fases kom op die koring-gasheer voor, terwyl die geslagtelike fase op 'n alternatiewe gasheer plaasvind (Wiese 1989; Kolmer 2005).

Uridia is die swam spoorliggame (puisies) wat op vatbare plante waargeneem word en waarbinne die uridiospore gevorm word. Uridiospore is eensellige, dikariotiese swamspore wat twee geneties-verskillende kerne bevat en in groot massas vanuit die uridia op die gasheeroppervlakte vrygestel word. Die uridiospore speel 'n belangrike rol in die verspreiding en aanvanlike infeksie van die koring-gasheer met sy roespatogeen. Die uridiospore kan oor groot afstande deur die wind versprei word om nuwe infeksie te bewerkstellig of dit kan dieselfde plant her-infekteer (Wiese 1987; Knott 1989).

Uridiospore ontkiem wanneer dit in kontak kom met vry water op die koringplant. Die gevormde kiembuis groei tot by die opening van 'n huidmondjie waar dit 'n appressorium vorm. Suksesvolle infeksie word gekenmerk deur vorming van 'n membraanbegrensde struktuurtjie binne die huidmondjie-holte, waaruit swamdrade groei en oorsprong gee aan haustorium-moederselle (Wiese 1987; Knott 1989).

Afhangende van die optimum temperatuur van die spesifieke roespatotipe kan infeksie binne 5 tot 8 dae waargeneem word waarna sporulering begin vir die vorming van nuwe uridiospore. Blaar-, stam- en streeproes is in staat om slegs by wyse van hierdie ongeslagtelike fase te bly voortbestaan deur die herhalende siklusse van spoorvorming en infeksie van die gasheer onder gunstige kondisies (Wiese 1987; Knott 1989).

Uridiospore-produksie op gasheerplante mag opgevolg en vervang word deur die produksie van swart dikariotiese teliospore. Teliospore oorleef in klimaatuiterstes en verseker so die voortbestaan van die patogeen onder ongunstige temperature of in die afwesigheid van die

gasheer. Die ontkieming van teliospore na oorwintering lei tot fusie van die kerne binne die dikarion, meiose en die produksie van 'n pro-miselium wat 4 haploïede basidiospore bevat. In die geval van blaar- en stamroes kan die basidiospore nie die koring gasheer her-infekteer nie, maar wel die alternatiewe gasheer (Wiese 1987; Knott 1989).

Infeksie van die alternatiewe gasheer met die basidiospore lei tot die vorming van pycnia waarbinne pycniaspore van verskillende paringstipes (+ of -) ontwikkel. Die fusie van die verskillende haploïede paringstipes herstel die dikarion. Hierdie geslagtelike fase is dus belangrik vir genetiese rekombinasie en die ontwikkeling van nuwe patotipes. Die dikarion ontwikkel tot 'n aecium in die alternatiewe gasheer se epidermis en produseer geel aeciospore wat weereens die koring-gasheer kan infekteer (Wiese 1987; Knott 1989).

1.2.3 Verandering in virulensie en populasiesamestelling van roespatogene

Die volgehoue vermoë van roes om van die vernaamste koringsiektes te bly word toegeskryf aan die roesswam wat in staat is om geneties te kan verander en ook duisende spore te produseer wat effektief versprei word. Effektiewe weerstandsgene kan nutteloos raak vanweë die evolusie of introduksie van 'n nuwe virulente patogeen variant wat in staat is om die weerstand in bestaande plante te oorkom. Variasie binne die roesswamme en gevolglike patotipes kan ontstaan weens mutasie, migrasie, somatiese verbastering, seleksie of toeval (Knott 1989; Kolmer 2005).

1.2.3.1 Mutasie

Mutasie is die belangrikste vorm van variasie en evolusie in die roespatogeen. Hoewel min bekend is rakende die aard van die gasheer en patogeen geenprodukte betrokke by die weerstandsreaksie word aangeneem dat die produkte van weerstandsgene optree as reseptore vir die direkte of indirekte produkte van die patogeen se avirulensie-gene. Reseptor-ligand reaksies is hoogs spesifiek. Weerstand in die gasheer en avirulensie in die patotipe word gewoonlik as 'n dominante kenmerk oorgeërf terwyl vatbaarheid in die gasheer en virulensie in die patotipe resessief is (Russel 1978; Kolmer 2005). 'n Patogeen moet die ooreenstemmende virulensie-geen vir 'n spesifieke gasheer weerstandsgeen besit om dit te kan parasiteer en/of dit moet in staat wees om herkenning deur die plant te omseil deur modifikasie of inaktivering van sy avirulensie-geen. Resessiewe geenmutasies kom meer gereeld voor as dominante geenmutasies. Aangesien roesswamme dikariotiese kerne besit word 'n dubbele mutasie vereis in 'n homosigotiese dikarion,

en een mutasie in 'n heterosigotiese dikarion, om 'n nuwe, virulente genotipe te produseer. Mutasies van hierdie aard kom na raming teen 'n frekwensie van 1×10^{-12} voor (Knott 1989). Hoewel dit na 'n skraal moontlikheid klink moet in ag geneem word dat uridiospore in groot getalle geproduseer word. Die groot getalle nuwe patotipes wat jaarliks wêreldwyd geïdentifiseer word is bewys dat hierdie mutasies wel plaasvind (Ellis *et al.* 2000).

'n Enkele virulente ras van *P. striiformis f. sp. tritici* is vir die eeste keer in 1997 in die ooste van Australië aangetref nadat dit per ongeluk deur die mens vanaf Europa oorgedra is. Hierdie patogeen was slegs virulent teen die streeproesweerstandsgene *Yr2*. Binne 10 jaar het die patogeen ontwikkel in 15 verskillende rasse wat virulensie getoon het teen vyf addisionele weerstandsgene (Kolmer 2005).

1.2.3.2 Migrasie

Die roessiektes verander nie net gereeld nie, maar word ook effektief oor groot areas versprei. Die massas geproduseerde spore, tesame met windverspreiding duisende kilometers vanaf die aanvanklike infeksiepunt, maak van die roes-swamme uiters effektiewe parasiete. Roesspore word deur sterk winde gelig waarna dit deur lugstrome na hoogtes bo 1000 m vervoer word. Op hierdie hoogte word die spore oor groot areas meegevoer met die bewegende lugmassas waarna periodieke afwaartse lugstrome of reën die spore oor nuwe gebiede deponeer. Die mees bekende jaarlikse migrasie geskied op die *Puccinia*-roete oor 'n afstand van meer as 3000 km wat strek vanaf sentraal suidelike VSA tot in die suide van Kanada. Migrasie vind stapsgewys plaas namate die koring ontwikkel. Infeksies word in die herfs op winterkoring gevestig waarna die uridiospore deur die wind na die noorde van die VSA en Kanada versprei word en sodoende die lente en somerkoring infekteer (Knott 1989). 'n Ander bekende migrasie-roete is die tussen Australië en Nieu-Seeland wat verantwoordelik was vir die verspreiding van streeproes vanaf Australië na Nieu-Seeland. Daar is ook getuienis vir die windverspreiding van roes vanaf Oos-Afrika na Australië en die langafstand verspreiding van roes tussen Europese lande (Kolmer 2005).

1.2.3.3 Somatiese verbastering

Variasie kan blykbaar ook geskep word deur die versmelting van swamdrade (“hifes”) van verskillende, virulente stamroesgenotipes wat dieselfde gasheerplant infekteer. Nukluêre uitruiling en herrangskikking van die kerne geskied om 'n nuwe dikarion te vorm. Afhangende van die

aantal lokusse en die genetiese samestelling van die kerne in die ouerlike dikarione kan nuwe genotipiese kombinasies ontstaan met gepaardgaande nuwe virulensie eienskappe (Knott 1989).

1.2.3.4 Seleksie

'n Patotipe van 'n roespatogeen met virulensie vir 'n weerstandsgeen in 'n voorheen bestaande gasheer sal gou gevestig raak in 'n patogeenpopulasie as die vatbare gasheer oor 'n groot area en vir lang periodes verbou word. In die afwesigheid van die vatbare gasheer, en omdat die roespatogene spesifieke en verpligte biotrofe organismes is, sal die voorkoms van die patotipe weer daal (Russel 1978; Singh 1986).

1.2.3.5 Geslagtelike rekombinasie

Geslagtelike rekombinasie is 'n belangrike bron van variasie vir blaar- en stamroes virulensie waar 'n alternatiewe gasheer voorkom. 'n Studie van Roelfs en Groth (1980) het getoon dat geslagtelike rekombinasie tot meer kombinasies vir virulensie lei as ongeslagtelike rekombinasie (somatiese verbastering).

1.2.4 Weerstand teen roespatogene

Gasheerplantweerstand is die inherente, oorgeërfde vermoë van 'n gasheerplant om na infeksie die vestiging of verdere groei en kolonisasie van 'n patogeen te voorkom. Die aanvanklike vestiging kan geïnhibeer word deur weerstandsmeganismes wat reeds teenwoordig is in die gasheer of deur meganismes wat geaktiveer word deur inokulasie. Die vooraf bestaande weerstandsmeganismes kan fisies of fisiologies van aard wees soos byvoorbeeld in die geval van gelignifiseerde selwande. Die selwande verskaf nie net 'n fisiese buffer nie, maar ook 'n fisiologiese buffer omdat dit dalk nie maklik deur die patogeen se ensieme afgebreek kan word nie (Russel 1978; Richter & Ronald 2000). Die laaste linie van verdediging vir die plant indien die bestaande (inherente) weerstandsmeganismes oorkom word, of in plante waar dit dalk in die eerste plek ontbreek, is die reaktiewe weerstandsmeganismes. Twee tipes weerstandstelsels kan vir die roessiektes onderskei word nl: ras-spesifieke en ras-nie-spesifieke weerstandsreaksies (Ellis *et al.* 2000).

1.2.4.1 Ras-spesifieke weerstand (hoofgeen weerstand; vertikale weerstand)

Die weerstandsmeganisme bied weerstand teen die suksesvolle vestiging van 'n infeksie-setel van 'n spesifieke patoogeenras. Dit is dus hoogs effektief teen sekere rasse van 'n patoogeen, maar net so ook hoogs oneffektief teen ander rasse van dieselfde patoogeen. Hierdie verskynsel het oorsprong gegee aan die konsep van 'n geen-vir-geen interaksie tussen die patoogeen en sy gasheer soos vir die eerste keer bekryf is deur Flor uit sy studies tussen flas-roes (*Meampsora lini*) en sy gasheer *Linum usitatissimum* (Singh 1986). Flor het tot die gevolgtrekking gekom dat vir elke weerstandsgen teenwoordig in die gasheerplant, 'n gegewe patoogeenras oor 'n spesifieke en komplementêre virulensie-geen moet beskik om die weerstand te oorkom (Nelson 1973; Worland & Snape 2001; Cortese *et al.* 2003). Indien die patoogeen egter 'n komplementêre avirulensie geen het sal dit 'n weerstandsreaksie in die plant ontlok. Die weerstand word uitgedruk in die vorm van 'n hipersensitiewe reaksie wat ontketen word sodra die teenwoordigheid van die patoogeen in die plant herken word. In die geval van roesswamme is dit die kiembuis wat die plantselwand binnedring en in kontak kom met die protoplasma van die sel (Knott 1989; Singh 1986).

Die aktivering en verloop van die hipersensitiewe reaksie behels 'n komplekse sisteem van biochemiese reaksies tussen verklikkers geproduseer deur die patoogeen en reseptore binne die gasheerplant waarvan die presiese meganismes nog onduidelik is (Heath 1997). Die hipersensitiewe reaksie veroorsaak dat die selle omliggend tot die infeksiepunt toksiese verbindings vrystel wat snelle afsterwing van die plantweefsel bewerkstellig. Selnekrose word gekenmerk deur die lignifisering van omliggende selle wat veroorsaak dat die kiembuis geïsoleer word binne die spesifieke sel en sodoende word verdere verspreiding verhoed (Richter & Ronald 2000). Die infekerende patoogeen mag dus direk gedood word as gevolg van die toksiese verbindings vrygestel of omdat die afgestorwe plantselle nie meer die verpligte parasiet kan onderhou en voorsien van voedingstowwe nie (Russel 1978; Singh 1986).

Hoewel uitsonderings bestaan, word ras-spesifieke weerstand in die gasheer geneties oorgedra as 'n dominante enkelgeen. Die gene in die gasheer ontlok 'n heftige weerstandsreaksie teen sy patoogeen waar vatbare plante duidelik van weerstandbiedende plante onderskei kan word. Daar kan dus maklik vir die kenmerk geselekteer word en dit kan ook geneties relatief eenvoudig oorgedra word. Om hierdie redes fokus die meeste teelprogramme dus op die ontwikkeling van variëteite met ras-spesifieke weerstand (Nelson 1973; Knott 1989). Alhoewel hierdie weerstand volledig is, is dit nie stabiel oor lang tydintervalle nie en word dit relatief vinnig oorkom deur die

ontwikkeling van 'n nuwe ras binne 'n spesifieke patogeen. Die verkryging van virulensie word ook verder aangevuur deur die hoë seleksiedruk daargestel deur die gasheer a.g.v. die dramatiese hipersensitiwiteitsreaksie (Nelson 1973; Knott 1989).

1.2.4.2 Ras nie-spesifieke weerstand (nie-hoofgeen weerstand; horisontale weerstand)

Die ras nie-spesifieke weerstandsmeganisme bied weerstand teen die kolonisasie en verdere groei of verspreiding van die roespatoogeen, ongeag die ras, na suksesvolle infeksie deur die parasiet. Dit vertraag dus die mate en tempo van siekteontwikkeling (Nelson 1973; Knott 1989). Hierdie weerstandsmeganisme ontlok nie 'n hipersensitiwiteitsreaksie waarvolgens die vatbare en weerstandbiedende plante geredelik van mekaar onderskei kan word nie. Dit word eerder gekenmerk deur 'n reeks intermediêre infeksie-reaksies wat moeilik van mekaar onderskei kan word. Hierdie reaksie word toegeskryf aan die poligeniese aard van die weerstandsmeganisme, waar 'n aantal gene, elkeen met 'n klein effek, kwantitatief of kumulatief bydra tot die algehele weerstand. Die komplekse aard van die weerstand bemoeilik dus die gebruik van die tersaaklike gene in teelprogramme (Knott 1989).

1.2.5 Beheer van roessiektes

1.2.5.1 Verbouingspraktyke

Koring roespatoogene is hoogs spesifieke en gespesialiseerde swamme wat slegs op 'n noue gasheerreeds nl. koring (en soms gars) floreer (Knott 1989). Populasies van sulke patogene neig om te groei indien dieselfde gewas jaarliks in dieselfde area geplant word. Deur wisselbou toe te pas en 'n gewas aan te plant wat nie 'n gasheer is nie, kan voorkom word dat die patogeen tot skadelike vlakke opbou (Chrispeels & Sadava 1994). Die beginsel agter die strategie is dat die patogeen se lewensiklus onderbreek of gestop word (Knott 1989). Die patogeen-inokulum vir die volgende plantseisoen kan tydens oorwintering verminder of ge-elimineer word deur opslagkoring en die tussengasheer van die roespatoogeen te verwyder deur byvoorbeeld beweiding of deur die land om te ploeg (Murray *et al.* 1998).

Deur manipulasie/aanpassing van die plant- en oesseisoen kan die tye wanneer die gasheer die kwesbaarste is, of die patogeen die meeste voorkom, vermy word. Kultivars met 'n korter rypwordingsperiode kan gebruik word wat die patogeen dus minder tyd gee om ernstige skade aan te rig. Vroeër plantdatums kan, waar moontlik, geïmplementeer word om byvoorbeeld in die geval

van stamroes die vernaamste infeksieperiode aan die einde van die seisoen te vermy (Knott 1989; Wallwork 1992).

1.2.5.2 Chemiese beheer

Roessiektes kan chemies beheer word deur die saad vooraf met 'n swamdoder te behandel, of die plant op die land met die swamdoder te bespuit (Chrispeels & Sadava 1994). Data versamel deur Komen en Pretorius (2007) het egter getoon dat saadbehandeling teen stamroes nie effektief is in Suid-Afrika nie. Swamdoders voorkom spoorontkieming en die aanvanklike groei van die roesswam. Swamdoders wat op die land toegedien word moet dus op die plantoppervlak teenwoordig wees voordat die swam daarop land om effektief te wees. Soos die plant nuwe organe vorm moet die swammiddel dus her-toegedien word, 'n proses wat tot groot uitgawes kan lei. Daar moet dus sterk motivering bestaan vir die aanwending van die swamdoder, byvoorbeeld 'n hoogs vatbare kultivar, maar wat hoë opbrengste lewer om die uitgawes te regverdig (Chrispeels & Sadava 1994). Tydens die toediening van die swamdoder bereik groot hoeveelhede daarvan nie die aanvanklike teiken, naamlik die koringplant of spesifieke plantorgaan nie. Dit kan weggewaai word deur die wind, afgewas word deur reën en op die grond eindig wat 'n negatiewe omgewingsimpak kan hê. Sommige swamdoders is ook toksies vir soogdiere en dit kan dus ernstige gesondheidsrisikos inhou vir mense. 'n Verdere nadeel is dat die patogene kan aanpas om die chemiese stowwe te verdra (Chrispeels & Sadava 1994).

1.2.5.3 Genetiese beheer

Gasheerplant-weerstand is deur Nelson (1973) beskryf as die vermoë van 'n plantgenotipe om in die aanwesigheid van 'n patogeen verlies i.t.v kwaliteit of kwantiteit van die verlangde plantprodukt te voorkom. Die ontwikkeling van patogeen weerstandbiedende kultivars is die effektiefste, mees ekonomiese en omgewingsvriendelike metode vir die beheer van roessiektes. Die gebruik van bestande kultivars verg geen ekstra onkoste nie omdat chemiese middels en die apparaat vir die toediening van die spuitstowwe nie aangekoop hoef te word nie (Nelson 1973; Knott 1989).

Effektiewe weerstandsgene kan nutteloos raak vanweë die evolusie of introduksie van 'n nuwe virulente patogeen variant wat in staat is om die weerstand in bestande plante te oorkom (Murray 1993). Die teenwoordigheid van diverse patotipes en vermoë van die swam om nuwe patotipes te vorm (hoofsaaklik deur middel van mutasie) bemoeilik die daarstelling van volhoubare weerstand

teen roes in koring en verminder die aantal beskikbare nuttige roesweerstandsgene. Die samevoeging van verskeie weerstandsgene in een kultivar is 'n belangrike strategie vir duursame weerstand. Die strategie maak staat op die kans dat gelyktydige mutasie in die patoëen by meer as een lokus minder geredelik sal plaasvind as by 'n enkele lokus (Nelson 1973; Singh 1986). Ten einde hierdie strategie te kan toepas, moet daar 'n genoegsame voorraad van diverse en nuttige gene beskikbaar wees om te kombineer.

Die wilde spesies van koring (*Triticum aestivum*) huisves 'n ryk bron van gene vir weerstand teen siektes en insekte, sowel as verskeie ander agronomies-belangrike kenmerke (Whalen 1993). Hierdie diversiteit kan toegeskryf word aan die lang periodes van ko-evolusie met hul patoëne. Die sukses waarmee nuttige gene vanaf die wilde of verwante spesies na koring oorgedra kan word hang grootliks af van die graad van verwantskap tussen die twee spesies (Merker 1992).

1.3 DIE OORDRAG VAN ROESWEERSTANDSGENE VANAF *TRITICUM* EN *AEGILOPS* SPESIES NA GEWONE KORING

Binne die stam Triticeae wat die drie belangrike grane, koring, gars en hawer, sowel as hul wilde spesie naverwante, insluit is verskeie nuttige gene al tussen die genera oorgedra (Jauhar & Chibbar 1999). Hierdie oordragte sluit in: 'n talryke verskeidenheid van effektiewe roes weerstandsgene (McIntosh *et al.* 1995), insek weerstandsgene (McIntosh 1998), gene vir verdraagsaamheid ten opsigte van abiotiese stremmingsfaktore soos droogte en grond-versouting (Ashraf *et al.* 2005; Farooq & Azam 2007), asook gene vir die verbetering van proteïeninhoud en saadopbrengs (Graybosch 2001). Koring en naby-verwante wilde koringspesies ressorteer in die genus *Triticum* L. en bestaan uit 'n reeks diploïede, tetraploïede en heksaploïede grasse met chromosoomgetalle van $2n = 14$, 28 en 42, onderskeidelik. Volgens die klassifikasie van van Slageren (1994) kan koringspesies onderverdeel word in die seksies *Monococca* Flaksb., *Dicoccoidea* Flaksb. en *Triticum*. Die basiese genoomsamestellings van alle koringspesies sluit enkel-genome of kombinasies van genome A, B, D of G in, wat elkeen uit sewe chromosome bestaan (Golovnina *et al.* 2007).

Wilde grasspesies van die genus *Aegilops* (wat naby verwant is aan die verboude koringspesies) besit eweneens talle gene van agronomiese belang en het ook 'n belangrike rol gespeel in die evolusie van verboude koring. *Aegilops* bestaan uit 'n diverse aantal diploïede, tetraploïede en heksaploïede grasse wat die genome C, D, M, N, S en U insluit (Schneider *et al.* 2008). Die

nomenklatuur en klassifikasie van die genus *Aegilops*, soos beskryf deur van Slageren (1994), is deurgaans in hierdie tesis gevolg.

Triticum aestivum, algemeen bekend as broodkoring, is 'n komplekse allo-heksaploïed met $2n = 42$ chromosome wat saamgestel uit die genome A, B en D. Die drie genome is afkomstig vanaf drie diploïede wilde spesie voorouers (Lagudah *et al.* 2001). Die donor van die A-genoom was die diploïede spesie, *Triticum urartu* (genome A^uA^u), en die van die D-genoom was *Aegilops tauschii* (Anderson 2003). Die voorganger van die B-genoom van koring is *Aegilops speltoides* wat die S-genoom besit; hierdie genoom toon groot homologie met die B-genoom van koring (Schneider *et al.* 2008). Molekulêre genetiese analise gedoen deur Dvorak (1998) het getoon dat die S-genoom van *Ae. speltoides* nagenoeg identies is aan die G-genoom van die tetraploïede koring, *Triticum timopheevii*.

Chromosoompare binne dieselfde genoom word as homoloë chromosome beskryf, terwyl ooreenstemmende chromosome van verskillende genome na verwys word as homoeoloë chromosome. Die homoeoloë chromosome van die A, B en D genome is geneties baie naby verwant soos afgelei kan word uit die feit dat die chromosome van een genoom tot 'n mate kan kompenseer vir die verlies van 'n chromosoom of chromosoompare van 'n ander genoom (Anderson 2003). 'n Verdere belangrike verskynsel is dat die koringplant in staat is om die teenwoordigheid van addisionele chromosome te verdra, insluitend die van verwante spesies. Hierdie genetiese buffer-eienskap van heksaploïede koring maak dat dit ideaal is vir chromosoommanipulasie en introgressie van nuwe gene (Sears 1976; Jauhar & Chibbar 1999).

Spesies naby verwant aan koring kan gewoonlik makliker daarmee gekruis word. Indien die chromosome van die skenkerspesie homoloog is aan die van koring kan geenoordrag by wyse van direkte hibridisasie geskied. Oorkruising van homoloë chromosoom-streke kan lei tot invoeging van die teikengeen in 'n koringchromosoom. Hierna word teruggekruis na koring (met seleksie vir die teikengeen) om sodoende die genetiese materiaal van die ontvanger-genoom te herstel (Merker 1992). Die grootste homologie bestaan met spesies van die sogenaamde primêre genepoel van koring en sluit die volgende in: heksaploïede landrasse (AABBDD; $2n=6x=42$), verboude vorms van *T. turgidum* en wilde emmerkoring (*T. turgidum* spp. *dicoccoides*) (AABB; $2n=4x=28$), sowel as die A- en D-genoom skenkers, *T. monococcum* en *Ae. tauschii* ($2n=2x=14$) (Jiang *et al.* 1994; Antonov & Marais 1996). Die sekondêre genepoel van koring sluit ook naby verwante, meestal poliploïede spesies van *Triticum* en *Aegilops* in wat een genoom met heksaploïede koring deel en

waar homoloë chromosoom-rekombinasie moontlik is. Die diploïede B-genoom skenkers van koring in die *Aegilops* Sitopsis afdeling word ook in die sekondêre genepoel geklassifiseer. *Triticum timopheevii* ($2n=2x=2$; AAGG) handhaaf 'n intermediêre posisie tussen die primêre en sekondêre genepoel deurdat die A-genoom homolog is aan die A-genoom van koring terwyl die G-genoom slegs gedeeltelike homologie met die B-genoom van koring toon. Geenoordrag vanaf die sekondêre genepoel is egter moeiliker vanweë verlaagde homoloë chromosoomparing en gevolglike uitruiling van genetiese materiaal (Jiang *et al.* 1994; Antonov & Marais 1996).

Gene van chromosome op nie-homoloë chromosome binne die sekondêre genepoel kan (soos in die tersiêre genepoel) oorgedra word met gebruik van spesiale sitogenetiese tegnieke. Die tersiêre genepoel bestaan uit diploïede en poliploïede spesies wat homoeoloë genome besit en introgressie deur homoloë chromosoomrekombinasie kan dus nie plaasvind nie. Homoeoloë chromosoomrekombinasie kan egter geïnduseer word deur eliminasië van die *Ph*-gene wat homoeoloë chromosoomrekombinasie in koring onderdruk (Sears 1976; Merker 1992). Geenoordrag kan ook bewerkstellig word deur chromosoomtranslokasies te induseer by wyse van ioniserende bestraling, sentriese breking en fusie en somaklonale propagering (Jiang *et al.* 1994; Antonov & Marais 1996).

Probleme geassosieerd met wye spesie kruisings kan die volgende insluit: bevrugting vind nie plaas nie weens kruisingsonverenigbaarheid, embrio-ontwikkeling stop op 'n vroeë stadium, saailinge sterf af, of die nageslag is steriel. Hierdie probleme kan moontlik oorkom word met die gebruik van groeihormone en embrioredding om hibriedplante te bekom. Deur die toediening van kolgisien kan die chromosoomgetal van wilde spesies verdubbel word om kruising met 'n verboude spesie moontlik te maak of die F_1 chromosoomgetal kan verdubbel word om terugkruising te vergemaklik (Knott 1989; Jiang *et al.* 1994).

1.3.1 Wilde spesie-verhaalde weerstandsgeenkomplekse in hierdie studie gebruik

Die Departement van Genetika, US, het in 1993 'n projek geïnisieer vir die identifisering van blaarroesweerstandsgene in *Triticum* en *Aegilops* spesies en die oordrag daarvan na gewone koring (Antonov & Marais 1996).

'n Totaal van 877 *Triticum* en *Aegilops* aanwinste verteenwoordigend van 27 spesies is getoets vir die teenwoordigheid van effektiewe blaarroesweerstands- (*Lr*-) gene met 'n inokulum-mengsel van

die Suid-Afrikaanse blaarroes- (*Puccinia graminis f. sp. tritici*) patotipes UVPrt 2, 3, 8, 9 en 13. Hierdie aanvanklike evaluasie is uitgevoer om virulensie teen die wydste spektrum van (SA) *Lr*-gene wat tot en met die aanvang van die projek in koring bekend was te verseker. Uit 'n totaal van 206 *Triticum* aanwinste wat matig bestand tot bestand teen al die patotipes getoets het, kon 127 (19 spesies) suksesvol gekruis word met die gewone kultivar Chinese Spring (CS). Chinese Spring is as vroulike ouer gebruik omdat dit die *kr1*, *kr2* en *kr3* gene besit wat interspesie kruisings vergemaklik (Antonov & Marais 1996). Talle verbasteringspogings het egter gefaal vanweë onderdrukking van die weerstand in die koring genome in die F₁ of die vorming van embriolose of nie-kiemkragtige sade/saailinge. Sewentig suksesvolle kruisingskombinasies waarvan die basters volledige weerstand teen elkeen van die oorspronklike vyf patotipes uitgedruk het is deur Antonov en Marais (1996) gebruik vir verdere terugkruisings na Chinese Spring. Hierdie potensieel nuttige kombinasies is egter weereens weens probleme soos lae lewensvatbaarheid uitgedun. Die saailinge van 'n oorblywende vyf-en-twintig lyne is getoets met nege blaarroes (*Puccinia triticina*) patotipes (UVPrt 2, 3, 4, 5, 8, 8, 10, 13, 14 en 17), vier stamroes (*P. graminis f. sp. tritici*) patotipes (UVPgt 50, 51, 53 en 54), sowel as twee streeproes patotipes (*P. striiformis f. sp. tritici*) (6 E16A- en 6 E22A-) wat almal endemies aan Suid-Afrika is (Marais *et al.* 2003).

Die lyne wat geblyk het om 'n wye spektrum weerstand te bied is behou en het die volgende ingesluit: vyf lyne met weerstandsgene wat reeds op die koringchromosome geïnkoporeer is en onderskeidelik verhaal is uit *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. speltoides* (*ligustica*) en *Ae. peregrina*, sowel as ses addisie-lyne met addisionele chromosome van *Ae. kotschyi*, *Ae. peregrina*, *Ae. umbellulata*, *Ae. biuncialis* en *Ae. neglecta*. Toetsing van hierdie lyne met die wyer reeks van blaar-, stam- en streeproes patotipes het aangedui dat belowende stam- en streeproes gene in sommige gevalle saam oorgedra is.

1.3.1.1 Die *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* introgressie bekend as S8 (*Lr53/Yr35*)

Marais *et al.* (2003) het die oordrag van 2 gekoppelde gene (*Lr53* en *Yr35*) vanaf die *T. dicoccoides* aanwinst 479 na gewone koring beskryf. 'n Naby-isogeniese lyn, 98M71, met die stamboom *T. dicoccoides*-479/4* 'CS'//3*/'CS-S/3/'(CS'), is ontwikkel wat 'n normale fenotipe, vrugbaarheid en groeikragtigheid getoon het in weerstandbiedende plante. Tydens die aanvanklike oordrag van die gene is slegs vir blaarroes weerstandbiedendheid getoets, maar toetsing op die wyer paneel patotipes het onthul dat 'n streeproesweerstandsgeen saam oorgedra is. Buiten sterk

weerstand teen die Suid-Afrikaanse patotipes het 98M71 ook effektiewe weerstand getoon teen vier Australiese *P. striiformis tritici* (104 e137 A+, 110 E143 A +, 238 E143 A+, 111 E143 A-) patotipes, ses Wes-Kanadese *P. triticina* (12-3 MBDS, 128-1 MBRJ, 74-2 MGBJ, 77-2 TJJJ, 219-3 KBG, PBL) patotipes en vyf patotipe mengsels.

Toetskruis-nageslag van die saailinge het aangedui dat *Lr53* en *Yr35* ko-segregeer en dus naby gekoppel moet wees. Mono- en telosomiese analise, C-band kleuring en RFLP-analise is gebruik om die gene op die kort arm van chromosoom 6B van koring te karteer. Die geïntegreerde streek blyk om as 'n enkele groot koppelingsblok, wat die hele chromosoomarm insluit, oor te erf. Die ontwikkeling van molekulêre merkers vir die karakterisering van hierdie geïntegreerde streek sal noodsaaklik wees in pogings om hierdie segment te verkort (Marais *et al.* 2005a).

1.3.1.2 Die *Aegilops sharonensis* translokasie bekend as S12 (*Lr56/Yr38*)

Gekoppelde blaar- en streeproes weerstandsgene (*Lr56* en *Yr38*) is vanuit die *Ae. sharonensis* aanwys 174 na gewone koring oorgedra (Marais *et al.* 2003). 'n Homosigotiese lyn 8028 (met stamboom: *Ae. sharonensis*-174/7*CS) uit die terugkruisnageslag het sterk weerstand getoon teen die paneel van Suid-Afrikaanse blaar- en streeproespatotipes, sowel as vier Australiese streeproes patotipes (104 e137 A+, 110 E143 A +, 238 E143 A+, 111 E143 A-), ses Wes-Kanadese blaarroes patotipes (12-3 MBDS, 128-1 MBRJ, 74-2 MGBJ, 77-2 TJJJ, 219-3 KBG, PBL) en vyf patotipe mengsels (Marais *et al.* 2003). Die lyn was vatbaar vir stamroes. Roes-weerstandbiedende plante van die homosigotiese lyn 0352-1 (met stamboom: *Ae. sharonensis*-174/9* CS//3*W84-17/3/CS/4/W84-17), ontwikkel deur verdere terugkruising met Chinese Spring en W84-17 het hoë vrugbaarheid en groeikragtigheid getoon. Mono- en telosomiese analise en mikrosatelliet-analise met gekarteerde merkers is gebruik om die gene op chromosoom 6A van koring te karteer. Die geïntegreerde vreemde chromatien blyk om die hele kort arm van chromosoom 6A, sowel as die proksimale gedeelte van chromosoom 6A se lang arm in te sluit. Die weerstand toon ook nie-Mendeliese oorerwing deur beide vroulike en manlike gamete, wat moontlik die gevolg is van interaksie tussen die vreemde en gewone koring chromatien. Die sitogenetiese data het verder getoon dat die translokasie nie met homoeoloë streke op die normale koring-chromosoom 6A rekombineer nie en dat verkorting van die vreemde spesie DNS-segment deur konvensionele kruisteling dus moeilik sal wees (Marais *et al.* 2006). Om die hoeveelheid vreemde chromatien te verminder sal dit nodig wees om homoeoloë chromosoomparing te induseer (met gebruik van 'n *Ph1*-lose toestand) en oorkruising tussen die translokasie en normale chromosome 6A te induseer.

Terselfdertyd sal DNS-merkers wat naby gekoppel is aan die weerstandsgene gevind moet word sodat die translokasie gekarteer en verkorte vorms opgespoor kan word.

1.3.1.3 Die *Aegilops speltoides* var. *ligustica* translokasie bekend as S13 (*LrS13/SrS13/YrS13*)

Marais *et al.* (2003) het die oordrag van blaar-, stam- en streeproes weerstandsgene met tydelike geensimbole *LrS13*, *SrS13* en *YrS13* vanaf die *Aegilops speltoides* aanwins 691 beskryf. Saailinge van nageslag uit die F₁ van 'n terugkruising (*Ae. speltoides*/5*CS//W84-17) na gewone koring het slegs weerstandbiedende nageslag ingesluit toe dit getoets is met 'n paneel van Suid-Afrikaanse blaar- en streeproespatotipes sowel as 'n nuut-beskryfde, endemiese stamroesras 2SA88. Die streeproes weerstandsgene het ook geblyk om effektief te wees teen vier Australiese streeproespatotipes. Wortelpunttellings het aangedui dat die vreemde chromatien wat die weerstand dra op 'n koringchromosoom ingevoeg is. Daar is egter gevind dat die weerstandsgene op die translokasie geassosieer is met gametosied- (*Gc*-) gene wat onlosmaaklik van die weerstand segregeer het. Die *Gc*-gene veroorsaak hoë vlakke van steriliteit, saadverrimpeling met verswakte agrotipe en plantontwikkeling (Marais & Pretorius 1996). Karakterisering van translokasiehomosigote met gebruik van gekarteerde mikrosatellietloki het vervolgens getoon dat die weerstandsgene op chromosoomarm 3AS geïntegreer is (Marais 2008; persoonlike mededeling). Ten einde die translokasiesegment verder te karakteriseer en te probeer om die *Gc*-gene van die weerstand te skei, sal dit nodig wees om verdere molekulêre merkers op te spoor.

1.3.1.4 Die *Aegilops kotschy* translokasie bekend as S14 (*Lr54/Yr37*)

Aegilops kotschy aanwins 617 is deur Marais *et al.* (2003) gebruik om 'n *Triticum aestivum* L. disomiese addisielyn te ontwikkel met 'n ekstra homoloë chromosoompaar wat uit die skenkerspesie verhaal is, en waarop daar gene vir blaar- en streeproesweerstand voorkom. Hierdie disomiese addisielyn (8078) het weerstand getoon teen nege heersende Suid-Afrikaanse blaarroes en vier streeproes patotipes, sowel as ses Wes-Kanadese blaarroes patotipes en patotipe-mengsels. Die weerstandsgene op die *Ae. kotschy* addisiechromosoom (wat geblyk het om homoeoloog te wees aan die koring groep 2 chromosome) is hierna na 'n groep 2 chromosoom van gewone koring oorgedra (Marais *et al.* 2005b) deur gebruik te maak dubbel-monosomie. Weerstandbiedende plante wat 'n *Ae. kotschy* translokasie besit het is herwin en staan bekend as die S14-translokasie. S14 translokasieplante het 'n verbeterde agrotipe (korter, vrugbaarder plante met 'n korter

groeiperiode) vergeleke met die disomiese addisielyn (8078) getoon. Mono- en telosomiese analise en C-band kleuring het gewys dat die translokasie die grootste gedeelte van (of moontlik volledige) lang arm van chromosoom 2D van koring insluit. Die 2D-translokasie het verder ook sterk voorkeuroorerwing deur manlike gamete getoon. Die ontwikkeling van molekulêre merkers vir die karakterisering van hierdie geïntegreerde streek sal noodsaaklik wees in pogings om die segment te verkort en van die onnodige vreemde spesie-chromatien te verminder (Marais *et al.* 2005b).

1.3.1.5 Die *Aegilops peregrina* translokasie bekend as S15 (*LrS15*)

Die F₁-hibriede van *Ae. peregrina* aanwins 680 met Chinese Spring, ontwikkel deur Marais *et al.* (2003), het weerstand getoon teen die Suid-Afrikaanse *Puccinia graminis f. sp. tritici* patotipes UVPrt 2, 3, 8, 9 en 13. Weerstandbiedende nageslag uit die kruising is verder teruggekruis na W84-17 (Marais *et al.* 2008a). Tydens terugkruising is 'n chromosoomsegment wat 'n blaarroesweerstandsgen (*Lr59*) bevat, spontaan oorgedra na die lang arm van chromosoom 1A van koring. Meiotiese, monosomiese en mikrosatelliet analises het aangedui dat die translokasie die grootste gedeelte van, of die hele lang arm van, chromosoom 1A insluit. Die translokasie is waarskynlik deur sentriese breking en fusie veroorsaak (Marais *et al.* 2008a).

1.3.1.6 Die *Aegilops biuncialis* translokasie bekend as Smac (*Lrmac*)

'n Blaarroes weerstandsgen met tydelike simbool, *Lrmac*, is vanaf *Ae. biuncialis* aanwins 683 na gewone koring oorgedra deur Marais *et al.* (2003). 'n Disomiese addisielyn is eers ontwikkel en dit het geblyk dat die ekstra spesie-chromosoom homoeoloog is aan die groep 3 chromosome van koring. Die disomiese addisie plante is gekenmerk deur swak planttipe en sterk hibried-nekrose. 'n Translokasielyn (03M107) is uiteindelik verkry wat by wyse van monosomiese ontleding aan chromosoom 7B toegewys kon word (Marais 2008; persoonlike mededeling). Pogings word tans aangewend om die chromosoom armligging van die translokasie te bepaal en geskikte merkers te identifiseer vir verdere karakterisering en kartering.

1.3.1.7 Die *Aegilops neglecta* translokasie bekend as S20 (*Lr62/Yr42*)

Marais *et al.* (2003) het die oordrag van gekoppelde blaarroesweerstand- (*Lr62*-) en streeproesweerstand- (*Yr42*-) gene vanaf *Aegilops neglecta* aanwys 155 beskryf. 'n Monosomiese addisielyn (8048) is eers ontwikkel deur herhalende terugkruising na CS en CS-S. Nageslag van 8048 het 'n wye reeks infeksietipes geproduseer na inokulasie met nege Suid-Afrikaanse *P. triticina* patotipes. Uit die data het geblyk dat die uitdrukking van *Lr62* gemodifiseer word in die aanwesigheid van twee dominante, epistatiese gene wat in die koringgenome voorkom (CS en W84-17 wat tydens kruising gebruik is). Die modifiseerdergene was waarskynlik *Lr27* en *Sr31*. Nie een van die twee gene verskaf weerstand op hul eie nie, maar mag wisselwerk as hulle saam in 'n genotipe voorkom om 'n intermediêre vlak van weerstand daar te stel. Wanneer beide modifiseerders saam met *Lr62* voorkom onderdruk hulle die geen sodat dit 'n Z-infeksietipe eerder as die kenmerkende vlek-infeksietipe produseer. Weerstandsgene *Lr62* en *Yr42* is na gewone koring oorgedra en by wyse van monosomiese en telosomiese ontleding aan chromosoom 6A toegewys (Marais *et al.* 2008b). Mikrosatelliet karakterisering van 'n homosigotiese, weerstandbiedende translokasielyn, 03M119-71A, het getoon dat 'n betreklike groot translokasie geskied het. Die translokasie beslaan die volle 6AS chromosoomarm asook 'n groot, proksimale gedeelte van 6AL.

1.4 MOLEKULÊRE MERKERS

Vroeë plantetelers het op morfologiese en fenotipiese kenmerke staatgemaak om agronomiesvoortreflike plante te selekteer. Hierdie was dus die eerste merkers wat aangewend is vir die verbetering van gewasse. Die nadeel aan hierdie merkers is egter dat dit beïnvloed kan word deur omgewingsfaktore; beperk is in aantal; en dat sommige kenmerke eers laat in die ontwikkelingsfase van die plant uitgedruk word wat vroeë sifting van die verlangde kenmerke verhoed. Pleiotropiese effekte waar die uitdrukking van 'n enkele geen meer as een fenotipiese kenmerk beïnvloed kan ook die benutbaarheid van fenotipiese merkers beperk (Ranade *et al.* 2001; Anderson & Lübberstedt 2003). Die fenotipiese kenmerk (simptome) van bv. roesweerstandsgene kan slegs in die teenwoordigheid van die patogeen waargeneem word. Die gebruik van molekulêre merkers het hierdie struikelblokke oorkom en stel fenotopies-neutrale merkers daar.

Die sleuteltoepassing van molekulêre merkers in genetica en planteteling is om tussen genotipes te onderskei. Vir die suksesvolle toepassing van molekulêre merkers vir hierdie doel moet dit oor die volgende kenmerke beskik (Weising *et al.* 2005):

- a) Hoogs polimorfies wees.
- b) Ko-dominant oorgeërf word (wat onderskeid tussen homo- en heterosigotiese individue in diploïede organismes toelaat).
- c) Allele moet ondubbelsinnig geïdentifiseer kan word.
- d) Merkers moet volop voorkom in die genoom.
- e) Merkers moet eweredig versprei wees deur die hele genoom.
- f) Merkers moet selektief neutraal wees (dws geen pleiotropiese effekte) en op enige stadium van ontwikkeling opgespoor kan word.
- g) Merkeranalises moet maklik toeganklik wees (dws deur dit te koop of vinnige prosedures).
- h) Merkeranalises moet maklik en vinnig wees om te gebruik (bv. ge-outomatiseerde prosedures).
- i) Merkers moet hoogs herhaalbaar wees.
- j) Merkerdata moet maklik en betroubaar tussen laboratoriums uitgeruil kan word.
- k) Beide die ontwikkeling en gebruik van die merker moet koste-effektief wees.
- l) Die tegniek moet nie-vernietigend wees sodat verlangde individue behou kan word.

Uit die wye verskeidenheid merker-sisteme wat vandag beskikbaar is, is daar tot dusver geen enkele molekulêre merker gevind wat aan al die bogenoemde vereistes voldoen nie, maar hoogstens aan sommige hiervan. Die keuse van 'n merkersisteem sal dus afhang van die beste beskikbare kombinasie vereistes wat van toepassing is op die betrokke studie wat onderneem word. Die groot hoeveelheid DNS in elke koring-genoom (ongeveer 1.7×10^{10} bp per haploïede kern); die duplisering (en selfs triplisering) van sommige gene op homo- en homoeoloë chromosome in heksaploïede koring en die feit dat meer as 85 % van die totale genoom uit hoogs herhalende (en nie-koderende) volgordes bestaan, kompliseer die keuse en uitvoering van merkertegniese in vergelyking met ander gewasse (Bonjean & Lacaze 2001; Hart 2001). Die belangrikste faktore wat in ag geneem word vir bruikbaarheid van molekulêre merkers vir die oordrag van weerstandsgene in koring is: a) of die merker polimorfies is tussen die geen-skenker en die wye reeks van verboude genotipes; b) hoe maklik die merker geïdentifiseer en ontleed kan word; en c) hoe naby die merker aan die geen gekoppel is (Ranade *et al.* 2001; Chen *et al.* 2003).

1.4.1 Proteïen-merkers

Die eerste ware molekulêre merkers het berus op biochemiese analise van proteïen-variante gekodeer deur 'n spesifieke lokus. Allo-ensiem merkers is gebaseer op die veelvuldige vorms van 'n ensiem wat verskil in elektroforetiese mobiliteit weens verskille in grootte of lading (Schlötterer 2004). Hierdie verskille word teweeggebring deur aminosuursubstitusies wat onderliggende variasie in die DNS-volgorde weerspieël. Na elektroforese op 'n nie-denaturerende of styseljel word die allo-ensiem bande gevisualiseer deur die byvoeging van 'n kleurlose substraat wat deur die spesifieke ensieme omgeskakel word in 'n kleurstof. Die aantal bande wat waargeneem word is afhanklik van die aantal lokusse, homo- of heterosigositeit en die aantal skeibare subeenhede van die ensieme. Die grootste voordele van hierdie merkers is hul ko-dominante oorerwing tesame met die tegniese eenvoud en lae koste van die ontleding. In poliploïede spesies soos koring kan die intepretasie van die allo-ensiem patroon wat verkry word egter moeilik wees weens die ko-dominante aard van die merker. Die getal allo-ensiem merkers wat gebruik kan word, word ook beperk deur die klein aantal ensiem-spesifieke substrate wat as kleurmiddel beskikbaar is. Verder het sommige nukleotiedveranderinge in die DNS-volgorde nie noodwendig veranderinge in die proteïen se grootte en lading tot gevolg nie, wat die vlak van opspoorbare variasie verder verlaag (Lui & Cordes 2004; Schlötterer 2004; Weising *et al.* 2005).

1.4.2 DNS-merkers

Die ontdekking en isolasie van restriksie endonukleases in die 1960's het die weg gebaan vir 'n nuwe klas molekulêre merker naamlik RFLP (Restriksie-Fragment-Lengte-Polimorfisme = "Restriction Fragment Length Polymorphism") wat DNS-variasie direk evalueer. RFLPs word verkry na restriksie-ensiem vertering van genomiese DNS (Schlötterer 2004). Die ensieme sny die genomiese DNS-molekules by spesifieke volgordes en lewer so DNS-fragmente van verskillende groottes wat deur agarose jel-ektroforese geskei kan word. Die ensiem se herkenningsetel bestaan tipies uit vier tot ses palindromiese basispaarvolgordes. Enkelnukleotied mutasies binne die ensiem se snypunt, of invoegings en delesies tussen die snypunkte lewer polimorfismes tussen verskillende genotipes (Weising *et al.* 2005). Die geskeide fragmente word vervolgens oorgedra na 'n membraan deur die Southern-blot tegniek. RFLP's is dan afhanklik van die beskikbaarheid van bekende DNS-volgordes wat as radio-aktiewe peilers gebruik kan word om aan homoloë DNS-fragmente op die membraan te hibridiseer. Hierdie peilers is gewoonlik kDNS (koderende DNS) wat geselekteer is uit 'n kDNS-biblioteek van die spesie wat ondersoek word. RFLP-merkers is

ko-dominant, wat dit moontlik maak om beide allele in 'n individu waar te neem. Dit is ook 'n hoogs herhaalbare merkertegniek en die grootte verskil tussen allele is meestal groot, wat sifting van individue maklik maak. Die nadele is dat die merker 'n relatiewe lae vlak van polimorfisme toon; baie en suiwer DNS benodig word; volgorde inligting van grensvolgordes van die RFLP lokus bekend moet wees (in die geval van PKR-analise) of geskikte peilers beskikbaar moet wees (vir Southern-blot analise). Hierdie eienskappe maak dit dus 'n moeilike, tydrowende en duur tegniek om merkers te ontwikkel in spesies met beperkte molekulêre inligting (Lui & Cordes 2004).

1.4.3 PKR- gebaseerde DNS-merkers

Die grootste deurbraak in DNS-gebaseerde merkers was die ontwikkeling van die polimerase kettingreaksie (PKR) in 1985. Hierdie tegniek het die *in vitro* amplifikasie van DNS moontlik gemaak (Mullis & Faloona 1987; Saiki 1989). Die PKR-tegniek behels die hegting van enkelstring oligonukleotied-inleiers, komplementêr tot die 5' ente, op beide DNS-strings van 'n teikenvolgorde nadat die dubbelstring DNS by 94°C gedenatureer is om enkelstringe te verkry. Na inleier verlenging met 'n geskikte termostabiele DNS-polimerase (bv. *Taq* polimerase geïsoleer vanaf *Thermus aquaticus*, Zyskind & Bernstein 1992) en dNTPs, word die stringe gedenatureer en die proses herhaal vir 'n aantal siklusse. Herhaalde siklusse van denaturering, inleier-aanhegting en verlenging lei tot die eksponensiële amplifisering van die DNS-volgorde tussen en insluitend die inleier-bindingsetels (Gelfand 1989; Weising *et al.* 2005). PKR DNS-merkers is gebaseer op polimorfismes in aanhegtingsetels of DNS-lengteverskille van die geamplifiseerde produkte (Gupta & Varshney 2004).

PKR is 'n vinnige, sensitiewe, veilige (nie radio-aktiewe) en tegnies eenvoudige metode wat gebruik kan word vir die sifting van groot populasies. PKR vereis ook nie die isolasie van groot hoeveelhede suiwer DNS of voorafgaande kloneringstappe nie (Erlich 1989; Schlötterer 2004). Die geamplifiseerde produkte kan geëlektroforeer word op agarose en poli-akriëlamied jels (afhangende van die merkertegniek gebruik) wat dan met ethidiumbromied of silwer gekleur kan word vir visualisering van die DNS-bandjies. Indien fluoresserende inleiers gebruik word, kan produkte en polimorfismes ook met 'n DNS-volgordebepaler geanaliseer word. Tydsame en duur hibridisasie tegnieke (bv. outoradiografie en ensiemsubstrate) word ook nie algemeen vereis vir die visualisering van PKR-gebaseerde resultate nie alhoewel dit ook moontlik is. Alhoewel daar 'n beperking is op die grootte van die fragmente wat geamplifiseer kan word (amplifikasie is mees

effektief as bindingsetels nie verder as 4 kb uit mekaar is nie), kan met optimisering van spesifieke reaksies en die gebruik van alternatiewe ensieme en PCR-kondisies produkte van meer as 10 kb verkry word. 'n Nadeel is in die geval van teiken-spesifieke PCR dat daar wel vooraf-kennis van die genoomvolgorde moet wees.

Die selektiwiteit van PCR-gebaseerde merker-tegnieke hang af van die keuse van inleiers wat gebruik word en kan verdeel word in volgorde-spesifieke merkers of lukrake merkers. Teiken-gerigte merkers word ontwerp vanaf bekende DNS-volgordes soos byvoorbeeld die van VNTRs (= Variërende getal tandem-herhalings = "Variable Number Tandem Repeats") (byvoorbeeld mikrosatelliete) of gekloonde geenprodukte, terwyl lukrake merkers bestaan uit arbitrêre (toevallige) volgordes wat gebruik kan word om anonieme genomiese DNS-streke te amplifiseer (Weising *et al.* 2005).

1.4.3.1 Teiken-gerigte PCR-merkers

Teiken-gerigte merkersisteme is gewoonlik bestendig en gee herhaalbare resultate omdat spesifieke inleiers gebruik word onder geoptimeerde, streng PCR-kondisies. Baie tyd en geld word egter spandeer aan die ontwikkeling van teiken-gerigte merkersisteme omdat volgorde informasie noodsaaklik is. Verskeie klonerings-, hibridisasie met bekende peiler motiewe en geautomatiseerde volgordebepalingstappe moet uitgevoer word voordat 'n unieke volgorde, wat as merker kan dien, gevind word.

1.4.3.1.1 Mikrosatelliete

Mikrosatelliete kom eweredig verspreid voor in alle eukariotiese genome en bestaan uit 'n liggaam van kort, eenvoudige di-, tri- of tetra-nukleotied, tandem-herhalende volgordes (waarvan AT-herhalings meer algemeen in plante voorkom) wat aan weerskante begrens word deur unieke, gekonserveerde DNS-volgordes. Die mikrosatelliet liggaam van eenvoudige, herhalende (ook bekend as SSR) volgordes is tipies minder as 100 bp lank (Reiter 2001; Liu & Cordes 2004). Komplementêre inleiers tot die unieke grensvolgordes (bepaal deur klonering en volgordebepaling) word gebruik vir PCR-amplifikasie van die mikrosatelliet lokus. Die geamplifiseerde produkte word geëlektroforeer op 'n hoë konsentrasie agarose gel of denaturerende poli-akriëlamied gel en gevisualiseer deur silwerkleuring of ethidiumbromied. Mikrosatelliet polimorfismes kan waargeneem word as lengte-polimorfismes weens die varierende aantal tandem herhalings (veroorzaak deur replikasieglyding of ongelyke oorkruising tussen

grensvolgordes). Hierdie herhalings is hoogs polimorfies en produseer aansienlike alleliese variasie vir 'n spesifieke lokus (Reiter 2001; Liu & Cordes 2004; Weising *et al.* 2005). Ten spyte van die voordele verbonde aan mikrosatelliet merkers naamlik, dat die merkers talryk en wydverspreid in genome voorkom, hoogs polimorfies is, ko-dominant oorgeërf word en maklik met PCR geanaliseer kan word is hierdie merkers nog nie ekstensief in koring gebruik nie. Dit is grootliks te wyte aan beperkte volgorde inligting van die koringgenoom (weens die grootte van die koringgenoom) in vergelyking met byvoorbeeld die mensgenoom waar mikrosatelliet merkers breedvoerig gebruik word. SSR-merkers word ontwerp om allele van 'n enkele lokus te amplifiseer. Somtyds word allele by 'n tweede gedupliseerde lokus egter ook geamplifiseer. Weens die hoë mutasietempo (varieer volgens die SSR-lokus wat ondersoek word) is dit moontlik dat twee allele by 'n gegewe lokus slegs identies is in grootte en nie noodwendig (in enkele gevalle) identies is in oorsprong nie (Liu & Cordes 2004).

Die frekwensie van amplifikasie is natuurlik afhanklik van die graad van genoemduplicasie en volgorde ooreenkoste vir die spesie wat ondersoek word. Die gebruik van mikrosatelliete in 'n poliploïede genoom soos koring mag dus bemoeilik word deur ooreenkomste en homologie tussen die genome as gevolg waarvan duplisering van amplifikasie mag geskied (Weising *et al.* 2005). Die gebruik van mikrosatelliete as molekulêre merker vir die introgressie van weerstandsgene vanaf wilde naverwante is dus ook beperk aangesien daar nog 'n groot mate van geensintenie bestaan tussen koring en sy wilde naverwante en die amplifikasie van 'n betrokke mikrosatelliet tussen homeolokusse onvoorspelbaar mag wees (Reiter 2001).

Tegniese probleme soos die voorkoms van stotterbande tydens PCR bemoeilik die geoutomatiseerde sifting van mikrosatelliet allele. Verder kan die digtheid van informatiewe mikrosatelliet-lokuse te laag wees vir karteringstoepassings ten spyte van die groot aantal en verspreiding van mikrosatelliete deur die genoom (Shlötterer 2004).

1.4.3.2 Lukrake PCR-merkers

'n Aanvanklike beperking op die gebruik van PCR as 'n metode vir grootskaalse genetiese kartering was die gebrek aan beskikbaarheid van groot hoeveelhede volgorde-inligting vir die ontwerp van spesifieke inleierpare om 'n verlangde DNS-fragment te amplifiseer (Reiter 2001). Die koste en tyd verbonde aan die verkryging van hierdie volgorde-inligting kan eweneens 'n probleem wees. PCR-merkers afgelei vanaf bestaande merkers en die gepaardgaande skeiding van die fragmente lewer boonop 'n lae vlak van polimorfisme. Hierdie probleme was veral prominent

in verskeie plantgenome insluitend, koring. Dit is dus geen verassing nie dat die ontwikkeling en gebruik van arbitrêre volgorde PCR-metodes (sonder enige volgorde inligting) vir die amplifisering van lukrake genomiese segmente wat wel DNS-polimorfismes sal ontbloot sterk posgevat het in studies van plantspesies nie.

Alle PCR-tegnieke wat van lukrake inleiervolgordes gebruik maak beskik oor die volgende kenmerke:

- a) geen vooraf inligting oor genomiese-DNS of templaats-DNS volgordes word benodig nie,
- b) kenmerkende multilokus bandpatrone word geproduseer,
- c) inleiers (hoofsaaklik enkel inleiers) kan universeel gebruik word in die meeste pro- en eukariotiese organismes.

Die lukrake PCR-inleiers wat gebruik word kan in drie algemene groepe verdeel word en sluit in: **RAPD** (Lukraak Geamplifiseerde Polimorfiese DNS = “Random Amplified Polymorphic DNA”; Williams *et al.* 1990); **AP-PCR** (Arbitrêre Inleier PCR = “Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction”; Welsh & McClelland 1990) en **DAF** (DNS-amplifisering genotipering = “DNA Amplification Fingerprinting”; Caetano-Annollés *et al.* 1991).

RAPD-merkers sal bespreek word as voorbeeld van ’n lukrake merker omdat dit in hierdie studie gebruik is.

1.4.3.2.1 RAPD (Lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNS)

Die RAPD-tegniek is in 1990 ontwikkel (Welsh & McClelland 1990; Williams *et al.* 1990) en behels die PCR-amplifikasie van lukrake, anonieme genomiese DNS segmente. Vir die doel word gebruik gemaak van ’n enkele inleier van willekeurige nukleotiedvolgorde en lae aanhegtingstemperatuur (30-40°C). Die inleiers is relatief kort, tipies ongeveer 10-12 bp in lengte en laat sodoende toe dat dit op verskeie streke in die genoom sal hibridiseer. Inleierbindingsetels moet naby mekaar (binne 2000 bp) en in teenoorgestelde oriëntasie op die komplementêre DNS-stringe voorkom om amplifikasie met die enkel-inleiers toe te laat (Weising *et al.* 2005). Die rangskikking van bindingsetels in inverse oriëntasie word verwag om tussen 1-10 keer in ’n angiosperm genoom voor te kom afhangende van die grootte van die genoom (Weder 2002).

RAPD-polimorfismes kan ontstaan deur:

- 1) 'n Enkel-nukleotied-substitusie in een of beide inleierbindingsetels wat 'n verandering in fragmentgrootte, of aanwesige teenoor afwesige fragmente tot gevolg kan hê.
- 2) 'n Delesie van 'n inleierbindingsetel wat kan lei tot amplifikasie van 'n groter fragment of totale verlies van die fragment.
- 3) Invoegings van 'n groot stuk DNS tussen inleierbindingsetels wat amplifikasie verhoed en lei tot 'n verlies van die fragment.
- 4) Invoegings of delesies wat die lengte van die DNS-segment verander maar nie amplifikasie verhoed nie.

Genetiese variasie binne en tussen die individue wat bestudeer word, is meesal die gevolg van aan- of afwesigheid van 'n produk by 'n spesifieke lokus (Lui & Cordes 2004). Addisionele volgorde polimorfismes mag opgespoor word in RAPD-bande deur restriksie-ensiem vertering van die RAPD-produkte. Die amplifisering van fragmente met herhalende motiewe is ook 'n algemene verskynsel by RAPDs (Vosman 1998, Khan *et al.* 2002).

Die grootste voordeel met die gebruik van RAPD-merkers is dat 'n universele inleierstel gebruik kan word vir genomiese analise in 'n wye verskeidenheid spesies. Die RAPD-tegniek het ook verskeie ander voordele in planteteelt toepassings naamlik, dat dit eerstens nie die Southern-blot tegniek of die gebruik van radio-aktief gemerkte peilers vereis nie. Dit maak die tegniek geriefliker en minder omslagtig. Tweedens is RAPD-merkers hoogs polimorf. Die gebruik van ouerplante met diverse genetiese agtergronde is daarom minder belangrik in seleksietoepassings as in die geval van RFLPs of mikrosatelliete. Genoegsame polimorfismes mag selfs tussen lyne binne dieselfde teelprogram bestaan en stel telers in staat om binne kruisings te selekteer (Khan *et al.* 2002).

Die grootste nadeel van RAPDs is die lae vlak van herhaalbaarheid van nuttige polimorfismes en die sensitiwiteit van die tegniek ten opsigte van PKR-kondisies. RAPD-merkers is dominant wat beteken dat homo- en heterosigotiese individue nie van mekaar onderskei kan word nie. Volgens Devos & Gale (1992) is die gebruik van RAPDs vir die opstelling van koppelingskaarte in koring beperk weens die voorkoms van homoeoloë chromosome wat nabyverwant is en die feit dat 80 % van die koringgenoom na raming uit nie-koderende, herhalende volgordes bestaan. RAPD-merkers sal egter met groot nut aangewend kan word vir die manipulasie van spesifieke

enkelchromosome of chromosoomsegmente soos byvoorbeeld met die introgressie van weerstandsgene vanaf naverwante wilde spesies (Devos & Gale 1992).

1.4.3.2.2 SCARs (Volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde streke = “Sequence Characterized Amplified Regions”)

SCARs is in 1993 deur Paran en Michelmore ontwikkel en word gebaseer op unieke individuele RAPD-volgordes. SCAR-ontwikkeling het ten doel om die nadele geassosieerd met RAPDs, naamlik lae herhaalbaarheid, te oorkom.

Unieke, individuele RAPD-fragmente word gekloneer en die nukleotiedvolgordes word bepaal. Nuwe inleiers word dan ontwerp wat die oorspronklike RAPD-inleier sowel as ’n addisionele 10-14 bp binne die fragment insluit. Die gevolg is ’n langer (20-24mer) inleier wat spesifieke amplifikasie van ’n enkele bandjie toelaat om meer herhaalbare en betroubare resultate te lewer. Hoër aanhegtingstemperature word ook gebruik wat die spesifisiteit van die merker verhoog. In teenstelling met RAPDs is die SCAR-merker minder sensitief vir verandering in reaksiekondisies of PKR-masjiene (Sperisen & Büchler 1998; Cutler *et al.* 2005; Weising *et al.* 2005). Die teenwoordigheid van slegs ’n enkele bandjie om te analiseer, maak die seleksie van individue in groot populasies dus makliker, en die tipe merker kan ook makliker geïnkorporeer word in multipleks reaksies.

1.4.3.2.2.1 CAPS (Gekliefde, Geamplifiseerde Polimorfiese Volgordes = “Cleaved Amplified Polymorphic Sequences”)

Die tegniek behels die ensiemvertering van spesifiek geamplifiseerde DNS-fragmente soos SCARs, of RAPD-fragmente self om ’n ko-dominante merker te lewer. Dit is egter nie altyd moontlik om ’n polimorfiese ensiem snyplek te kry in veral kleiner geamplifiseerde produkte nie. Indien so ’n setel wel gevind word bied dit ’n effektiewe alternatief tot RFLP-analise (Vosman 1998). Die enigste ‘nadeel’ aan die tegniek is dat verdere onkoste aangegaan moet word, deur die gebruik van ensieme sowel as die langer tydskuur om die produkte met die ensiem te behandel.

1.4.3.2.3 AFLP (Geamplifiseerde fragment-lengte polimorfisme = “Amplified Fragment Length Polymorphism”)

Die AFLP-tegniek is in 1995 deur Vos *et al.* geïmplementeer en berus op die selektiewe amplifisering van restriksie-ensiem-verteerde DNS-fragmente wat as te ware die RFLP- en lukrake PCR-analise metodes kombineer. Die totale genomiese DNS word eerstens verteer met twee ensieme (waarvan *EcoRI* en *MseI* die mees algemeen gebruik word) om oorhange of taai ente te produseer. Sintetiese dubbelstring hegstukke met bekende volgordes word hierna aan beide die taai ente van die ensiemverteerde genomiese DNS-fragmente geligier. Sodoende word bindingsetels geskep vir universele inleiers waarmee die fragmente verder geamplifiseer kan word. ’n Daaropvolgende selektiewe PCR-reaksie word uitgevoer met gebruik van inleierpare met spesifieke volgordes waarvan die 5'-ente komplementêr tot die hegstukke en restriksie-setel is, terwyl die 3'-ent van die inleier verleng word met 2 of meer selektiewe basispare om intern te heg aan die restriksie-fragment. Die addisionele interne basispare laat slegs die amplifikasie van ’n substel van die oorspronklik verteerde fragmente toe wat die resultate eenvoudiger maak om te analiseer (Lui & Cordes 2004; Weising *et al.* 2005).

Polimorfismes tussen genotipes mag ontstaan deur:

- 1) volgorde variasie in een of beide restriksie-setels wat ’n spesifieke fragment begrens,
- 2) invoegings of delesies binne ’n geamplifiseerde fragment,
- 3) verskille in die nukleotiedvolgordes onmiddelik aangrensend tot die restriksie-setels.

AFLPs produseer dus talryke amplifikasieprodukte vir die opspoor van polimorfismes in vergelyking met die voorafbespreekte merkers. AFLP-merkers is hoofsaaklik dominant, alhoewel ko-dominante oorerwing ook waargeneem word. Die grootste sterkpunt van AFLP-merkers is dat hulle soos RAPD arbitrêre inleiers gebruik word en daar dus geen voorafkennis van die DNS-volgorde is nie. ’n Beperkte aantal AFLP-inleiers kan gebruik word om ’n groot aantal inleierkombinasies te lewer wat elkeen ’n unieke stel geamplifiseerde produkte daarstel. Variërende lengtes van 3'-inleierverlenging en/of keuse van restriksie-ensieme wat gebruik word kan verander/aangepas word. Dit is dus moontlik om AFLP-inleiers in ’n multipleksreaksie te optimaliseer waarin talle potensieel nuttige fragmente dan in ’n enkele eksperiment opgespoor kan word. Die multipleks maak die tegniek ook goedkoper op ’n per merker basis. Die hoë strengheid

van die PKR-kondisies verseker dat die tegniek hoogs herhaalbare resultate lewer. Potensieel nuttige bande kan soos RAPD-merkers geïsoleer, gekloneer en in SCAR-merkers omgeskakel word deur die ontwerp van spesifieke inleiervolgordes (Lui & Cordes 2004, Weising *et al.* 2005).

Die standaardprosedure soos beskryf deur Vos *et al.* (1995) behels die radio-aktiewe merking van een van die selektiewe inleiers, elektroforese van die fragmente op 'n hoë resolusie jel en visualisering van die fragmente deur outo-radiografie. Dit is egter moeilik om 'n potensieel nuttige band te isoleer vanuit hierdie jel omdat die posisie van die band nie direk vanaf die jel gevisualiseer kan word nie, maar afgelei moet word uit die outoradiogram en die radio-aktiewe materiaal spesiale suiweringsprosedures sal moet ondergaan. 'n Alternatiewe moontlikheid is om van silwerkleuring gebruik te maak. Die fragment kan maklik geïsoleer word, maar alle fragmente word sigbaar, nie net die van die gemerkte peiler nie en kan 'n patroon lewer wat te kompleks is om te analiseer. 'n Gradiënt in intensiteit van groter tot kleiner bandjies ontstaan ook met silwerkleuring sodat die kleiner bandjies dikwels moeilik waargeneem word. Fluoreserende merking van selektiewe inleiers laat geoutomatiseerde visualisering toe op 'n DNS-volgordebepaler. Indien 'n nuttige band geïsoleer moet word, moet dit egter steeds met die radio-aktiewe of silwerkleur tegniek gevisualiseer word.

Hoewel AFLP-merkers baie informatief is, is een van die grootste nadele van hierdie tegniek die nodigheid vir duur toerusting soos 'n geoutomatiseerde volgordeanaliseerder vir elektroforetiese analise indien fluoreserende merkers gebruik word. Ten einde 'n nuttige band te isoleer en te kloneer moet die fragmente egter op 'n tradisionele jel geskei word, en by wyse van radio-aktief gemerkte merkers of van silwerkleuring gevisualiseer word. Groot hoeveelhede suiwer DNS word ook benodig. Min AFLP-merkers word suksesvol omgeskakel na polimorfiese SCAR/STS merkers (Prins *et al.* 2001). Minder as die helfte van AFLP-fragmente wat omgeskakel word na PKR-gebaseerde merkers toon dieselfde polimorfisme as wat opgespoor is in die oorspronklike AFLP-merker. Die moontlike rede hiervoor mag wees dat die AFLP-polimorfisme veroorsaak word deur restriksie-ensiem vertering en dat die omgeskakelde PKR-merkers afkomstig is van DNS-volgordes intern tot die AFLP restriksie setels (Shan *et al.* 1999). Die AFLP-merkertegniek het egter wye toepassing gevind as merkers in grasspesies vir die karakterisering van kiemplasma versamelings, die konstruksie van genetiese koppelingskaarte en die merker versadiging van spesifieke genomiese streke (Weising *et al.* 2005).

1.4.3.3 RGAPs (Weerstandsgene Analoo Polimorfismes = “Resistance Gene Analogue Polymorphisms”)

Weerstandsgene teen verskillende patogene insluitend swamme, bakterieë, nematode, virusse en insekte, is uit verskeie plantspesies geïsoleer. Alhoewel hierdie gene se algehele nukleotiedbasispaar-volgordes nie totaal ooreenstem nie, deel hulle egter sekere gekonserveerde domeine wat skynbaar betrokke is by die weerstandsreaksie (Gebhardt 1997). Die weerstandsgene kodeer vir proteïene met sekere algemene strukture naamlik: nukleotiedbindingsetels (NBS), leusien-ryke herhalings (LRH), transmembraan domeine (TM) en serien/threonien proteïen kinase (PK). Weerstandsgene wat tot dusvêr beskryf is, word in vyf klasse gekategoriseer na aanleiding van die kombinasie en rangskikking van die proteïene waarvoor hulle kodeer (Ellis & Jones 1998; Martin 1999; Richter & Ronald 2000).

Die eerste klas is die NBS-LRH weerstandsgene waarvan die produkte gekenmerk word deur 'n NBS opgevolg deur 'n LRH-domein. Hierdie algemene motief van intrasellulêre reseptore verskyn die gereeldste in alle weerstandsgene wat tot dusver gekloon is. Proteïene met LRHs is tipies betrokke by proteïen-proteïen interaksies en/of bepaal ligandbinding by reseptormolekules (Ellis *et al.* 2000). Die NBS-LRH gene kan verder verdeel word in twee subklasse: Een subklas bevat 'n leusien-rits by die amino-terminale (N-terminale) domein. Gene wat vir hierdie proteïentipe kodeer sluit *Rps2* en *Rpm1* van *Arabidopsis* in (bied weerstand teen *Pseudomonas syringae* wat die avirulensie geen *avrRpt2* bevat), en die tamatie weerstandsgene, *Prf*. Die tweede subklas bevat 'n N-terminale domein met aminosuurvolgordes soortgelyk aan die van die sitoplasmiese sin-domeine van die Toll en interleukin-1 reseptore (TIR) van die *Drosophila Toll*-geen. Gene wat by hierdie subklas ingesluit word, is die *M* en *L6* roesweerstandsgene van vlas, die tabak mosaïek-virus weerstandsgene *N*, en die *Rpp5* meeldou weerstandsgene van *Arabidopsis* (Gebhardt 1997; Ellis & Jones 1998; Richter & Ronald 2000).

Die *Pto*-geen wat weerstand verleen teen *Pseudomonas syringae* in tamaties is die enigste geen wat tot dusver geïdentifiseer is in die intrasellulêre serien/threonien proteïen kinase (PK) klas van weerstandsgene. Alhoewel hierdie geen nie die LRH-domein vir ligandbinding bevat nie, is gevind dat dit 'n direkte interaksie het met die produk van die patoogen se avirulensie geen, *avrPto* (Young 2000).

Soos met die NBS-LRH klas, kan twee subklasse vir die ekstrasellulêre LRHs onderskei word. Die eerste subklas is kenmerkend van reseptor-kinases en bestaan uit 'n ekstrasellulêre LRH-domein, 'n TM-domein en intrasellulêre PK-domein. Hoewel die enigste weerstandsgene wat tot dusver in hierdie subklas geïdentifiseer is, die *Xa21* geen is (bied weerstand teen *Xanthomonas oryzae* wat bakteriese skroei in rys veroorsaak) is verskeie ander gene met diverse funksies in plante geïdentifiseer wat strukturele ooreenkomste toon. Die tweede subklas ekstrasellulêre LRH-gene bestaan uit 'n ekstrasellulêre LRH-domein, transmembraan-domein en 'n kort intrasellulêre stert by die C-terminale domein. Die *Cf*-klas gene van tamaties (*Cf2*, *Cf5* en *Cf9*) wat weerstand bied teen die *Clasdosporium fulvum* swam, word ook hierby ingesluit (Ellis *et al.* 2000; Richter & Ronald 2000).

Die ontdekking van hierdie domeine bied 'n geleentheid vir die opsporing van soortgelyke volgordes in ander plantspesies en die gevolglike identifisering van moontlike nuwe weerstandsgene (Maleki *et al.* 2003; Yan *et al.* 2003). Die kennis van RGAs is deur Chen *et al.* (1998) gebruik vir die amplifikasie en hoë resolusie poli-akrielamied-jel elektroforese van RGA-geassosieerde fragmente. Polimorfiese fragmente wat so gegeneer is kon dan geïsoleer en gekloneer word. Daar is na die tegniek verwys as RGAP (Yan *et al.* 2003). Die grootste voordeel van die RGAP-tegniek vergeleke met gewone, lukraak geamplifiseerde DNS-merkers, is dat hulle potensieel nuttige gene verteenwoordig. Alhoewel nie alle geamplifiseerde produkte funksionele weerstandsgene verteenwoordig nie, bevat hulle wel die gekonserveerde domein volgordes (Gebhardt 1997). 'n Beperkte aantal RGA-inleiers afkomstig van die reeds geïdentifiseerde weerstandsgenekomplekse kan gebruik word om 'n groot aantal inleier kombinasies te lewer wat elkeen 'n unieke stel geamplifiseerde produkte sal lewer. Daar word ook nie gebruik gemaak van radio-aktief gemerkte peilers en tydsame hibridisasie tegnieke nie. Indien 'n nuttige bandjie dus geïdentifiseer word kan dit sonder enige spesiale suiweringstegnieke vanuit die jel gesuiwer word, en gebruik word vir verdere PKR-amplifisering.

1.5 TOEPASSING VAN DNS-MERKERS IN KORINGTEELT

1.5.1 Merkerbemiddelde seleksie

In die koringbedryf word merkers hoofsaaklik gebruik vir die daarstelling van DNS-vingerafdrukke en die introgressie van een of meer gene in bestaande voortreflike kultivars (Koebner & Summers 2003; Brown & Caligari 2008).

Dit is veral nuttig vir:

- 1) die versnelde seleksie van eienskappe wat fenotipies moeilik onderskeibaar is weens lae penetrasie en of komplekse oorerflikheid,
- 2) die onderhoud van ressesiewe allele in terugkruispopulasies,
- 3) geenstapeling van siekteweerstandsgene.

1.5.1.1 DNS-genotipering

Genotipering van bestaande kultivars of koringlyne in 'n teelprogam mag aangewend word om genetiese diversiteit en suiwerheid te meet, die ouerlike oorsprong van ingeteelde lyne te bepaal of om te voorspel watter ouerkombinasies die beste kruisings sal lewer (Somers 2004; Landjeva *et al.* 2007). Seleksie vir kwantitatiewe kenmerke en kiemplasma-bestuur is verdere belangrike toepassingsmoontlikhede van genotipering. Genotipering word ook gebruik vir die beskerming van teelmateriaal en vrygestelde kultivars (Koebner & Summers 2003).

1.5.1.2 DNS-merkers vir siekteweerstandsgene en merkerbemiddelde geenstapeling.

'n Belangrike toepassing van merkerbemiddelde geenstapeling is die samevoeging van verskeie effektiewe roesweerstandsgene in 'n enkele genotipe in 'n poging om duursame weerstand teen die roespatogene te bewerkstellig. Sodanige pogings word gekompliseer deur die feit dat die sterkste weerstandsreaksie die effek van die ander weerstandsgene oorskadu en die teenwoordigheid van hierdie gene nie maklik opspoorbaar is in die nageslag nie (Anderson 2003). Deur gebruik te maak van genetiese merkers wat naby gekoppel of geassosieerd is met die weerstandsgeen, kan nageslagspopulasies akkuraat gesif word vir die teenwoordigheid van meer as een weerstandsgeen. Hierdie seleksiemetode kan in die afwesigheid van die patogeen en op enige ontwikkelingsfase van die plant aangewend word (Anderson & Lübberstedt 2003; Gale 2005). Dit maak ook versnelde terugkruising moontlik om sodoende die genetiese materiaal van die herhalende ouer vinniger te verhaal (Hospital 2003). Eliminasië van ongewenste plante op 'n vroeë stadium vermy ook onnodige uitgawes verbonde aan die verdere kweek van plante wat nie die verlangde weerstandsgene bevat nie. Merkerbemiddelde seleksie (MBS) vir weerstandsgene kan dus lei tot hoër effektiwiteit, verminderde koste en/of tydsbesparings tydens terugkruisings (Landjeva *et al.* 2007).

1.5.1.3 Kartering

Wanneer 'n aantal merkers vir 'n sekere genotipe geïdentifiseer is, kan dit gebruik word om 'n kaart van die genoom saam te stel. Sodoende kan die presiese posisies van gene op chromosome bepaal word (Brown & Caligari 2008).

1.5.2 Beperkings van merkerbemiddelde seleksie in koring

Die beskikbaarheid van merkersisteme wat geskik is vir grootskaalse MBS tesame met die vermoë om 'n groot aantal individue op 'n tyd- en koste-effektiewe manier te sif is die twee belangrikste struikelblokke met betrekking tot die grootskaalse implementering van MBS (Anderson 2003). Die koste verbonde aan die ontwikkeling van sommige merkersisteme of -metodologie en die tegniese kundigheid wat hiervoor benodig word, is eweneens 'n probleem (Landjeva *et al.* 2007). Met die vooruitgang in die ontwikkeling van molekulêre-tegnologie kom daar egter voortdurend nuwe en beter merkertegnieke na vore. Gepaard hiermee kom daar ook gaandeweg meer volgorde-inligting van die koringgenoom beskikbaar wat verder bydra om hierdie struikelblokke te oorkom (Somers 2004).

1.6 STUDIE DOELWITTE

Die oogmerke van hierdie studie was om merkers te ontwikkel vir sekere wilde-spesie-verhaalde weerstandsgeenkomplekse van koring. Sodanige merkers sal op twee wyses aangewend kon word: Eerstens, kan dit gebruik word om die oorsprong van 'n translokasie te verifieer, dit te karteer en uiteindelik met behulp van allosindetiese paringsinduksie te verkort. Tweedens, kan merkers wat op die verkorte translokasies karteer dan gebruik word vir merkerbemiddelde identifikasie van die tersaaklike weerstandsgene. Omdat wilde-spesie verhaalde chromatien normaalweg nie met koringchromatien rekombineer tydens meiose nie, word die totale translokasie as 'n enkele groot koppelingsblok oorgeërf. 'n Effektiewe merker hoef dus nie noodwendig naby die geen geleë te wees nie, solank dit net op dieselfde translokasie voorkom. Die soektog na merkers het die volgende behels:

1. Daar is eers gepoog om unieke PKR-fragmente (RAPD en RGAP) op te spoor wat geassosieer is met 'n aantal weerstandsgeen-draende translokasies wat uit wilde *Triticum*- en *Aegilops*- spesies verhaal is. RAPDs en RGA-analises is bo AFLP-analise gekies omdat die merkers koste-effektief is, eenvoudige protokolle besit en meer gereedlik na SCAR-merkers omskakel kan word. Die herwinning van polimorfiese fragmente uit AFLP-analise is kompleks en die sukses tempo vir die omskakeling van fragmente is laag (Prins *et al.* 2001). Agt gewone koringlyne met translokasies/introgressies van weerstandsgene uit verskillende grasspesies is deur die departement Genetika (US) ontwikkel. Vir elke geenkompleks is vatbare en bestande bulkopulasies saamgestel wat as basis gedien het vir die opsporing van PKR-polimorfismes.
2. Ten opsigte van sommige weerstandsgeenkomplekse is vervolgens gepoog om polimorfiese fragmente (a) te bevestig deur dit te herhaal op toetskruis-populasies waarin die onderskeie geenkomplekse segregeer, en (b) die herhaalbare merkerfragmente te kloner, hul DNA-volgordes te bepaal en meer betroubare SCAR-inleiers te ontwerp.
3. SCAR-inleiers is toe bevestig deur dit te toets op populasies waarin die tersaaklike translokasies segregeer.

HOOFSTUK 2. MATERIAAL EN METODEDES

2.1 OPSPORING EN MODIFIKASIE VAN RAPD- EN RGAP-MERKERS VIR KORING WEERSTANDSGEENKOMPLEKSE

2.1.1 Plantmateriaal vir RAPD-en RGAP-analise

Agt gewone koring lyne met diverse spesie-verhaalde weerstandsgene plus die vatbare kontroles; Chinese Spring (CS), W84-17 en Thatcher is gebruik in die inisiële sifting met RAPD- en RGA-inleiers. Die gene betrokke asook die kruising en stamboom van die tersaaklike introgressie of translokasie word uiteengesit in Tabel 2.1. Alle plantmateriaal is in glashuise op Welgevallen proefplaas, US, gekweek.

Tabel 2.1. Die paneel van plante gebruik vir die opsporing van unieke PKR-fragmente (RAPD en RGAP) wat geassosieerd is met weerstandsgaende translokasies uit die wilde *Triticum*- en *Aegilops* spesies. Die wilde spesie-aanwinst waaruit die weerstandsgene oorgedra is, is vetgedruk. Nomenklatuur van van Slageren (1994) word gebruik.

No.	Introgressie/ Translokasie	Weerstandsgene	Kruising en Stamboom
1.	S8 introgressie	<i>Lr53/Yr35</i>	F ₁ : 05M64 = CS*4/ <i>T. dicoccoides-479</i> //3*CS-S/3/CS/4/2* Thatcher
2.	S12 translokasie	<i>Lr56/Yr38</i>	F ₁ : 05M65 = CS*9/ <i>Ae. sharonensis-174</i> //3*W84-17/3/CS/4/W84-17/5/2*Thatcher
3.	S13 translokasie	<i>LrS13/SrS13/YrS13</i>	F ₁ : (S13= CS*7/ <i>Ae. speltoides-691</i>)/W84-17
4.	S14 translokasie	<i>Lr54/Yr37</i>	F ₁ : 03M130 = CSM2D//CS*4/ <i>Ae. kotschy-617</i> /3/2*Thatcher
5.	S15 translokasie	<i>LrS15</i>	F ₁ : 0516 = CS*2/ <i>Ae. peregrina-680</i> //10*W84-17
6.	Smac translokasie	<i>Lrmac</i>	03M107 = CSDM 3B-5B//CS*8/ <i>Ae. biuncialis-683</i> /3/W84-17
7.	S20 translokasie	<i>Lr62/Yr42</i>	S20 = 03M119-71(=CSDM3B-5B//CS*5/ <i>Ae. neglecta-155</i> /3/W84-17)
8.	<i>Lr19</i> translokasie ¹	<i>Lr19-149-299.478</i>	05M88 = CSL <i>r19-149-299.478</i> rekombinant/2*Thatcher

¹ Nie oorspronklik aan die US ontwikkel nie. Die verkorte *Lr19-149-299.478* translokasie is egter wel deur die US geproduseer.

2.1.2 Plantmateriaal vir bevestiging van RAPD- en RGAP-merkers

Vyftien tot twintig terugkruisings- F_1 plante van elke weerstandsgeendraende translokasie is met blaarroesras UvPrt8 getoets en geklassifiseer as vatbaar of bestand. DNA-ekstrakte is van elke plant gemaak om te bevestig dat die potensiële merker altyd saam met die weerstand segregeer het. Die kuisings gebruik is uiteengesit in Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Die terugkruisingsplante van elke weerstandsgeendraende translokasie wat gebruik is vir die bevestiging van moontlike geassosieerde merkers.

No.	Translokasie Introgressie	Kruising
1.	S8	TK ₂ F ₁ : 05M64/Thatcher
2.	S12	TK ₂ F ₁ : 05M65/Thatcher
3.	S14	TK ₂ F ₁ : 03M130/Thatcher
4.	S15	TK ₂ F ₁ : 0516/3* Thatcher
5.	Smac	F ₁ : 03M107/Thatcher
6.	S20	TK ₁ F ₁ : 03M119-71A/2*Thatcher

Daar is nie gepoog om merkers vir die *LrS13/SrS13/YrS13* kompleks en vir *Lr19-149-299.487* te bevestig nie. Die S13 geenkompleks is geassosieerd met gametosiedgene wat lei tot uitsluitlike manlike en vroulike oordrag van weerstand en alle nageslagspopulasies het slegs bestande plante. Die potensieel nuttige RAPD en RGAP-merkers vir die *S13* geenkompleks is getoets op 'n paneel van plante (03M127-3A, 03M127-4, 03M127-7 en 03M127-12) wat verskillende lengtes van die translokasie-segment bevat het. 'n STS-merker is reeds beskikbaar vir die *Lr19* rekombinant (Prins *et al.* 2001).

2.1.3 Plant genomiese DNS-ekstraksie

Plant gDNS vir die RAPD, RGAP en SCAR-analises is geëkstraer volgens die protokol van Doyle en Doyle (1990) met geringe aanpassings. Ongeveer 100 mg jong blaarskyfies van elke plant is afsonderlik in 'n eppendorfbuisie met 'n "Qiagen tissuelyser" fyngemaal (3 x 90 sec/30 Hz) in agthonderd μ l voorafverhitte (60°C) 2 % (m/v) CTAB buffer [1.4 M NaCl, 20 mM Na₂EDTA (pH 8), 100 mM Tris-HCl (pH 8)] en 1.6 μ l (0.2 % v/v) β -merkpto-etanol. Die reaksiemengsel is geïnkubeer (60 min, 60°C) en die DNS is geëkstraer met chloroform-

isoamielalkohol (C:I 24:1 v:v) ekstraksie deur 'n gelyke volume (vol) C:I by die reaksiemengsel te voeg. Die reaksiemengsel is deur inversie gemeng en by kamertemperatuur gesentrifugeer (12 000 rpm, 5 min). Die bostand is oorgedra na 'n skoon sentrifugebuis waarby 1 vol PCI (phenol:chloroform:isoamielalkohol 25:24:1) gevoeg is om proteïene te denatureer en te presipiteer waarna die mengsel gesentrifugeer is (12 000 rpm, 5 min). 'n Verdere C:I ekstraksie is gedoen waarna die DNS gepresipiteer is deur die byvoeging van 1 vol isopropanol by die bostand, gevolg deur inkubasie (-20°C, oornag). Die buisie is gesentrifugeer (12000 rpm, 10 min, 4°C), die bostand verwyder en die sentrifugaat met 1 ml yskoue 70 % etanol gewas (12 000 rpm, 10 min, 4°C). Die bostand is afgegooi, die sentrifugaat gelugdroog en gehersuspendeer in 45 µl TE (Tris-Na₂EDTA) oplossing bevattende 40 µg/ µl Rnase A en geïnkubeer (30 min, 37°C waterbad). 'n Tiende vol 3 M natriumasetaat (pH 5.0) tesame met 2.5 vol yskoue 100 % etanol is bygevoeg, die reaksiemengsel goed gemeng en gesentrifugeer (12 000 rpm, 10 min, 4°C). Die bostand is afgegooi en die sentrifugaat twee maal gewas met 1 ml yskoue 70 % etanol (12 000 rpm, 10 min, 4°C). Die sentrifugaat is gelugdroog en hersuspendeer in 50 µl ddH₂O. Die DNS is gekwantifiseer deur 'n “Nanodrop[®] ND-1000” spektrofotometer te gebruik.

2.1.4 Analise van lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNS (RAPD)

RAPD-analise is uitgevoer volgens die riglyne van Williams *et al.* (1990).

2.1.4.1 Inleiers

Die sintetiese oligonukleotied-inleiers met lukrake volgordes is beskikbaar vanaf “Operon Technologies[™]” (Alimede, Kalifornië, VSA) en word versprei as inleier-stelle met 20 inleiers per stel. Die RAPD-inleierstelle het ingesluit OPC, OPE, OPF, OPM, OPN, OPO, OPP, OPQ, OPR, OPT, OPU OPV en OPW. Die 260 inleiers wat getoets is se volgorde data word in Addendum A gelys. Smeltings-temperatuur (T_S) van die individuele inleiers is bereken volgens “OligoAnalyzer 3.1” beskikbaar by die webtuiste <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>. Aanhegtingstemperatuur (T_A) gebruik was identies aan die (T_S), omdat die “OligoAnalyzer 3.1” program die parameters van die spesifieke PCR-reaksie-kondisies in ag neem en daar dus nie voorsiening hoef gemaak te word vir verskil in T_A en T_S nie.

2.1.4.2 Amplifikasie

Alle PCR-reaksies is uitgevoer in 'n “GeneAmp[®] PCR System” (Applied Biosystems) in geotoklaveerde 0.2 ml dun-wand PCR-reaksie-buisies. PCR-reaksies is voorberei in 'n laminêre

vloeikabinet (LABOTEC) omdat RAPD-reaksies baie maklik kontamineer. Die reaksie-kondisies is geoptimeer in 'n 25 µl reaksie bevattende 1 x PCR NH₄ reaksie buffer [16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8 by 25°C), 0.01 % Tween-20], 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM inleier, 0.5 U Boline BIOTAQ™ DNS polimerase en 1 µl gDNS. Optimale amplifikasie is verkry met DNS-konsentrasies tussen 80 en 120 ng/µl. Die PCR amplifikasie kondisies was as volg: een denatureringsiklus by 94°C vir 5 min, 45 siklusse van 94°C vir 1 min, 'n anhegtingstemperatuur soos gespesifiseer in Addendum A vir 1 min, 72°C vir 2 min gevolg deur 1 siklus by 72°C vir 5 min. Die PCR-produk is by 4°C gestoor totdat dit op 'n agarose jel geëlektroforeer is.

2.1.4.3 Agarose jel-elektroforese en visualisering

Agarose jel-elektroforese is uitgevoer soos beskryf deur Sambrook *et al.* (1989). PCR-produkte is geskei op 'n 1.5 % (m/v) agarose “DNase/RNase-free” (BIOLINE) jel in 1X TBE [5x TBE voorraadoplossing: 0.5 M Tris, 0.5 M boorsuur, 0.5 M EDTA (pH 8.0)] teen 80 mV vir 120 min. Ethidiumbromied (0.5 µg/ml) is by die agarose jel gevoeg vir visualisering met 'n ultra-violet (UV) “transilluminator” (“Biorad Gel Doc 1000”). Ses maal (6x) Ficoll Orange G [0.1 % (m/v) Orange G, 20 % (m/v) Ficoll[®], 10 mM Na₂EDTA, pH 7] laaibuffer is gebruik om die laai van DNS in die putjies te vergemaklik. Die molekulêre massa merkers pGEM[®] (Promega) en Hyperladder II (BIOLINE) is gebruik.

2.1.4.4 Bevestiging van RAPD-polimorfismes

Die RAPD-reaksies wat polimorfismes opgelewer het, is herhaal met 'n paneel van segregerende plante (Tabel 2.2) vir ses van die agt geenkomplekse om die polimorfisme te bevestig. Die analise is onder die identiese reaksiekondisies uitgevoer waaronder die aanvanklike polimorfismes opgespoor is.

2.1.5 Analise van Weerstandsgen Analooë Polimorfismes (RGAP)

Weerstandsgen analise is uitgevoer volgens die riglyne van Chen *et al.* (1998)

2.1.5.1 Inleiers

Inleiers gebaseer op die gekonserveerde domeine of streke van gekloneerde weerstandsgene is vervaardig deur Inqaba Biotech (Pretoria, SA). Sewe inleiers met volgordes en oorsprong soos

uiteengesit in Tabel 2.3 is getoets in verskeie kombinasies (Tabel 2.4) in 'n poging om sodoende polimorfismes te identifiseer. Die enkel inleierkombinasies (i.e dieselfde inleier as terug- en voorwaartse inleier) is nie gebruik nie.

Tabel 2.3. Weerstandsgen analoog inleiers gebruik in hierdie studie.

Inleier Kode	Nukleotiedvolgorde	Gen en koderende domein	
Pto kin 1	5'-GCATTGGAACAAGGTGAA-3'	Pto Kinase	Chen <i>et al.</i> (1998); Shi <i>et al.</i> (2001)
Pto kin 2	5'-AGGGGGACCACCACGTAG-3'	Pto Kinase	
Pto kin 4	5'-AGTGTCTTGTAGGGTATC-3'	Pto Kinase	Leister <i>et al.</i> (1996); Chen <i>et al.</i> (1998); Shi <i>et al.</i> (2001)
RLRR for	5'-CGCAACCACTAGAGTAAC-3'	RPS2 Leusien-ryke herhalings	
RLRR rev	5'-ACACTGGTCCATGAGGTT-3'	RPS2 Leusien-ryke herhalings	
S2	5'-GGIGGIGTIGGIAAIACIAC-3'	RPS2 Leusien-ryke herhalings	Leister <i>et al.</i> (1996) Chen <i>et al.</i> (1998); Shi <i>et al.</i> (2001)
AS3	5'-IAGIGCIAGIGGIAGICC-3'	RPS2 Leusien-ryke herhalings	

2.1.5.2 Amplifikasie

Alle PKR-reaksies is uitgevoer in 'n "GeneAmp[®] PCR System" (Applied Biosystems) in geoutoklaveerde 0.2 ml dun-wand PKR-reaksie-buisies. PKR-reaksies is uitgevoer in 'n 25 µl reaksie bevattende 1 x PKR NH₄ reaksie-buffer [16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8 by 25°C), 0.01 % Tween-20], 1.2 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 0.32 µM van elke inleier, 1 U Bioline BIOTAQ[™] DNS-polimerase en 1 µl gDNS. Optimale amplifikasie is verkry met DNS konsentrasies tussen 80 en 120 ng/µl. Die PKR amplifikasie kondisies was as volg: een denatureringsiklus by 94°C vir 5 min, 45 siklusse van 94°C vir 1 min, 'n aanhegtingstemperatuur van 45°C ongeag die inleierkombinasie gebruik, vir 1 min, 72°C vir 2 min gevolg deur 1 siklus by 72°C vir 5 min. 'n Twee-en-half minuut oorgangstyd is tussen die denaturerings en aanhegtingsiklusse ingestel.

Tabel 2.4. Lys van alle inleierkombinasies gebruik met die weerstandsgeen analoog inleiers soos uiteengesit in Tabel 2.3.

Inleierkombinasies		
1.	Pto kin 1	Pto kin 2
2.	Pto kin 1	RLRR rev
3.	Pto kin 1	RLRR for
4.	Pto kin 1	AS 3
5.	Pto kin 1	S2
6.	Pto kin 1	Pto kin 4
7.	Pto kin 2	RLRR rev
8.	Pto kin 2	RLRR for
9.	Pto kin 2	AS 3
10.	Pto kin 2	S2
11.	Pto kin 2	Pto kin 4
12.	RLRR rev	RLRR for
13.	RLRR rev	AS 3
14.	RLRR rev	S2
15.	RLRR rev	Pto kin 4
16.	RLRR for	AS 3
17.	RLRR for	S2
18.	RLRR for	Pto kin 4
19.	AS3	S2
20.	AS3	Pto kin 4
21.	S2	Pto kin 4

2.1.5.3 Denaturerende Poli-akriëlamied-jel elektroforese (PAGE) en silwer-kleuring.

PKR-produkte is geskei op 'n 6 % denaturerende poli-akriëlamied jel. Die jel is opgemaak vanaf 'n 40 % voorraadoplossing (95 akriëlamied (AA): 5 bis-akriëlamied (BAA)) waarby urea (6M) en TBE (1 X) gevoeg is. Ammonium persulfaat (APS) (0.1 % w/v) en N, N, N',N'-tetra-metiel-etil-een-di-amien (TEMED) (0.001 % v/v) is by die jel gevoeg om dit te laat polimeriseer. Die jel (1 mm by 330 mm by 410 mm) is gegiet en toegelaat om te polimeriseer vir 2 h waarna die kam verwyder is. Die putjies is uitgespuit met 1 X TBE om urea en jelstukkies te verwyder en die jel is geëlektroforeer in 1 x TBE (65 V, 30 min) op 'n "Model S 2001" elektroforese apparaat (Life Technologies™). Sewe µl formamied laaibuffer [98 % formamied, 10 mM Na₂EDTA (pH 8.0), 0.05 % (w/v) bromo-fenol blou en 0.05 % (w/v) xileen sianol] is by PKR-produkte sowel as 3 µl van 'n 100 bp molekulêre merker (Promega) gevoeg. Die PKR-produkte en molekulêre merker in laaibuffer is vir 5 min by 95°C gedenatureer waarna dit onmiddelik op ys gesit is. Vyftien µl van

elke monster en 10 µl van die molekulêre merker is op die jel gelaai waarna dit vir 8-10 ure teen 65 V geëlektroforeer is. Die silwerkleuring prosedure het bestaan uit 20 min fiksering in 10 % (v/v) etanol en 0.5 % (v/v) asynsuur (50 rpm), waarna die jel gewas is in ddH₂O vir 5 min. Die jel is vervolgens gekleur in 0.2 % (m/v) silwernitrat vir 20 min en daarna weer gewas in ddH₂O vir 2 x 5 min. Die jel is toegelaat om te ontwikkel in 1.5 % (m/v) NaOH en 0.16 % (v/v) formaldehid in ddH₂O. Die jel is weereens afgespoel in ddH₂O (10 sek), waarna dit bedek is met plastiek om te verhoed dat die jel op die glasplaat uitdroog. 'n Foto van die silwer-gekleurde jel is met 'n Nikon "Coolpix" digitale kamera geneem.

2.1.5.4 Bevestiging van RGAP-polimorfismes

Die RGAP-reaksies wat polimorfismes opgelewer het, is herhaal om die polimorfismes te bevestig. Hiervoor is panele van segregerende plante (Tabel 2.2) vir ses van die agt geenkomplekse gebruik. Die analyses is onder die identiese reaksiekondisies uitgevoer waaronder die aanvanklike polimorfismes opgespoor is.

2.1.6 Suiwering van PKR-fragmente

2.1.6.1 Agarose jel

Die DNS in polimorfiese RAPD-bande is vanuit die jel gesuiwer volgens die instruksies van die "QIAquick[®] Gel Extraction Kit" (Qiagen). Polimorfiese bande is afsonderlik met 'n steriele skalpel uit die agarose jel geïsoleer terwyl dit gevisualiseer is onder UV-lig. Die jelfragmente is geweeg. Drie volumes Buffer QG is by elke 1 volume jel (100mg ~ 100µl) gevoeg en geïnkubeer (50°C, 10 min) totdat die jel ten volle opgelos het. Die monster is daarna oorgedra na 'n "QIAquick" swaai kolom wat in 'n 2 ml versamelbuis geplaas is. Die monster is gesentrifugeer (13 000 rpm, 1 min) om die DNS aan die QIAquick-membraan te bind. Die deurvloei is afgegooi, 0.75 ml Buffer PE is by die kolom gevoeg en die kolom is gesentrifugeer (13 000rpm, 1 min). Die kolom is daarna oorgedra na 'n skoon 1.5 ml mikrofuge buis, 50 µl Buffer EB [10 mM Tris-Cl, pH 8.5], is by die kolom gevoeg en geïnkubeer (1 min, KT). Die kolom is gesentrifugeer (13 000 rpm, 1 min) en die geëluëerde DNS is gestoor by -20°C.

2.1.6.2 Poli-akrielamied jel

Poli-akrielamied jelekstraksie is uitgevoer volgens die riglyne van Chen *et al.* (1998) met geringe aanpassings. Diagnostiese RGA-bande is met 'n steriele skalpel uit 'n poli-akrielamied-jel gesny.

Die jelfragmente is in 50 μl dH_2O geweek en geïnkubeer (10-30 min, 94°C). Die oplossing is gesentrifugeer, waarna 2 μl van die bostand gebruik is as templaar vir her-amplifikasie met die oorspronklike RGA-inleiers en PKR-kondisies (Zhang *et al.* 2004). Hierdie PKR-produkte is op 'n 1.5 % agarose jel geëlektroforeer soos beskryf in 1.4.3, waarna die bandjies met dieselfde grootte as die oorspronklike fragment uit die jel gesuiwer is soos beskryf in afdeling 2.1.6.1.

Die poli-akrielamied jellekstraksie stap is later vervang deur ook hier die gewone agarose “QIAquick[®] Gel Extraction Kit” (Qiagen) te gebruik met geringe aanpassings nl. dat 100 μl Buffer QG gebruik is ongeag die gewig van die bandjie wat geïsoleer is.

2.1.7 DNS kwantifisering

DNS is gekwantifiseer deur 'n “Nanodrop[®] ND-1000” spektrofotometer te gebruik.

2.1.8 Klonering van gesuiwerde PKR-produkte in “PGEM[®]-T EASY Vector”

Alle fragmente in hierdie studie is gekloneer in die “PGEM[®]-T Easy Vector” (Promega). Liniêre vektore word berei deur die “pGEM[®]-T Easy Vector” met die restriksie ensiem *EcoR* V te sny en 'n timidien (T) basispaar aan beide 3' terminale van die plasmied te heg. Hierdie 3'-T-oorhange by die kloneringsetel verbeter die moontlikheid op suksesvolle ligeringsreaksies met PKR-produkte verkry vanaf polimerase-ensieme soos *Taq*-polimerase wat 'n ekstra adenien (A) basispaar aan die 5'-ent van die geamplifiseerde produk aanheg. Die oorhange verhoed ook dat die vektor op homself ligger.

2.1.8.1 Ligasie

Die “pGEM[®]-T Easy Vector Systems” is gebruik soos voorgeskryf deur die vervaardiger (Promega tegniese handleiding no. 042, 1999). Die ligering van die gesuiwerde PKR-fragment in die “pGEM[®]-T Easy Vector” is uitgevoer in 'n 10 μl reaksie bevattende: 1 x “Rapid Ligation Buffer”, 25-50 ng van die “pGEM[®]-T Easy Vector”, x ng invoeging (gesuiwerde PKR-produk) en 3 eenhede/ μl T4 DNS-Ligase). Die konsentrasie van die invoeging (x) gebruik vir elke individuele fragment is bereken soos voorgeskryf deur die vervaardigers. Die ligeringsreaksie is oornag geïnkubeer by 4°C om die maksimum aantal suksesvolle ligerings te verseker.

2.1.8.2 Voorbereiding van kompetente selle

Kompetente *Escherichia coli* DH5 α (Whitehead Scientific) selle is voorberei met 'n aangepaste metode van Dagert en Ehrlich (1979). *E. coli* DH5 α selle is vanaf 'n voorraadoplossing kompetente selle in duplikaat op Luria-Bertani (LB) agarplate uitgestreep. Die plate is oornag onderstebo geïnkubeer by 37°C. 'n Enkelkolonie *E. coli* DH5 α is vanaf hierdie plate gekies en in 5 ml LB geïnkuleer (37°C, 225 rpm, oornag). Die oornag-kultuur is 1:100 verdun deur vyf ml van die kultuur by 500 ml LB medium te voeg. Die kultuur is geïnkubeer (37°C, 225 rpm) en die absorpsie-waarde (A_{600}) van die kultuur na 2 h, en elke 30 min daarna, gemeet tot 'n optimale seldigheid van 0.5-0.6 verkry is. Die kultuur is daarna vir 5 min op ys verkoel en oorgedra na 'n steriele rondeboom sentrifuge-buis wat ook vooraf verkoel (4°C) is. Die selle is gesentrifugeer (10 min, 5 000 rpm, 4°C). Die bostand is verwyder en selle gehersuspendeer in 20 ml yskoue buffer [100 mM MgCl₂] en geïnkubeer (20 min, op ys). Selle is weer versamel (10 min, 4 000 rpm, 4°C), die bostand verwyder, die selle op ys gestoor en gehersuspendeer in 2 ml yskoue buffer [100 mM CaCl₂, 15 % (v/v) gliserol]. Deelvolumes van 100 μ l is na steriele, voorafverkoelde 1.5 ml mikrofuge buisies oorgedra en by -80°C gestoor.

2.1.8.3 *Escherichia coli* transformasie

Kompetente *E. coli* DH5 α selle is gebruik vir transformasie reaksies met die “pGEM[®]-T Easy Vector” volgens die metodologie van Sambrook *et al.* (1989). Die ligasie reaksie is by 100 μ l kompetente selle gevoeg in 'n 1.5 ml mikrofuge-buis en versigtig gemeng. Die selle is geïnkubeer: 30 min op ys, gevolg deur 1 min hitteskok by 42°C en onmiddelik daarna op ys vir 2 min. Hierna is die selle in 900 μ l LB medium (Merck) geïnkubeer (37°C, 115 rpm, 90 min), waarna 100 μ l van die selle uitgeplaat is op LB plate bevattende 100 μ g/ml ampisilien (Roche) en geïnkubeer is (37°C, 16-24 h). Ampisilien is gebruik as die selektiewe antibiotikum vir “pGEM[®]-T Easy” blou-wit kolonie seleksie waar LB-plate vooraf bedek is met X-Gal [0.016 mg/ml] (5-bromo-4-chloro-3-indosiel- β -D-galaktosied) en IPTG [0.16 mM] (Isopropiel B-D thio-galaktopianosied). Plate is vir 16-24 h geïnkubeer by 37°C.

2.1.8.4 Sifting van positiewe wit kolonies met PKR

Die “pGEM[®]-T Easy Vector” se kloneringsetel is binne die koderende streek van die ensiem β -galaktosidase se α -peptied geleë. Suksesvolle ligering van 'n invoeging binne die streek in 'n geslote plasmied, verbreek die koderende volgorde van die ensiem en produseer wit kolonies op

die plate. Die kloneringsetel word begrens deur T7 en SP6 RNA polimerase promotors. Wit kolonies is met PCR gesif om die teenwoordigheid van die regte invoeging te bevestig. Die korrekte invoeging sal dus 'n verwagte geamplifiseerde produk lewer wat ooreenstem met die grootte van die gekloneerde fragment plus die volgordes wat die kloneringsetel begrens tot en met die T7 en SP6 volgordes. PCR-reaksies is uitgevoer in 'n "GeneAmp[®] PCR System 9700" (Applied Biosystems) in ge-outoklaveerde 0.2 ml dun-wand PCR-reaksiebuisies. Een derde van 'n wit kolonie is met 'n steriele tandestokkie in 'n 10 µl PCR-mengsel (1x Bioline PCR NH₄ reaksiebuffer [16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl pH 8.8 by 25°C, 0.01 % Tween-20], 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 µM van elke vektor spesifieke inleier T7 5'-TACGATTTAGGTGACACTATAG-3' en SP6 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' en 0.5 U Bioline BIOTAQ[™] DNS polimerase) geplaas. Die PCR amplifikasie-kondisies was as volg: een siklus by 94°C vir 5 min, 25 siklusse van 94°C vir 30 sek, 55°C vir 30-60 sek, 72°C vir 30 sek, gevolg deur 1 siklus by 72°C vir 7 min. PCR-produkte is soos beskryf in afdeling 2.1.4.3 op 'n 1 % (m/v) agarose jel geëlektroforeer vir 30 min.

Bevestigde positiewe wit kolonies is verder in 5 ml LB medium, bevattende 100 µg/ml AMP geïnkuleer en oornag geïnkubeer (37°C, 225 rpm) vir plasmiedvermeerdering.

2.1.8.5 Plasmied DNS suiwering

Die "Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purification System" (Promega), is volgens die voorskrifte van die vervaardiger gebruik om die plasmied uit die kolonies te suiwer. Een-en-'n-halwe milliliter van die oornagkultuur is gesentrifugeer (13 200 rpm, 1 min) en die sentrifugaat gehersuspendeer in 250 µl resuspensie-oplossing (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM Na₂EDTA, 100 µg/µl Rnase A). Twee honderd-en-vyftig µl sellise oplossing (0.2 M NaOH, 1 % SDS) is bygevoeg, die oplossing gemeng deur inversie en geïnkubeer (5 min, 37°C). Tien µl alkaliese protease-oplossing is bygevoeg, die buis gemeng d.m.v inversie en geïnkubeer (5 min, KT). Drie honderd-en-vyftig µl neutraliseringsoplossing (4.09 M guanidien hidro-chloried, 0.759 M kalium asetaat, 2.12 M asynsuur pH 4.2) is bygevoeg, die oplossing gemeng deur inversie en gesentrifugeer (13 200 rpm, 10 min). Die skoon lisaat is afgegooi in 'n "Wizard[®] Plus SV Miniprep Spin Column" wat vooraf in 'n 2 ml versamelbuis geplaas is, en gesentrifugeer (13 200 rpm, 1 min). Die deurvloei is verwyder en 750 µl wasoplossing (60 mM kaluimasetaat, 8.3 mM Tris-Cl pH 7.5, 40 µM Na₂EDTA, 60 % EtOH) is bygevoeg en die swaai kolom gesentrifugeer (13 200 rpm, 1 min). Die deurvloei is verwyder, 250 µl wasoplossing is by die swaai kolom gevoeg en

gesentrifugeer (13 200 rpm, 1 min). Die swaai kolom is oorgedra na 'n steriele 1.5 ml mikrofuge buis, 50 μ l ddH₂O is bygevoeg en geïnkubeer (1 min, KT) en gesentrifugeer (13 200 rpm, 1 min). Die plasmied DNS is gestoor by -80°C .

2.1.9 Volgordebepaling

Die plasmied DNS-template se nukleotiedvolgordes is bepaal met 'n "Applied Biosystems ABA PRISM BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit" soos voorgeskryf deur die vervaardigers. Die T7 en SP6 inleiers is gebruik vir alle volgordebepalings reaksies. Volgordebepaling is deur die Sentrale DNS Volgorde Bepaler, Universiteit Stellenbosch, gedoen.

Die konsentrasies van die gesuiwerde plasmied is d.m.v 'n "Nanodrop® ND-1000" spektrofotometer bepaal. Die plasmied-DNS is vervolgens verdun met ddH₂O tot 100 ng/ μ l soos vereis word vir DNS volgordebepaling.

2.1.10 Volgorde analise

Die DNS-volgorde is met die sagteware programme, "Chromas" (weergawe 1.45 Kopiereg 1998-2004, Technelysium Pty. Ltd., alle regte voorbehou) (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) en "BioEdit Sequence Alignment Editor" weergawe 6.07 (Hall 1999) geanaliseer.

2.1.11 Volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde DNS (SCAR) ontwerp en analise

2.1.11.1 SCAR-Inleiers

Inleiers vir die SCARs is ontwerp volgens die riglyne van Paran en Michelmore (1993). Daar is gepoog om die inleiers so te ontwerp dat dit die oorspronklike 10-mer inleiers van hul afsonderlike RAPD-voorganger bevat het, sowel as 'n addisionele 10-14 basispare om dus 'n 20-24 mer inleier te produseer. Aangesien die RGAP-inleiers reeds 20 bp in lengte is, is die inleiers verleng met 10-14 bp vanaf om en by die laaste 10 bp van die inleier. Interne inleiers, wat nie die oorspronklike RAPD- of RGA-inleierbindingsetel ingesluit het nie, is ook in sommige gevalle ontwerp. Inleiers is ontwerp om aan die volgende kriteria te voldoen: GC-inhoud van 45-55 % en aanhegtingstemperatuur van 50-60 $^{\circ}\text{C}$. Smeltings-temperatuur (T_s) van die individuele inleiers is bereken volgens "OligoAnalyzer 3.1" beskikbaar by die webtuiste

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>. Smeltings-temperatuur (T_s) is as riglyn gebruik vir aanhegtingstemperatuur (T_A) wat geoptimeer is vir elke reaksie. Inleiers is vervaardig deur Inqaba Biotec.

2.1.11.2 Bevestiging van SCAR-merkers

Die oorspronklike positiewe en negatiewe bulks plus die F_1 -populasies (Tabel 2.1 en Tabel 2.2) wat gebruik is om die RAPD en RGAP-merkers te bevestig is getoets met die SCAR-merkers om te sien of die merkers hul spesifisiteit behou het.

2.1.11.2.1 Amplifikasie

Alle PCR-reaksies is uitgevoer in 'n "GeneAmp[®] PCR System 9700" (Applied Biosystems). Suksesvolle RAPD-, RGAP- en SCAR-merkers is met een van vier PCR-reaksiemengsels (A, B, C en D, Tabel 2.5) in kombinasie met een van vier verskillende PCR-siklus programme (1, 2, 3 en 4, Tabel 2.6) geoptimeer.

Tabel 2.5. Reaksiemengsels wat gebruik is vir optimisering van die PCR-kondisies vir potensieel nuttige merkers vir die weerstandsgeendraende translokasies. Die tabel dui die finale konsentrasies van die reagense gebruik in 'n 25 μ l PCR-reaksie aan. Bioline BIOTAQ[™] DNS polimerase is telkens gebruik met die reaksiebuffer en $MgCl_2$ wat daarmee saam voorsien is.

Reaksiemengsel	dH ₂ O	[Buffer]	[MgCl ₂]	[dNTP]	[V ^I Inleier]	[T ^{II} Inleier]	[Taq-polimerase]	DNS ng
A		1 X	2.5 mM	0.2 mM	0.4 μ M	0.4 μ M	0.5 U	80-120
B		1 X	1.2 mM	0.8 mM	0.32 μ M	0.32 μ M	1 U	80-120
C		1 X	1.2 mM	0.8 mM	0.32 μ M	0.32 μ M	1 U	60-200

^I voorwaartse inleier

^{II} terugwaartse inleier

Tabel 2.6. PCR siklusse wat gebruik is vir optimisering van die PCR-kondisies van potensieel nuttige merkers. Die totale tydsduur van elke program word ook aangedui.

	1	2	3	4	5
94 °C	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
94 °C	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min
T _A °C	1 min X 45	* 2 min X 45	0.5 min X 35	0.5 min X 40	0.5 min X 40
72 °C	2 min	1 min	1.5 min	1 min	0.5 min
72 °C	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
4 °C	∞	∞	∞	∞	∞
	3h 10 min	3h 10 min	1h 55 min	1h 50 min	1h 30 min

* 'n Oorgangstyd van 2.5 min is ingestel tussen die denaturerings en aanhegtings siklusse.

HOOFSTUK 3. RESULTATE EN BESPREKING

3.1 OPSPORING EN MODIFIKASIE VAN RAPD- EN RGAP-MERKERS VIR KORING WEERSTANDSGEENKOMPLEKSE

3.1.1 Plant genomiese DNS-ekstraksies

Genomiese DNS-konsentrasies is na ekstraksie met 'n spektrofotometer (NanoDrop® ND-100, Nanodrop Technologies Inc., VSA) bepaal deur die absorpsie van DNS by 'n liggolflengte van 260 nm te meet. Hiervolgens is daar ongeveer 1000 ng/μl genomiese DNS per ekstraksie geïsoleer. Die A260/A280 en A260/A230 verhoudings is gebruik om die suiwerheid van die DNS te bepaal. DNS-ekstrakte met OD₂₆₀/OD₂₈₀ verhouding laer as 2.0 en OD₂₆₀/OD₂₃₀ verhouding van 2.2 is beskou as suiwer en vry van proteïene. Die geëkstraheerde gDNS het aan hierdie vereistes voldoen en was dus van hoë gehalte en nie gedegradeer nie.

3.1.2 RAPD-analise

3.1.2.1 Amplifisering en jel-elektroforese

Met RAPD-analise is daar oor die algemeen goeie amplifisering van DNS-fragmente gekry en die fragmente kon duidelik op die agarose jels geskei en waargeneem word. Verskeie polimorfismes, met variërende intensiteit, is opgespoor vir elkeen van die paneel plante wat in Tabel 2.1 beskryf is. Uit 'n totaal van 260 RAPD-inleiers wat gebruik is kon 85 polimorfiese bande geïdentifiseer word. Die tegniese besonderhede van die RAPD-inleiers wat benut is vir hierdie reaksies word in Addendum A weergegee terwyl 'n jelfoto van die bande wat met elk van die inleiers op die plantpaneel ge-amplifiseer is, in Addendum B verskaf word. Daar is gevind dat die optimale DNS-konsentrasie 80-120 ng per RAPD-reaksie was. Hoër DNS-konsentrasies het tot smere gelei waar polimorfismes nie onderskei kon word nie. Laer konsentrasies het geen produk opgelewer nie, of bandjies van te lae intensiteit. Hierdie konsentrasies is veel hoër as die optimale DNS-konsentrasies (10-20 ng) wat aanbeveel is deur Devos & Gale (1992) vir die gebruik van RAPD-merkers in 'n koringgenoom. Dit beklemtoon dus die noodsaaklikheid om binne laboratoriumverband eers die reaksie-kondisies te optimaliseer alvorens RAPD-analises gedoen word.

In die geval van RAPD-reaksies waar die inleiers geblyk het om geen produkte te lewer nie (soos bv. OPE-10 en OPE-17, Figure 4.3 en 4.4) is die reaksies herhaal met nuwe inleier werkoplossings. Hierdie inleiers het egter deurgaans soortgelyke resultate gelewer, waarvan die beter foto in Addendum B aangebring is. Elke moontlike potensiële RAPD-polimorfisme is opgevolg ongeag die intensiteit van die bandjie wat geamplifiseer is.

3.1.2.2 Bevestiging van RAPD-polimorfismes

Die RAPD-analises wat in die aanvanklike toetspaneel polimorfiese bande opgelewer het vir S8, S12, S14, S15, Smac en S20 is onder die identiese reaksiekondisies herhaal op 'n tweede paneel van segregerende plante ('n afsonderlike paneel vir elk van die onderskeie weerstandsgeenkomplekse). In die geval van S13 is die polimorfiese reaksies herhaal op 'n paneel van plante wat verskillende lengtes van die translokasie ingesluit het (afdeling 2.1.2). Die RAPD-inleiers wat potensieel nuttige polimorfismes geamplifiseer het, word in Tabel 3.1 opgesom. Daardie polimorfismes wat herhaalbaar was en opgevolg is vir moontlike omskakeling na SCAR-merkers word ook aangedui. Die *Lr19* polimorfiese bande is nie verder ontleed nie aangesien 'n geskikte STS-merker reeds vir die geen ontwikkel is (Prins *et al.* 2001).

3.1.3 RGAP-analise

3.1.3.1 Amplifisering en PAGE-analise

Al die moontlike RGA-inleierkombinasies (Tabel 2.4) is gebruik vir ontleding van die aanvanklike toetspaneel (Tabel 2.1). Verskeie polimorfismes, met variërende intensiteite, is opgespoor vir elke vreemde chromosoomsegment in die toetspaneel. Jelfotos vir elke kombinasie van inleiers word in Addendum C verskaf, en waar tersaaklik, word die polimorfiese bande aangedui.

3.1.3.2 Bevestiging van polimorfismes

Die RGAP-analises wat polimorfiese bande opgelewer het vir S8, S12, S14, S15, Smac en S20 is soos met die RAPD-inleiers onder die identiese reaksiekondisies herhaal op die individuele toetspanele (bestaande uit segregate met en sonder 'n spesifieke translokasie), terwyl die reaksies van S13 herhaal is op 'n paneel van plante wat verskillende lengtes van die translokasies besit

het. Die inleiers wat gebruik is om die aanvanklike polimorfisme op te spoor, met die aantal polimorfismes wat deur elke inleierpaar geamplifiseer is, word in Tabel 3.2 uiteengesit.

Tabel 3.1. RAPD-inleiers waarmee polimorfiese bande geassosieer met die S8, S12, S13, S14, S15, Smac, S20 en *Lr 19* translokasies opgespoor is. In gevalle waar 'n inleier meer as een polimorfiese fragment vir 'n gegewe translokasie geamplifiseer het is dit as boskrif aangedui. Vetgedrukte letters dui inleiers aan wat herhaalbare polimorfismes geproduseer het, wat geteiken kon word vir omskakeling na SCAR-merkers.

S8	S12	S13	S14	S15	Smac	S20	<i>Lr19</i>
OPN-1	OPC-5	OPC-1	OPE-19	OPC-11	OPC-1	OPE-12	OPC-6
OPT-3	OPF-11	OPC-10	OPF-16	OPE-13	OPC-7	OPF-9	OPF-15
OPT-6	OPW-1	OPC-13	OPN-8	OPP-4	OPC-17	OPN-19	OPM-3
		OPC-17	OPN-12 ²	OPQ-17 ²	OPF-4	OPO-7	OPN-15
		OPC-19	OPN-13	OPT-3	OPF-5	OPO-11	OPN-17
		OPF-10	OPN-18		OPF-9	OPO-15	OPQ-2
		OPF-20 ²	OPN-20		OPF-17	OPP-5	OPR-9
		OPN-15	OPP-4		OPF-19	OPV-5	OPT-6
		OPO-2	OPQ-7 ²		OPM-9	OPW-2	OPV-9
		OPO-11	OPR-4		OPM-12	OPW-7	OPW-1
		OPQ-9	OPT-5		OPO-2	OPW-15	OPW-5
		OPQ-20	OPU-9		OPP-4		
		OPR-16	OPU-11		OPP-17		
		OPT-5			OPQ-3		
		OPT-14			OPQ-19		
		OPT-17			OPR-3		
		OPT-18			OPR-6		
					OPT-16		

Tabel 3.2. RGA-inleier-kombinasies waarmee potensieel nuttige polimorfismes opgespoor kon word. Die inleierpare wat bestendige fragmente geproduseer het vir 'n spesifieke plant in die toetspaneel is vetgedruk met die aantal polimorfismes wat herhaalbaar was as boskrif. Geen polimorfismes kon vir *Lr19* ge-identifiseer word nie.

Inleierkombinasie		S8	S12	S13	S14	S15	Smac	S20	<i>Lr19</i>
1	Pto kin 1-Ptokin 2			2	2	3			
2	Pto kin 1-RLRR rev						1		
3	Pto kin 1-RLRR for			1					
4	Pto kin 1- AS 3			1					
5	Pto kin 1-S2		2	3	2	2			
6	Pto kin 1-Ptokin 4	3	2	1	1			1	
7	Pto kin 2-RLRR rev							1¹	
8	Pto kin 2-RLRR for			3¹	1				
9	Pto kin 2-AS 3								
10	Pto kin 2-S2			1					
11	Pto kin 2-Pto kin 4			2²					
12	RLRR rev-RLRR for								
13	RLRR rev-AS 3								
14	RLRR rev-S2	5	2	1				1	
15	RLRR rev-Ptokin 4								
16	RLRR for-AS 3								
17	RLRR for-S2	1	1	2¹	3	3	1	1	
18	RLRR for-Pto kin 4	3	2	2	2	1	3		
19	AS 3-S2			2					
20	AS 3-Pto kin 4			1	1	1			
21	S2-Pto kin 4							1¹	

3.2 RAPD-, RGA- EN SCAR-MERKERS OPGESPOOR VIR DIE ONDERSKEIE INTROGRESSIES.

3.2.1 Die *Triticum dicoccoides* introgressie (S8)

3.2.1.1 RAPD-analise

Van die 230 RAPD-inleiers wat getoets is op die aanvanklike paneel van plante (Tabel 2.1; bevattende die agt gewone koring teellyne met diverse spesie-verhaalde weerstandsgene plus die vatbare kontroles; Chinese Spring (CS), W84-17 en Thatcher is slegs 3 potensieel nuttige RAPD-polimorfismes geïdentifiseer vir die S8 introgressie. Die RAPD-inleiers OPN-1, OPT-3 en OPT-6 het elkeen 'n bandjie in S8 geamplifiseer wat nie in een van die ander lyne of die gewone teellyne (wat as terugkruisingsouers gedien het), teenwoordig was nie (sien onderskeidelik Figure 4.9 en 4.19 van addendum b). Hierdie vlak van opgespoorde polimorfismes was laer as verwag aangesien data van Marais *et al.* (2005a) aangedui het dat die introgressie moontlik die hele kort arm van chromosoom 6B insluit. Die drie opgespoorde polimorfismes vir die S8 introgressie het 4 persent van die totale waargenome polimorfismes uitgemaak.

Die inleiers wat die potensieële polimorfismes geamplifiseer het is vervolgens getoets teen 'n paneel van nege-en-twintig terugkruisings- F_1 plante (TK_2F_1 : 05M64/Thatcher (Tabel 2.2)) om te bepaal of die polimorfisme herhaalbaar was en altyd saam met die weerstand segregeer het. Die paneel het weereens die S8 introgressie lyn (F_1 : 05M64 = CS*4/*T. dicoccoides*-479//3*CS-S/3/CS/4/2* Thatcher) asook die gewone koring teellyne CS, W84-17 en Thatcher as kontroles ingesluit. Die oorspronklike RAPD-reaksieondisies en PKR-profiel is gebruik om die resultate te genereer. Die inleiers OPT-3 en OPT-6, wat aanvanklik beide 'n potensieel nuttige bandjie van hoë intensiteit by ± 200 bp geamplifiseer het, het nie herhaalbare polimorfismes geproduseer wat konsekwent saam met die translokasie gesegegreer het nie. Die resultaat kon die gevolg wees van die lae herhaalbaarheid van RAPDs wat deur verskeie studies bevestig is (Weder 2002) asook die relatiewe klein toetspaneel wat vir inisiële sifting gebruik is.

Inleier OPN-1 het egter herhaaldelik twee nabye bandjies van lae intensiteit by ± 500 bp geamplifiseer wat ooreengestem het met die oorspronklik-geïdentifiseerde polimorfisme. 'n

Duidelike bandjie van ± 350 bp, wat nie voorheen sigbaar was nie, is telkens saam geamplifiseer in bestande plante soos in Figuur 3.1 gesien kan word. Omdat beide bandjies konsekwent aanwesig was in bestande plante en afwesig was in vatbare plante is aanvaar dat die polimorfismes kan dien as diagnostiese merkers vir die S8 introgressie. Die ± 350 bp produk is gekies om omgeskakel te word na 'n SCAR-merker omdat dit een duidelike band gelewer het en maklik uit die agarose jel geïsoleer kon word, sonder kontaminasie van naasliggende geamplifiseerde fragmente (soos moontlik die geval kon wees met die 500 bp merker, wat twee naasliggende bande produseer). Die ± 350 bp produk is suksesvol uit die jel geïsoleer en gekloneer soos beskryf in afdelings 2.1.6 tot 2.1.9. Twee positiewe wit *E. coli* kolonies, waarvan die korrekte grootte invoeging bevestig is met 'n kolonie-PKR, is gekies vir plasmiedvermeerdering en volgordebepaling van die ingevoegde OPN-1 PKR-fragment.

3.2.1.2 SCAR-ontwerp en analise

Volgorde ontleding van die gekloneerde OPN-1 PKR-produk het getoon dat die polimorfiese fragment, wat die oorspronklike RAPD-inleier bindingsetel insluit, se werklike grootte 360 bp is. Inleierpaar S8N1-OF en S8N1-OR is vervolgens ontwerp deur die oorspronklike RAPD-inleierbindingsetel te verleng. 'n Tweede terugwaartse inleier, S8N1-RB, wat 'n verdere verlenging van die RAPD-merker was, is later ontwerp in 'n poging om die spesifisiteit van die SCAR-merker te verhoog. Die volgordes van die oorspronklike RAPD-merker en die nuut ontwerpte SCAR-merkers word in Tabel 3.3 aangedui. Amplifikasie met die inleierpaar S8N1-OF en S8N1-OR het wel 'n bandjie in bestande plante geamplifiseer wat afwesig was in die vatbare plante, maar hierdie bandjie was 500 bp groot en nie 360 bp groot soos verwag is nie (Figuur 3.2A). Produkte van nagenoeg 360 bp en met dieselfde intensiteit is in beide vatbare en bestande plante, sowel as die terugkruisingsouers geamplifiseer. Die produk was ietwat groter in bestande plante, maar so ook in Chinese Spring wat aandui dat dit die oorsprong van die geamplifiseerde DNS moes wees. 'n Verdere bandjie van ongeveer 300 bp is slegs in Chinese Spring en in die bestande plante geamplifiseer. 'n Duidelike onvoorspelde fragment is by ± 500 bp geproduseer wat vatbare en bestande plante van mekaar kon onderskei, en ook afwesig was in al die negatiewe kontroles. Hierdie fragment stem ooreen met die grootte van die twee nabygeleë RAPD-fragmente wat aanvanklik ook as S8 diagnostiese bandjies geïdentifiseer is. Dit is dus moontlik dat die twee nabygeleë fragmente by 500 bp en die enkele 360 bp fragment verwante volgordes kon wees. Ten einde vas te stel hoe hierdie variante geamplifiseer is, sal dit

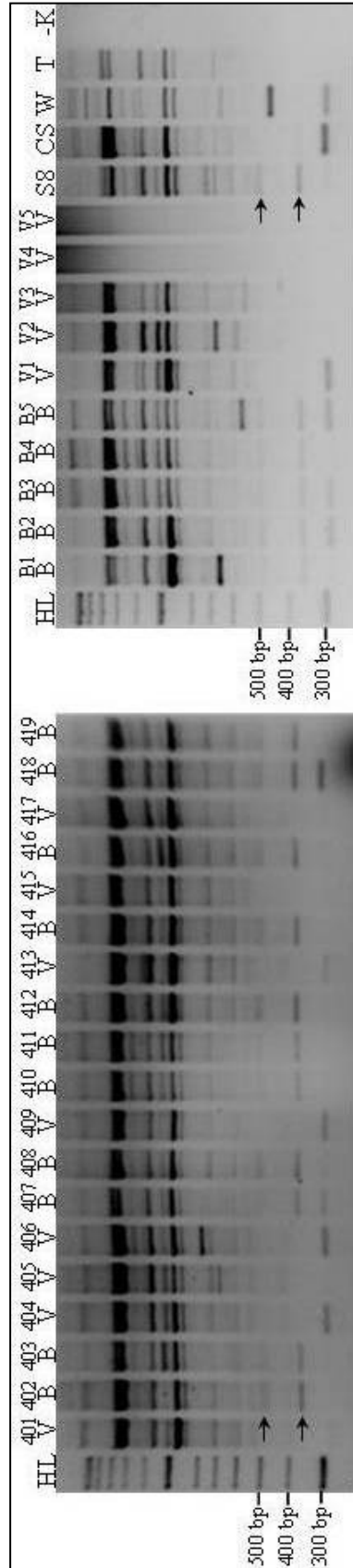
nodig wees om die onderskeie bande te kloneer, hulle volgordes te bepaal en met mekaar te vergelyk. Omdat dit buite die oogmerke van die studie val is hierdie aspek nie verder ondersoek nie. Nieteenstaande kan die SCAR-inleierpaar S8N1-OF en S8N1-OR as 'n bestendige merker vir die seleksie van plante met die S8-introgressie beskou word. PKR-amplifikasie met die SCAR-inleierpaar S8N1-OF en S8N1-RB het soortgelyke resultate gelewer (Figuur 3.2B), behalwe dat die 300 bp fragment afwesig was. Laasgenoemde is waarskynlik die beter een van die twee inleierkombinasies. Die S8-introgressie is 'n introduksie uit die homoloë (primêre) geenpoel. Dit is dus moontlik dat daar tydens normale meiose (in die aanwesigheid van *Ph1b*) rekombinasie tussen die vreemde en koringchromatien-streke op 6BS kan geskied. Alvorens die merker dus vir merkerbemiddelde seleksie gebruik word sal die koppeling van die merker en weerstand in 'n groot segregerende populasie ondersoek moet word en vasgestel moet word presies hoe naby die gene aan mekaar geleë is.

Tabel 3.3. Diagnostiese PKR-merkers ontwikkel vir die S8 introgressiesegment en gebaseer op 'n polimorfiese produk gegenereer met RAPD-inleier OPN-1. Onderstreepte gedeeltes verteenwoordig die oorspronklike RAPD-inleierbindingsetels.

Inleier	Naam	Nukleotiedvolgorde van inleier 5'-3'	Grootte van ampikon	T _A °C	PKR-program ¹	PKR-reaksiemengsel ²
RAPD	OPN-1	CTCACGTTGG	500 bp 360 bp	34	1	A
SCAR	S8N1-OF S8N1-OR	<u>CACGTTGGTAACTGAAGATT</u> <u>CTCACGTTGGACTTAAA</u>	500 bp	48	4	C
SCAR	S8N1-OF S8N1-RB	<u>CACGTTGGTAACTGAAGATT</u> <u>CTCACGTTGGACTTAAAAAA</u>	500 bp	52	4	C

¹ PKR-program soos beskryf in Tabel 2.5 (Materiaal en Metodes)

² PKR-reaksiemengsel soos beskryf in Tabel 2.6 (Materiaal en Metodes)



Figuur 3.1. Fotos van 1.5 % agarose jels ge-elektroforeer teen 80 mv vir 3 h in 1 X TBE-buffler, gekleur met EtBr en gevisualiseer onder UV-lig. Jels bevat PKR-produkte geamplifiseer met RAPD-inleier OPN-1. Die RAPD DNS-profiel verteenwoordig bestande (B) en vatbare (V) plante uit die TK₂F₁: 05M64/Thatcher (S8) populasie, die S8 introgressie (05M64 = CS*4/T. *dicoccoides*-479//3*CS-S/3/CS/4/2* Thatcher), sowel as die vatbare kontroles Chinese Spring (CS), W84-17 (W) en Thatcher (T). Die herhaalbare, polimorfiese fragmente word met pyltjies aangedui. Die eerste laan bevat “Hyperladder II” (HL) wat as molekulêre massa merker gebruik is. Die laaste laan is die kontrole reaksie wat geen DNS bevat nie (-K).

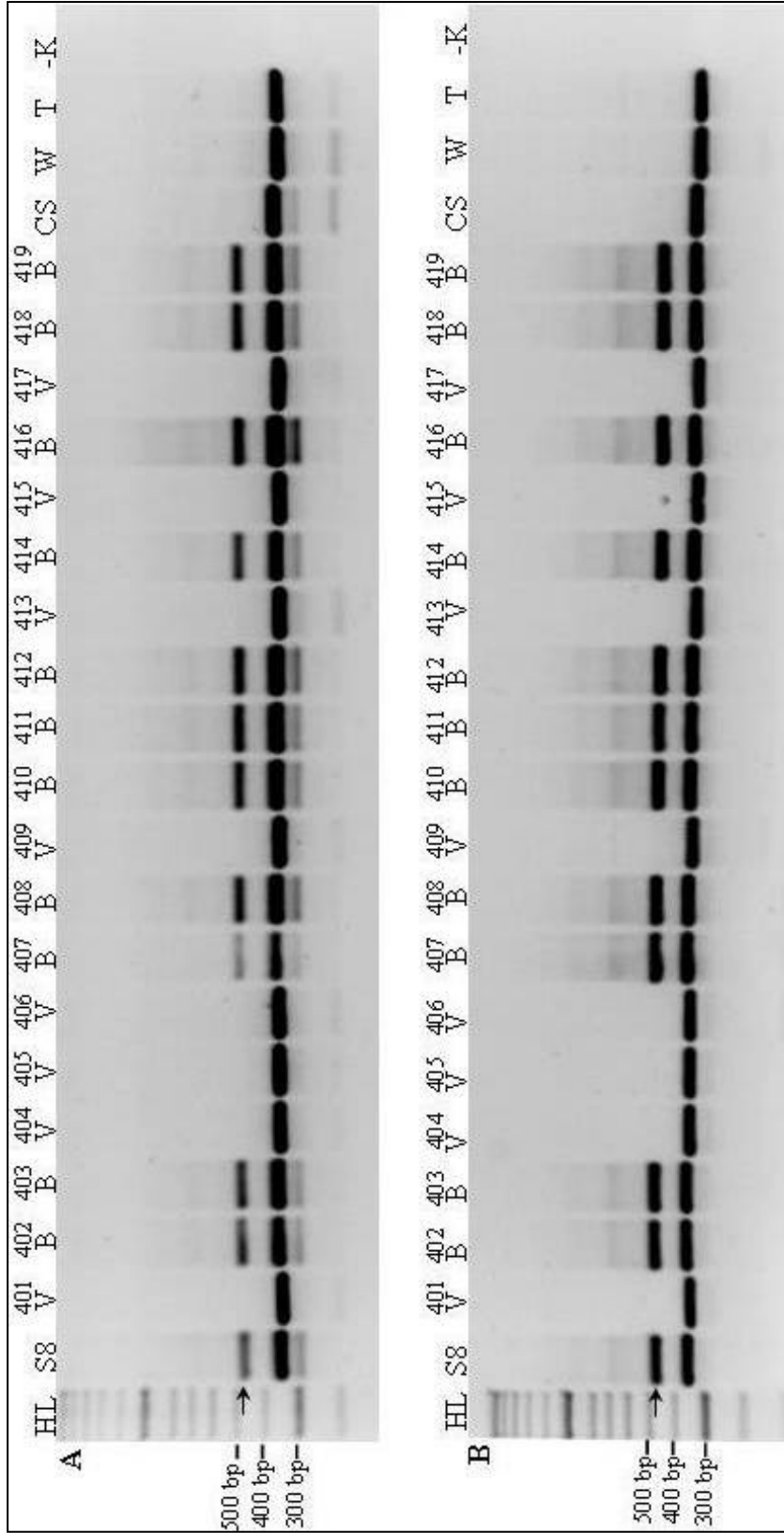


Figure 3.2A en 2B. Foto van 2 % agarose jels ge-elektroforeer teen 100 mV vir 2h in 1 X TBE-buffer en gekleur met EtBr. Die DNS-profiel verteenwoordig bestande (B) en vatbare (V) plante van die TK₂F₁: 05M64/Thatcher populasie (401-419), die S8 introgressie (F₁: 05M64 = CS*4/T. *dicoccoides*-479//3*CS-S/3/CS/4/2* Thatcher), sowel as die vatbare kontroles Chinese Spring (CS), W84-17 (W) en Thatcher (T). Amplifikasie-produkte is met die onderskeie SCAR-inleierpare S8-NIOF en S8-NIOR (A) en S8N1-OF en S8N1-RB (B) geamplifiseer. In beide A en B kan 'n diagnostiese SCAR-fragment by 500 bp waargeneem word. "Hyperladder II" is as molekulêre massa-merker gebruik. -K = negatiewe kontroloreaksie wat geen DNS bevat het nie.

3.2.1.3 RGAP-analise

Van die 21 RGA-inleierkombinasies wat op die aanvanklike plante-paneel (Tabel 2.1) getoets is het vier kombinasies (Tabel 3.2) gesamentlik 12 potensieel nuttige RGAP-polimorfismes vir die S8 introgressie opgelewer. Geeneen van die oorspronklik geïdentifiseerde RGAP-polimorfismes kon egter herhaal word op die TK₂F₁: 05M64/Thatcher populasie nie, en 'n bestendige RGAP-merker kon dus nie vir die introgressie geïdentifiseer word nie. Daar is gevind dat die RGAP-profiel van sommige inleierkombinasies swak herhaalbaar was, en dat selfs die tydsduur van elektroforese om optimale skeiding van verkreë fragmente te lewer grootliks verskil het tussen verskillende lopies van dieselfde inleierkombinasies.

3.2.2 Die *Aegilops sharonensis* translokasie (S12)

3.2.2.1 RAPD-analise

RAPD-analise op die aanvanklike toetspaneel van plante (Tabel 2.1) het slegs 3 potensieel nuttige RAPD-polimorfismes (Tabel 3.1) vir die S12 introgressie opgelewer uit die totaal van 230 RAPD-inleiers wat getoets is. Geeneen van hierdie merkers kon egter herhaal of bevestig word onder identiese reaksiekondisies op die segregerende paneel van TK₂F₁: 05M65/Thatcher vatbare en bestande plante nie.

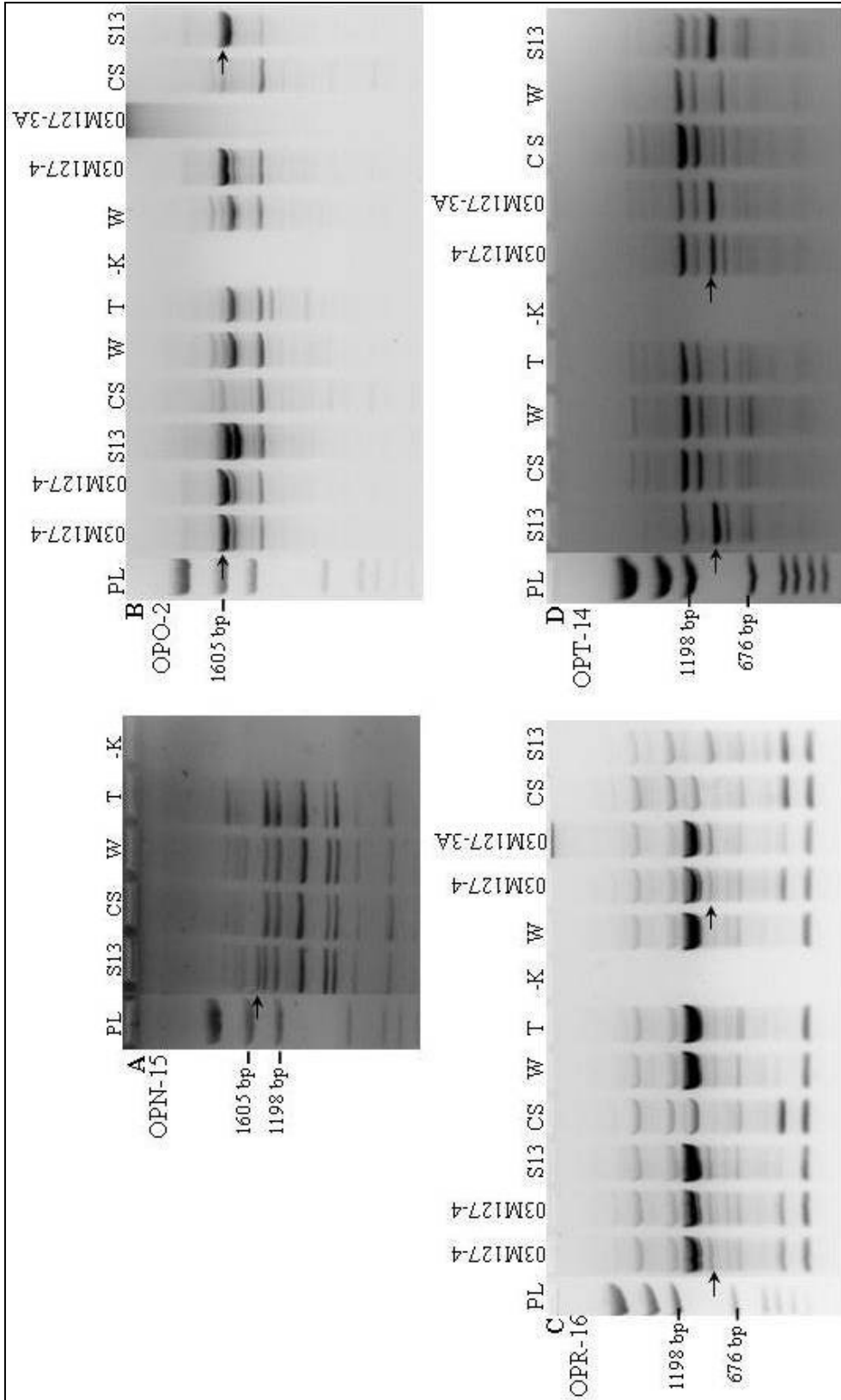
3.2.2.2 RGAP-analise

Vyf van die 21 inleierkombinasies wat op die toetspaneel van 11 plante getoets is, het gesamentlik 9 potensieel nuttige polimorfismes (Tabel 3.2) opgelewer. Elkeen van hierdie polimorfismes is vervolgens getoets op 'n segregerende paneel van vatbare en bestande plante vir die S12 introgressie nl. TK₂F₁: 05M65/Thatcher, maar geeneen van die aanvanklike polimorfismes kon herhaal of bevestig word nie. 'n Bestendige RGAP-merker kon dus nie vir die S12 translokasie herwin word nie.

3.2.3 Die *Aegilops speltoides* translokasie (S13)

3.2.3.1 RAPD-analise

Aanvanklik is 18 polimorfismes vir die S13 translokasie op die toetspaneel (Tabel 2.1) geïdentifiseer. In totaal is 13 stelle RAPD-inleiers getoets waarvan vier inleiers (OPN-15, OPO-2, OPR-16 en OPT-14) nog steeds bestendige en herhaalbare fragmente geproduseer het toe dit getoets is op 'n paneel van plante wat verskillende lengtes van die S13 translokasie ingesluit het (Figuur 3.3). Die S13 geenkompleks is geassosieer met gametosiedgene wat lei tot uitsluitlike (voorkeur-) oordrag van die translokasie na die nageslag van heterosigote. Nageslagpopulasies verhaal vanaf translokasieheterosigote bestaan dan slegs uit bestande plante. Dit is gevolglik nie moontlik om 'n toetspaneel bestaande uit bestande en vatbare plante vanuit die segregerende generasies van 'n kruising saam te stel nie. Die S13-toetspaneel wat gebruik is het daarom die volgende genotipes ingesluit: 'n F₁: (S13 = CS*7/*Ae. speltoides*-691)/W84-17 plant wat die volledige S13 translokasie-segment bevat, sowel as twee verkorte vorms van die translokasie nl. 03M127-4 en 03M127-3A. Die vatbare kontroles Chinese Spring, W84-17 en Thatcher is ook in die paneel ingesluit. Die vier belowende bande is nie in die vatbare kontroles geamplifiseer nie, wat aangedui het dat die spesifieke RAPD-fragmente as diagnostiese merkers vir die S13 translokasie gebruik kan word. Die OPO-2 polimorfisme is in die volledige S13 translokasie en die verkorte vorm, 03M127-4 geamplifiseer maar nie in die tweede verkorte vorm, 03M127-3A nie. Die OPR-16 en OPT-14 polimorfismes is egter in al drie translokasies geamplifiseer. Die vier diagnostiese bandjies (aangedui met pyltjies Figuur 3.3), is elkeen individueel uit die agarose jel geïsoleer en gekloneer (afdeling 2.1.6 tot 2.1.9). Twee positiewe wit *E. coli* kolonies, waarvan die korrekte grootte invoeging bevestig is met 'n kolonie-PKR is gekies vir plasmiedvermeerdering en volgordebepaling van elkeen van die ingevoegde OPO-2, OPR-16 en OPT-14 PKR-fragmente. OPN-15 is nie gekloneer nie, want alhoewel dit verskeie kere herhaalbaar was, het dit nie herhaal toe dit vir klonering geamplifiseer is nie. Dus was net drie van die aanvanklike 18 RAPD-polimorfismes vir S13 bestendige merkers.



Figuur 3.3. RAPD-polimorfismes bevestig vir die S13 translokasie. PCR-produkte is vir 2h op 2 % agarose jels gelektroforeer (1X TBE-buffler) en is toe met EtBr gekleur. Afkortings: L= pGem molekulêre massa merker, S13 = F1: CS*7/*Ae. speltoides*-691/W84-17; CS = Chinese Spring; W = W84-17, T = Thatcher, 03M127-3A = verkorte vorm van die S13 translokasie, 03M127-4 = verkorte vorm van S13 translokasie, -K = Kontrolle (Geen DNS.) A. Die diagnostiese S13-fragment geamplifiseer met RAPD-inleier OPN-15 word met 'n pyltjie aangedui (tussen 1198 bp en 1605 bp). B. Die diagnostiese S13-fragment geamplifiseer met RAPD-inleier OPO-2 word met 'n pyltjie aangedui (1605 bp). C. Die diagnostiese S13-fragment geamplifiseer met RAPD-inleier OPR-16 word met 'n pyltjie aangedui (tussen 1198 bp en 1605 bp). D. Die diagnostiese S13-fragment geamplifiseer met RAPD-inleier OPT-14 word met 'n pyltjie aangedui (tussen 1198 bp en 1605 bp).

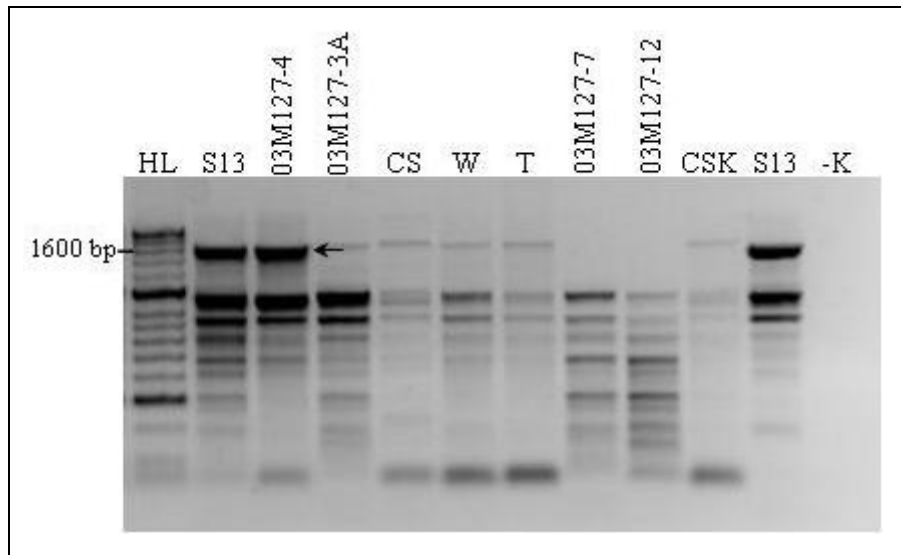
3.2.3.2 SCAR-ontwerp en analise

Die presiese lengte van die gekloneerde OPO-2 RAPD-fragment kon nie met die volgordebepaling vasgestel word nie, waarskynlik weens die grootte van die fragment wat om en by 1600 bp groot was. Proefleesfoute is algemeen by fragmente langer as 1000 bp en volledige, aaneenlopende volgordes word dikwels nie verkry nie. Die volgorde van die fragment is egter van beide ente bepaal om hierdie probleem te oorkom en twee volgordes wat elkeen die oorspronklike RAPD-inleier bindingsetels ingesluit het, is verkry. Laasgenoemde was voldoende vir die ontwerp van langer, meer spesifieke SCAR-inleiers. Daar is nie gepoog om interne inleiers vir die fragment te ontwerp nie. Daar is egter twee pare inleiers ontwerp wat verskillende lengtes van die oorspronklike RAPD-bindingsetels ingesluit het (Tabel 3.4). Die inleiers is vervolgens in verskillende voor-en terugwaartse kombinasies gebruik, waarvan die kombinasie OPO-2R en S13-O2F (Figuur 3.4) diagnostiese bandjies geproduseer het wat in al die negatiewe kontroles afwesig was, maar teenwoordig was in sommige van die plante met die verkorte S13 translokasies. Net soos wat die geval was met die RAPD-polimorfisme (Figuur 3.3B) is bandjies geamplifiseer in S13 en 03M127-4, maar nie in 03M127-3A nie. Twee verdere verkorte translokasies is in hierdie paneel ingesluit, nl 03M127-7 en 03M127-12 wat albei ook negatief vir die merker getoets het (aangesien die lokus in 'n *Ae. speltoides* area val wat tydens verkorting met koringchromatien uitgeruil is). Die geamplifiseerde produk was om en by 1600 bp groot wat ooreengestem het met die grootte van die oorspronklike RAPD-polimorfisme, en wat aandui dat die merker sy spesifisiteit behou het met die omskakeling na 'n SCAR-merker. Hoewel hierdie SCAR-inleierkombinasie nie net 'n enkele bandjie produseer nie, is dit beslis diagnosties vir plante wat die S13 translokasie bevat. Die SCAR-merker se PKR-program is ook veel korter as die van sy RAPD-voorganger (Tabel 2.6 en Tabel 3.4).

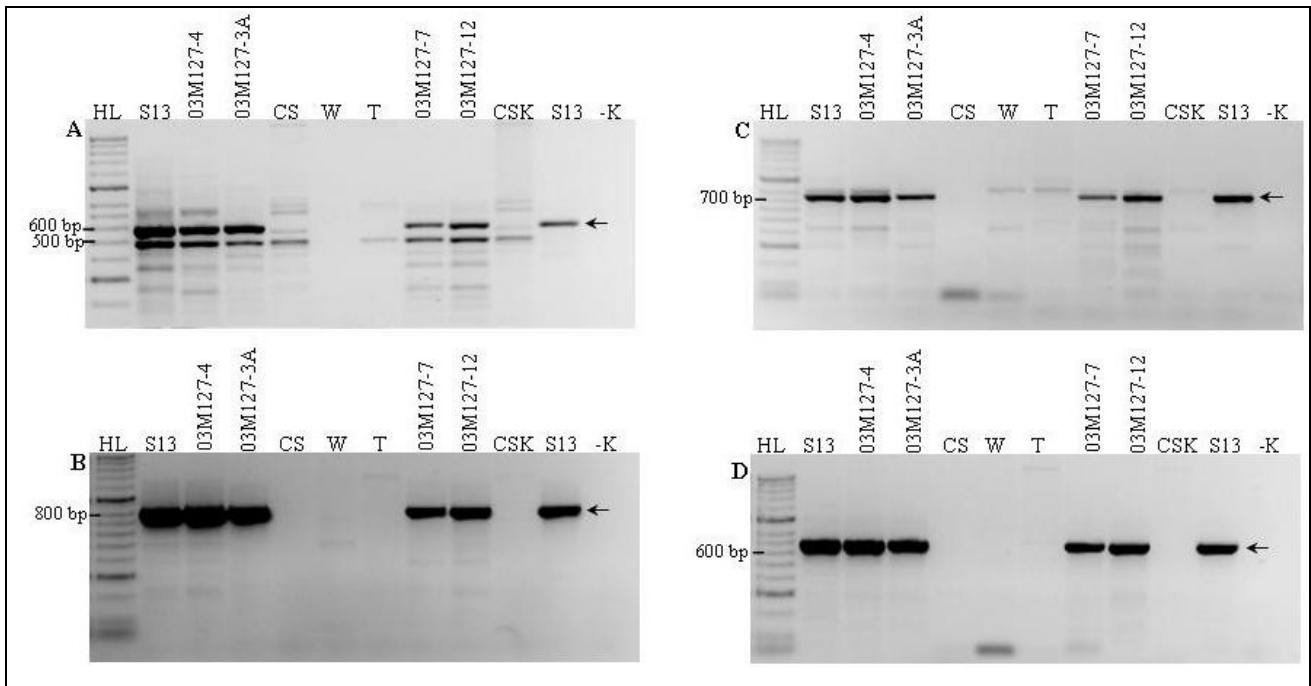
Volgorde analise van die gekloneerde OPR-16 PKR-produk het getoon dat die polimorfiese fragment, wat die oorspronklike RAPD-inleier bindingsetel insluit, se grootte 819 bp is. Die inleierpaar R-16S13F en R-16S13F (Tabel 3.4) is ontwerp deur die oorspronklike RAPD-inleierbindingsetel te verleng om 'n verwagte fragment van 819 bp te amplifiseer. Twee interne inleiers R-16R¹ en R-16F¹ is ook ontwerp in 'n poging om die relatief lang fragment van 819 bp te verkort na om en by 600 bp. Die onderskeie inleierpare ontwerp vanaf die OPR-16 RAPD-fragmentvolgorde is in elke moontlike voor-en terugwaartse kombinasie gebruik in 'n poging om verskeie lengtevariante van die fragment te amplifiseer. Die benadering het geblyk om suksesvol te wees deurdat drie van die kombinasies 'n enkele fragment van verwagte grootte geproduseer het

wat slegs teenwoordig was in plante met die volledige S13 translokasie en dus as diagnostiese bande beskou kan word. Die vierde kombinasie (Figuur 3.5A) wat uit beide die interne inleiers bestaan het, het die verwagte 600 bp grootte bandjie plus 'n addisionele onverwagte 500 bp grootte bandjie geamplifiseer wat ook in Chinese Spring en Chinese Spring kort teenwoordig was. Die verwagte bandjie van 600 bp kan wel as 'n diagnostiese merker vir die S13 translokasie beskou word, omdat dit afwesig is in al die negatiewe kontroles.

Die volgordes verkry vanaf die verskillende diagnostiese OPT-14 fragment-klone het aangedui dat die fragment ongeveer 900 bp lank is. Die volgorde se entpunte, wat noodsaaklik is vir verlenging van die oorspronklike RAPD-inleier bindingsetels, het aan beide ente 'n strekking van ongeveer 150 bp getoon wat verskeie proefleesfoute bevat het. Volgordevergelyking van hierdie 150 bp streek uit die verskillende klone het ook verskeie nukleotied verskille getoon. Verder het dit geblyk dat die entvolgordes van die fragment nie die 10 bp van die OPT-14 RAPD-inleier bevat nie, maar wel die van OPR-14. Hierdie verskynsel is in elke geval opgemerk waar fragmente gegeneer en gekloneer is met gebruik van inleiers uit die OPT en OPR inleierstelle. Dit het dus aangedui dat die inleierstelle van die oorspronklike inleier voorraadoplossings omgeruil is. Om verdere verwarring te voorkom is besluit om die benaming van die potensiële SCAR-merkers te hou by die van die bedoelde, oorspronklike RAPD-merker. Twee interne inleiers nl. T-14F¹ en T-14R¹ is ontwerp wat buite die 150 bp streek van proefleesfoute geleë was. 'n Verdere twee inleiers nl. T/R-14F en T/R-14R is vanaf beide die entpunte van die fragment ontwerp wat die OPR-14 RAPD-inleier volgordes bevat het. Die vier inleiers is in elke voor- en terugwaartse kombinasie gebruik. Hierdie kombinasies het almal soortgelyke resultate gelever deurdat verskeie bande tussen 100 bp tot 1000 bp oor die hele paneel van plante, insluitend die negatiewe kontrole plante, geamplifiseer is. Die profiel was soortgelyk aan 'n RAPD-profiel, maar plante wat die S13 translokasie bevat het kon nie onderskei word nie.



Figuur 3.4. SCAR-merker vir die S13 translokasie wat afgelei is vanaf 'n OPO-2 RAPD diagnostiese merker. L= "Hyperladder II" molekulêre massa merker; S13 = CS*7/*Ae. speltoides*-691/W84-17, CS = Chinese Spring, W = W84-17, T = Thatcher, 03M127-4, 03M127-3A, 03M127-7 en 03M127-12 = verkorte vorms van die S13 translokasie; CSK= Chinese Spring kort; -K = Kontrole (Geen DNS). Die diagnostiese bandjie geamplifiseer met die SCAR-inleierkombinasie OPO-2R en S13-O2F kan waargeneem word regoor die 1600 bp merker. PCR-produkte is vir 2h op 'n 2 % agarose jel ge-elektroforeer (1X TBE-buffer) en met EtBr gekleur.



Figuur 3.5. SCAR-merker(s) afgelei vanaf die 820 bp diagnostiese OPR-16 RAPD-fragment wat spesifiek is vir die S13 translokasie. PCR-produkte is vir 2h op 2 % agarose jels geskei (1X TBE-buffer) en met EtBr gekleur. Afkortings: L= “Hyperladder II” molekulêre massa merker; S13 = F₁: CS*7/*Ae. speltoides*-691/W84-17; CS = Chinese Spring, W = W84-17; T = Thatcher, 03M127-3A, 03M127-4, 03M127-7, 03M127-12 = verkorte vorm van S13 translokasie, CSK= Chinese Spring kort, -K = kontrole met geen DNS. **A.** Die diagnostiese bandjie geamplifiseer met die inleierkombinasie R-16F^I en R-16R^I is die 600 bp grootte fragment. **B.** ’n Enkele duidelike diagnostiese band van 800 bp is deur die inleierpaar R-16S13F en R-16S13R geamplifiseer. **C.** Die R-16F^I en R-16S13R SCAR-inleierkombinasie het ’n diagnostiese fragment van 700 bp geamplifiseer. **D.** Die SCAR-inleierpaar R-16R^I en R-16S13F het ’n enkele 600 bp diagnostiese band met hoë intensiteit geamplifiseer.

3.2.3.3 RGAP-analise

Twaalf RGA-inleierkombinasies (Tabel 2.2) het ’n totaal van 20 potensieel nuttige polimorfismes vir die S13 translokasie-segment opgelewer. Drie van hierdie kombinasies (Pto kin2-RLRR for, Pto kin 2-Pto kin 4 en RLRR for-S2 (Figuur 3.6) het elk ’n bestendige, herhaalbare bandjie opgelewer op die S13 toetspaneel (bestaande uit plante met verskillende lengtes van die translokasie). Hierdie RGAP-merkers kan dus as diagnostiese bandjies dien vir plante wat die S13 translokasie besit. Die diagnostiese bandjies vir die S13 translokasies wat deur die onderskeie RGA-merkers geamplifiseer is (aangedui met pyltjies Figuur 3.6), is elkeen individueel uit die poli-akriëlamied jel geïsoleer en gebruik as templaats vir PCR-amplifisering met die onderskeie RGA-inleiers. Die PCR-produkte van hierdie reaksies is geskei op ’n 2 % agarose jel. Pto kin 2 - RLRR for, sowel as Pto kin 2 - Pto kin 4 het elkeen ’n bandjie geamplifiseer waarvan die grootte ooreengestem het met die oorspronklike RGAP-polimorfisme op die poli-akriëlamied jel. Hierdie

bandjies is vervolgens vanuit die agarose jel geïsoleer en gekloneer (afdeling 2.1.6 tot 2.1.9). Die RLRR for - S2 inleierkombinasie het geen produkte geamplifiseer nie, wat waarskynlik te wyte was aan 'n te lae templaatkonsentrasie. Laasgenoemde is nie verder opgevolg nie. Twee positiewe wit *E. coli* kolonies waarvan die korrekte grootte invoeging bevestig is met 'n kolonie-PKR is gekies vir plasmiedvermeerdering en volgordebepaling van elkeen van die ingevoegde RGAP PKR-fragmente.

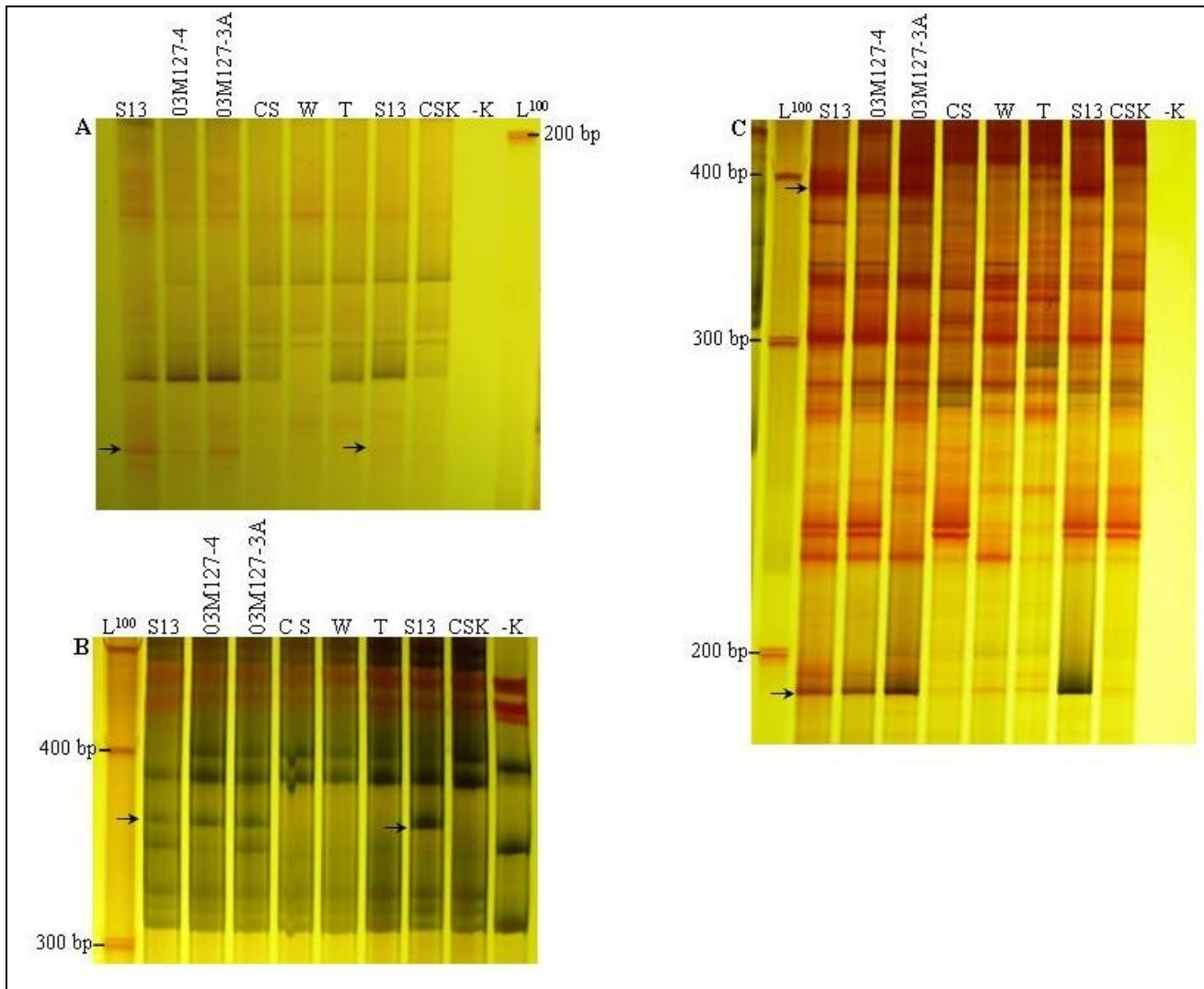
3.2.3.4 SCAR-ontwerp en analise

Volgorde-ontleding van die gekloneerde Pto kin2-Pto kin4 RGAP polimorfiese fragment het getoon dat dit 352 bp groot is (oorspronklike RGA-inleier bindingsetels ingesluit). Inleierstel K24F en K24R is op grond van die volgorde ontwerp. Die twee inleiers het onderskeidelik 2 bp en 7 bp van die oorspronklike RGAP-merkers ingesluit. PKR-amplifisering met hierdie inleiers het 'n enkele fragment van om en by 300 bp opgelewer (soos verwag), maar wat ongelukkig in beide vatbare en bestande plante teenwoordig was (Figuur 3.7). Daar is verder gepoog om die nuut-ontwerpte inleiers in kombinasie met die oorspronklike RGA-inleiers te gebruik. Hierdie kombinasies het verskeie bande van verskillende groottes, regoor die S13 toetspaneel geamplifiseer, maar geen bande kon geïdentifiseer word wat as diagnosties vir die S13 translokasie sou kon dien nie. Talle pogings is aangewend om die spesifisiteit van die PKR-reaksie te verhoog deur verskillende $MgCl_2$, en inleierkonsentrasies te gebruik, sowel as om die aanhegtingstemperatuur van die inleiers te verhoog. Hierdie benaderings het egter nie 'n noemenswaardige verskil gemaak aan die resultate nie en 'n diagnostiese SCAR-merker kon nie vanaf hierdie fragment verkry word nie.

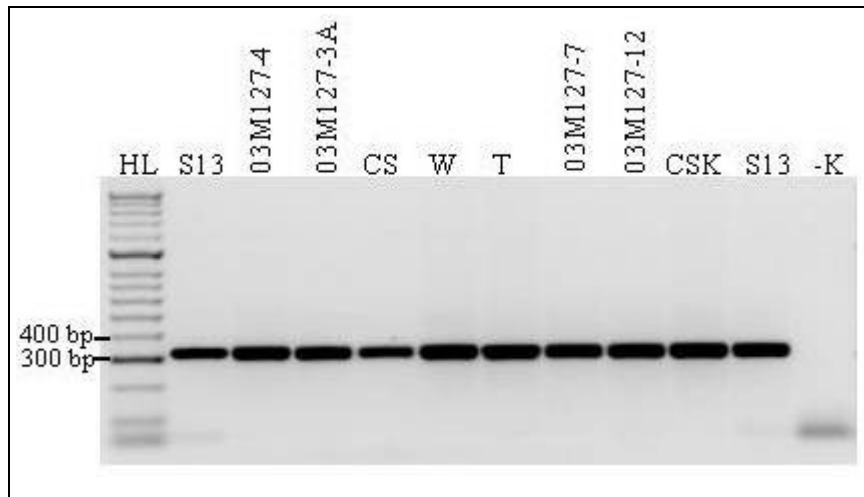
Die diagnostiese S13 fragment wat met die Pto kin 2 - RLRR for inleierkombinasie geamplifiseer is, is gekloneer en twee verskillende nukleotiedvolgordes is vanaf verskillende klone verkry. Die volgordes van onderskeidelik 117 bp en 136 bp in lengte het beide die volledige RGA-inleierbindingsetels ingesluit. In Figuur 3.6A kan gesien word dat daar 'n dowwer bandjie net onder die diagnostiese RGAP-bandjie teenwoordig is. Alhoewel sorg getref is met die uitsny van die fragment is die twee fragmente moontlik saam uitgesny. Die grootte verskil kon nie na her-amplifisering en skeiding van die fragmente op die agarose jel waargeneem word nie, en daar is aangeneem dat 'n enkele bandjie in plaas van 'n moontlike 2 nabygeleë bande uit die agarose jel geïsoleer is. 'n Stel inleiers is vanaf elkeen van die volgordes ontwerp (Tabel 3.4). Daar is gepoog om inleiers intern tot die oorspronklike RGA-inleier bindingsetels te vind en wel in areas

waar die twee fragmentvolgordes grootliks van mekaar verskil het. Intern-geplaasde inleiers het die voordeel dat hulle ook in kombinasie met die oorspronklike RGA-inleiers getoets kan word. Slegs die inleierkombinasie K2RF-2 en K2RFR-2^I het 'n bandjie geamplifiseer (van die verwagte 100 bp grootte). Plante wat die S13 tranlokasie bevat het kon egter nie van die vatbare kontroles onderskei word nie, wat beteken dat 'n SCAR-merker nie vanaf die RGAP-polimorfisme herwin kon word nie. Verskeie pogings om die reaksie te optimiseer en die spesifisiteit van die reaksie te verhoog het gefaal.

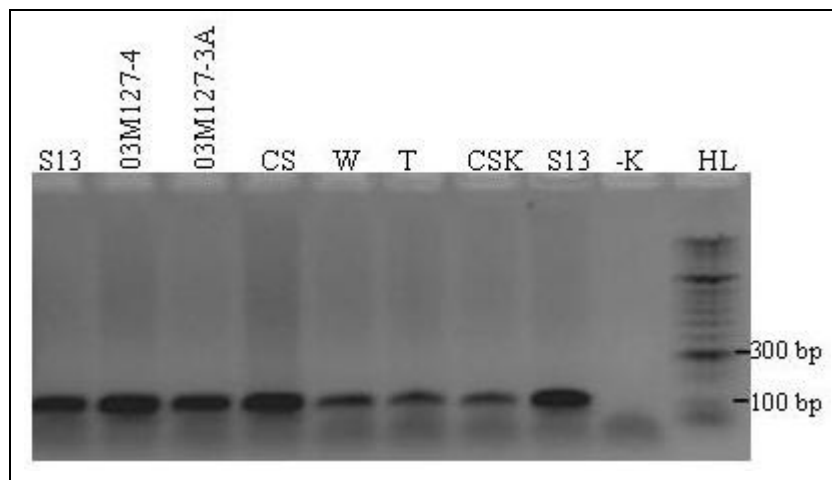
Om beide merkers (K24F en K24R; K2RF-2-K2RFR-2^I) verder op te volg sal die reaksies herhaal moet word en die enkelbandjies wat verkry word vanaf plante met en sonder die S13 translokasie, individueel geïsoleer en gekloneer moet word. Sodoende kan die volgordes met mekaar vergelyk word om die volgordeooreenkomste te bepaal, waarvandaan daar dan gepoog kan word om meer spesifieke inleierpare te ontwerp. RGA-inleiers teiken gekonserveerde domeine wat in assosiasie met weerstandsgene voorkom en waarvan daar skynbaar talle in plantgenome voorkom. Boonop kan verwag word dat daar homoeo-domeine in die drie koringgenome sal voorkom. In hierdie studie het dit dan ook geblyk dat RGA-inleiers dikwels komplekse profiele genereer waarvan veral die minder prominente bande dikwels nie goed herhaalbaar is nie. Dit is dus waarskynlik dat die ontwerpte inleiers verwante volgordes in verskillende genome amplifiseer. Ten einde in sulke gevalle unieke merkers te ontwerp sou dit nodig wees om elkeen van die variante (bv. homoeo-volgordes uit die *Ae. speltoides*, A-, B- en D-genome) individueel te kloneer, hul volgordes te vergelyk en spesifieke inleiers te ontwerp. Dit sal egter baie moeilik wees om fragmente met dieselfde groottes, maar afkomstig van die onderskeie genome, in koring te isoleer.



Figuur 3.6. RGAP-polimorfismes bevestig vir die S13 translokasie. PCR-produkte is geëlektroforeer op 'n 6 % PAA jel in 1X TBE-buffer en gekleur met silwerkleuring. Die afkortings is van toepassing op elkeen van die fotos A, B en C. L¹⁰⁰ = 100 bp molekulêre massa merker (Promega), S13 = CS*7/*Ae. speltoides*-691/W84-17, CS = Chinese Spring, W = W84-17, T = Thatcher, 03M127-3A, 03M127-4 = verkorte vorm van S13 translokasie, -K = Kontrole (Geen DNS). **A.** Die diagnostiese S13 fragment geamplifiseer met die RGA-inleierpaar Ptokin 2-RLRR for word met die pyltjie aangedui onder die 200 bp molekulêre merker. **B.** Die diagnostiese S13 fragment geamplifiseer met die RGA-inleierpaar RLRR for -S2 word aangedui met die pyltjie tussen 300 bp en 400 bp van die 100 bp-merker. **C.** Die twee diagnostiese S13 fragmente geamplifiseer met die RGA-inleierpaar Pto kin 2-Pto kin 4 word onderskeidelik aangedui met pyltjies (tussen 400 bp en 300 bp, en net onder 200 bp).



Figuur 3.7. Die PKR-profiel gegeneer met die inleierstel K24 wat ontwerp is vanaf die diagnostiese S13 RGA Pto kin 2-Pto kin4 fragment. PKR-produkte is vir 2h op 2 % agarose jels geskei (1X TBE-buffer) en met EtBr gekleur. Afkortngs: L= “Hyperladder II” molekulêre massa merker; S13 = F₁: CS*7/*Ae. speltoides*-691/W84-17; CS = Chinese Spring; W = W84-17; T = Thatcher; 03M127-3A, 03M127-4, 03M127-7, 03M127-12 = verkorte vorm van S13 translokasie, CSK= Chinese Spring kort, -K = kontrole met geen DNS. ’n Enkele band van hoë intensiteit van om en by 300 bp is in elkeen van die genotipes geamplifiseer.



Figuur 3.8. Die PKR-profiel gegeneer met die inleiers K2RF-2 en K2RFR-2¹. PKR-produkte is vir 2h op 2 % agarose jels geskei (1X TBE-buffer) en met EtBr gekleur. Afkortngs: L= “Hyperladder II” molekulêre massa merker; S13 = F₁: CS*7/*Ae. speltoides*-691/W84-17; CS = Chinese Spring; W = W84-17; T = Thatcher; 03M127-3A, 03M127-4, = verkorte vorm van S13 translokasie, CSK= Chinese Spring kort, -K = kontrole met geen DNS. ’n Enkele band van 100 bp is in elkeen van die genotipes geamplifiseer.

Tabel 3.4. Diagnostiese PKR-merkers ontwikkel vir die S13 translokasie. Onderstreepte gedeeltes verteenwoordig die oorspronklike RAPD/RGA-inleierbindingsetels. Klein, kursief gedrukte volgordes verteenwoordig inleiers wat op hul eie en/of in kombinasie met die ander merkerpare gebruik is, maar nie 'n diagnostiese band opgelewer het nie. I = Inleiers wat intern tot die oorspronklike RAPD-bindingsetels ontwerp is.

Inleier	Naam	Nukleotiedvolgorde van inleier 5'-3'	Grootte van amplikon	T _A °C	PKR-program ¹	PKR-mengsel ²
RAPD	OPN-15	CAGCGACTGT	1500 bp	36	1	A
RAPD	OPO-2	ACGTAGCGTC	1600 bp	36	1	A
SCAR	OPO-2R	<u>TCGCATTACCAGTAGTGCCGC</u>	1600 bp	58	2	B
	S13-O2F	<u>ACGTAGCGTCCATGGGGATG</u>				
	<i>OPO-2F</i>	<i><u>GTCCATGGGGATGATCATAGG</u></i>				
	<i>S13-O2R</i>	<i><u>GTAGCGTCCGCATTACCAGTAG</u></i>				
RAPD	OPR-16	CTCTGCGCGT	819 bp	43	1	A
	(OPT-16)*	GGTGAACGCT		37		
SCAR	R-16R ¹	CAACCTGGGAAGATGCTGAG	605 bp	58	2	B
	R-16F ¹	CACAGGGTGGTTTTGCACG				
SCAR	R-16S13R	<u>GGTGAACGCTGATGGCACTAT</u>	819 bp	58	2	B
	R-16S13F	<u>GGTGAACGCTAAACCCAGGTAACC</u>				
SCAR	R-16F ¹	CACAGGGTGGTTTTGCACG	730 bp	58	2	B
	R-16S13F	<u>GGTGAACGCTAAACCCAGGTAACC</u>				
SCAR	R-16R ¹	CAACCTGGGAAGATGCTGAG	695 bp	58	2	B
	R-16S13F	<u>GGTGAACGCTAAACCCAGGTAACC</u>				

¹ PKR-program soos beskryf in Tabel 2.5 (Materiaal en Metodes)

² PKR-reaksiemengsel soos beskryf in Tabel 2.6 (Materiaal en Metodes)

* Volgorde analise van die gekloneerde diagnostiese S13 fragment wat met die OPR-16 en OPT-14 RAPD-merker geamplifiseer is, het aangetoon dat dit onderskeidelik eintlik die OPT-16 en OPR-14 (vetgedruk) RAPD inleier se volgorde is. Die OPR-16 en OPT-14 kode is egter gebruik vir benaming van die SCAR-merker om verdere verwarring te voorkom.

Tabel 3.4. vervolg. Diagnostiese PCR-merkers ontwikkel vir die S13 translokasie. Onderstreepte gedeeltes verteenwoordig die oorspronklike RAPD/RGA-inleierbindingsetels. Klein, kursief gedrukte volgordes verteenwoordig inleiers wat op hul eie en/of in kombinasie met die ander merkerpare gebruik is, maar nie 'n diagnostiese band opgelewer het nie. I = Inleiers wat intern tot die oorspronklike RAPD-bindingsetels ontwerp is.

Inleier	Naam	Nukleotiedvolgorde van inleier 5'-3'	Grootte van amplicon	TA °C	PKR-program ¹	PKR-mengsel ²
RAPD	OPT-14	AATGCCGCAG	920 bp	38	1	A
	(OPR-14)*	CAGGATTCCC		32		
	<i>T-14R^I</i>	<i>ACTTATGTCAGTAGTGTGC</i>				
	<i>T-14F^I</i>	<i>GTAACATAGAGGCATACG</i>				
	<i>T/R-14F</i>	<i>CAGGATTCCCCCAAAGGATGG</i>				
	<i>T/R-14R</i>	<i>CAGGATTCCCGGGGTTACTGTGG</i>				
RGAP	Pto kin 2	AGGGGGACCACCACGTAG*	352	45	2	B
	Pto kin 4	AGTGTCTTGTAGGGTATC•				
	<i>K24F</i>	<i>AGGGCAAAAATGACAAATCTGACC*</i>	343	58	5	C
	<i>K24R</i>	<i>GGGTATCTAGATTCATATACGCTATG•</i>				
RGAP	Pto kin 2	AGGGGGACCACCACGTAG	140	45	2	B
	RLRR for	CGCAACCACTAGAGTAAC				
	<i>K2RF-1</i>	<i>TAGGGTACTGTAATGAGCTCATTCC</i>				
	<i>K2RF-2</i>	<i>TAGCATTTCCTCAAGGAGAACC</i>				
	<i>K2RFR-1I</i>	<i>ACGAATACAATAATAGTTGAGACG</i>				
	<i>K2RFR-2I</i>	<i>AGAGCTTGATGAAGTTCCTAAAAGC</i>				

¹ PCR-program soos beskryf in Tabel 2.5 (Materiaal en Metodes)

² PCR-reaksiemengsel soos beskryf in Tabel 2.6 (Materiaal en Metodes)

* Volgorde analise van die gekloneerde diagnostiese S13 fragment wat met die OPR-16 en OPT-14 RAPD-merker geamplifiseer is, het aangetoon dat dit onderskeidelik eintlik die OPT-16 en OPR-14 (vetgedruk) RAPD-inleier se volgorde is. Die OPR-16 en OPT-14 kode is egter gebruik vir benaming van die SCAR-merker om verdere verwarring te voorkom.

3.2.4 Die *Aegilops kotschy* translokasie (S14)

3.2.4.1 RAPD-analise

RAPD-analise met die 230 inleiers het 15 potensieel nuttige polimorfismes vir hierdie translokasie geïdentifiseer (Tabel 3.1). Geeneen van die polimorfismes kon egter herhaal of bevestig word op 'n paneel van segregerende vatbare en bestande plante van die TK_2F_1 : 03M130/Thatcher nie. Omdat elke moontlike polimorfisme nagevolg is, ongeag die intensiteit van die bandjies, was die lae herhaalbaarheid te wagte.

3.2.4.2 RGAP-analise

Vyf van die 21 RGA-inleierkombinasies (Tabel 3.2) het 'n totaal van 12 potensieel nuttige polimorfismes geamplifiseer vir die S14 translokasie. Geeneen van hierdie merkers kon egter herhaal word op die TK_2F_1 : 03M130/Thatcher populasie van vatbare en bestande plante nie.

3.2.5 Die *Aegilops peregrina* translokasie (S15)

3.2.5.1 RAPD-analise

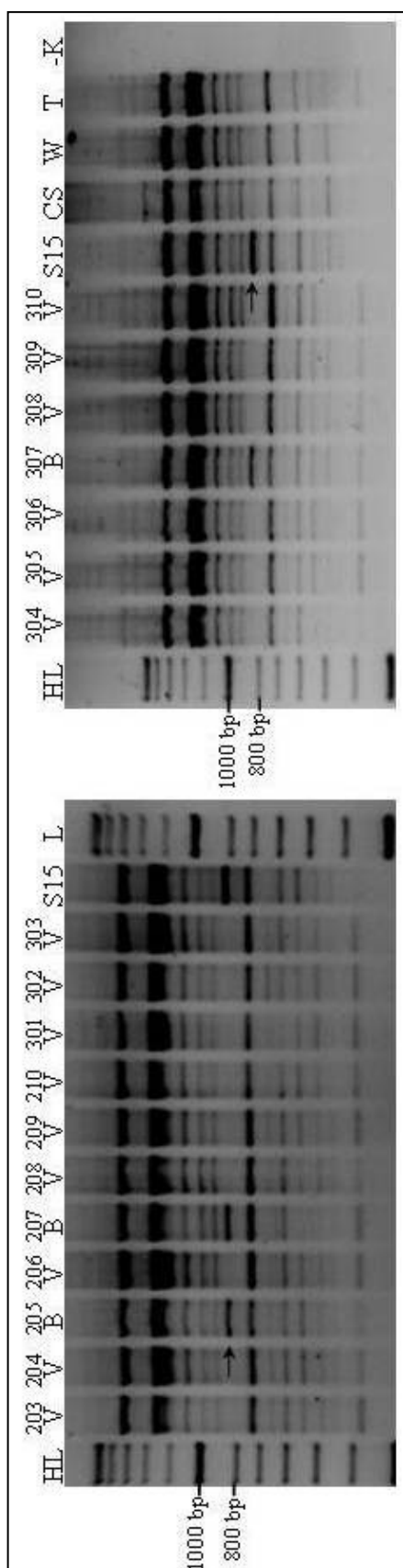
Vyf van die 230 RAPD inleiers het elkeen 'n potensieel nuttige polimorfisme vir die S15 translokasie geamplifiseer. Slegs een van hierdie merkers, OPT-3, het 'n herhaalbare fragment van om en by 850 bp geamplifiseer in bestande plante van die TK_2F_1 :0516/3*Thatcher populasie (Figuur 3.9). Hierdie fragment was afwesig in vatbare plante van dieselfde populasie, sowel as in die vatbare kontroles CS, W84-17 en Thatcher (wat as terugkruisingsouers gedien het). Die fragment kan dus beskou word as diagnosties vir plante wat die S15 translokasie bevat. Die betrokke fragment (aangedui met die pyltjie Figuur 3.9) is uitgesny uit die agarose jel en gekloneer (afdeling 2.1.6 tot 2.1.9). Twee positiewe wit *E. coli* kolonies waarvan die korrekte grootte invoeging bevestig is met 'n kolonie-PKR, is gekies vir plasmiedvermeerdering en volgordebepaling.

3.2.5.2 SCAR-ontwerp en analise

Volgorde ontleding van die gekloneerde OPT-3 PKR-produk het getoon dat die polimorfiese fragment (wat die oorspronklike RAPD-inleier bindingsetel insluit) se grootte 853 bp is. Die inleierpaar S15-R en S15-F is ontwerp deur die oorspronklike RAPD-inleierbindingsetel te verleng (Tabel 3.6) om 'n verwagte fragment van 853 bp te amplifiseer. Nog 'n inleier S15-T3F^I, is intern van die S15-F bindingsetel ontwerp. Twee verdere inleiers, S15-T3R^I en S15-T3RB^I (wat slegs ten opsigte van die tweede laaste basispaar verskil het) is intern van die S15-R bindingsetel ontwerp (twee verskillende klone van die OPT-3 fragment het slegs op hierdie posisie verskil in volgorde). Die onderskeie OPT-3 inleierpare is in elke moontlike voor- en terugwaartse kombinasie gebruik in 'n poging om verskeie lengtevariante van 'n duidelike diagnostiese fragment te amplifiseer. Indien sodanige verskillende lengtevariante geamplifiseer sou word, kan die merker wat die maklikste sal inskakel by 'n multipleks reaksie vir die gelyktydige sifting saam met ander gene gekies word. Die S15-F en S15-R inleierkombinasie het die verwagte 853 bp fragment geamplifiseer, en slegs in bestande plante van die TK₂F₁:0516/3*Thatcher populasie. Die fragment was egter afwesig in die F₁ : 0516 = CS*2/*Ae. peregrina*-680//10*W84-17 plant waarin die oorspronklike OPT-3 RAPD polimorfisme geïdentifiseer is (data nie getoon nie). Dieselfde resultaat is verkry met die S15-F en S15-T3RB^I, sowel as die S15-F en S15-T3R^I inleierkombinasies (data nie getoon nie). Die S15-T3F^I inleier het egter met beide die S15-T3R^I en S15-T3RB^I inleiers 'n bestendige band (622 bp) van hoë intensiteit in bestande plante van die TK₂F₁:0516/3*Thatcher populasie geamplifiseer (Figure 3.10 en 3.11). Die band was ook teenwoordig in die S15 F₁ : 0516 = CS*2/*Ae. peregrina*-680//10*W84-17 plant sowel as die oorspronklike donor spesie *Ae. peregrina* (Figure 3.10 en 3.11). Die polimorfiese fragment was afwesig in PKR-profiel van alle vatbare plante van dieselfde populasie, insluitend die CS, W84-17 en Thatcher kontrole plante. Die inleiers het dieselfde resultate gelever op verdere S15 terugkuisingspopulasies wat die F₂: 05M26, F₂: 05M67 en F₂: 06M15 ingesluit het. Die inleierkombinasies van S15-T3F^I en S15-T3R^I sowel as S15-T3RB^I kan dus gebruik word om diagnostiese fragmente van plante wat die S15 translokasie fragment bevat te amplifiseer.

3.2.5.3 RGAP-analise

RGAP-analise het 'n totaal van 10 potensieel nuttige S15 polimorfismes (Tabel 3.2) opgelewer met vyf van die inleierkombinasies. Geeneen van hierdie merkers kon egter bevestig word op die toetspaneel van vatbare en bestande plante uit die TK₂F₁:0516/3*Thatcher populasie nie.



Figuur 3.9. Bevestiging van die spesifisiteit van 'n RAPD (OPT-3)-polimorfisme geassosieer met die S15 translokasiefragment. PKR-produkte is ge-elektroforeer op 2 % agarose jels vir 2h (100 mV in 1X TBE buffer), gekleur met EtBr en gevisualiseer onder UV-lig. Die RAPD DNS-profiel verteenwoordig bestande (B) en vatbare (V) plante uit die TK₂F₁: 06M15 = 0516/3*Thatcher populasie (genommer 203-310), die S15 introgressie sowel as die vatbare kontroles Chinese Spring (C), W84-17 (W) en Thatcher (T). Die herhaalbare polimorfiese fragment (tussen 800-1000 bp groot) word met pyltjies aangedui. Die eerste laan bevat “Hyperladder” (HL) molekuleêre massa merker, terwyl die laaste laan geen DNS bevat nie en aandui dat die reaksie vry was van kontaminasie.

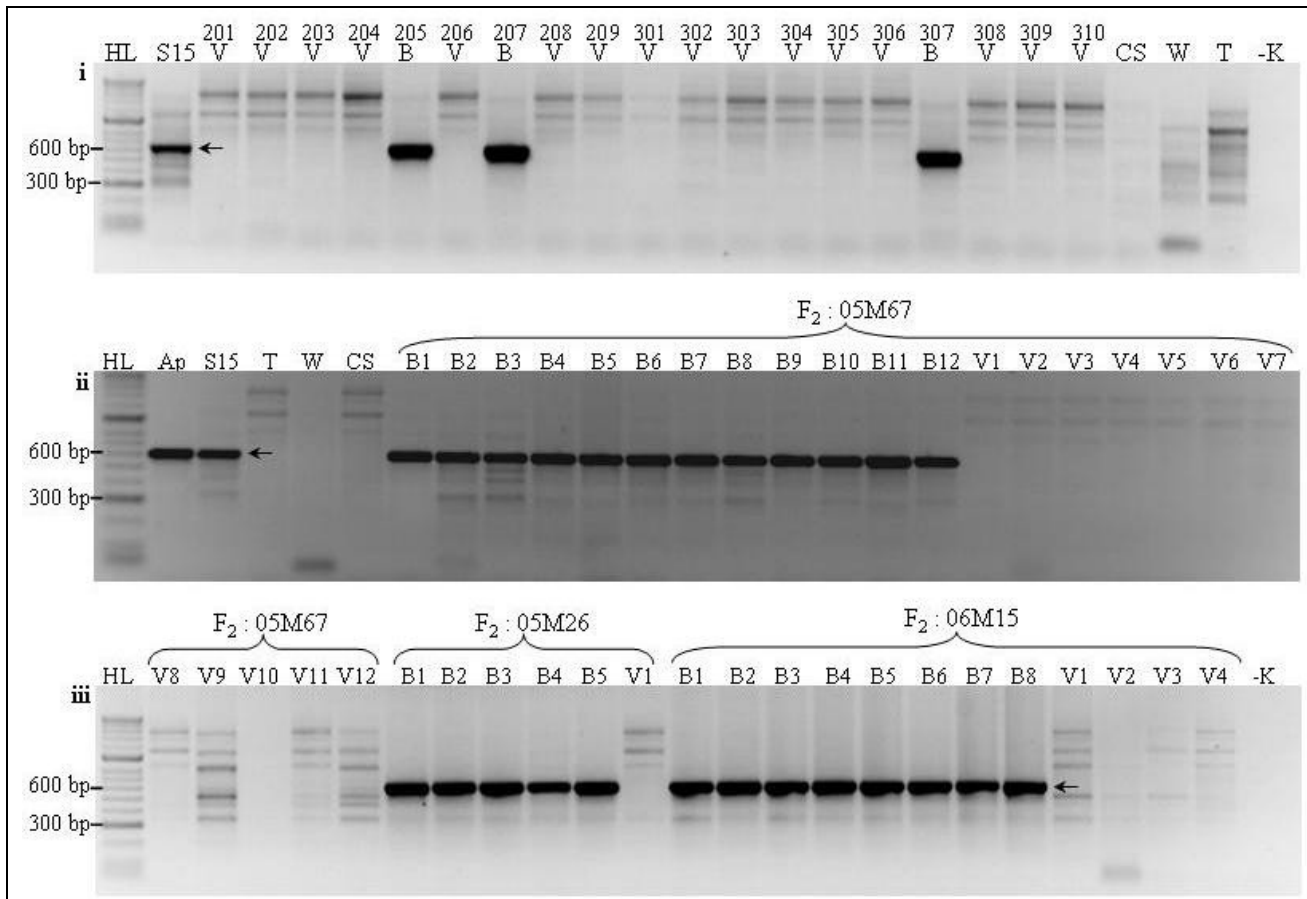
Tabel 3.6. PCR-merkers ontwikkel vir die S15 translokasiesegment. I = interne inleiers. Onderstreepte gedeeltes verteenwoordig die oorspronklike RAPD-inleierbindingsetels. Klein, kursief gedrukte volgordes verteenwoordig inleiers wat op hul eie, en in kombinasie met die ander merkerpare gebruik is, maar nie 'n diagnostiese band opgelewer het nie.

Inleier	Naam	Nukleotiedvolgorde van inleier 5'-3'	Grootte van amplikon	T _A °C	PKR-program ¹	PKR-mengsel ²
RAPD	OPT-3	TCCACTCCTG	850 bp	34	1	A
	(OPR-3)*	ACACAGAGGG		34		
SCAR	S15-T3F ¹	GTCACCTTGCTTGAATTTAATG	622 bp	52	2	B
	S15-T3R ¹	TCCATAGCTGGTAGCTAGATG				
SCAR	S15-T3F ¹	GTCACCTTGCTTGAATTTAATG	622 bp	52	2	B
	S15-T3RB ¹	TCCATAGCTGGTAGCTAGACG				
	<i>S15-F</i>	<u>ACACAGAGGGAAATAAGAATAC</u>				
	<i>S15-R</i>	<u>ACACAGAGGGCTTCTACATCA</u>				

¹ PKR-program soos beskryf in Tabel 2.5 (Materiaal en Metodes)

² PKR-reaksiemengsel soos beskryf in Tabel 2.6 (Materiaal en Metodes)

* Volgorde analise van die gekloneerde diagnostiese S15 fragment wat met die OPT-3 RAPD-merker geamplifiseer is, het aangetoon dat dit eintlik die OPR-3 (vetgedruk) RAPD-inleier se volgorde is. Die OPT-3 kode is egter gebruik vir benaming van die SCAR-merker om verdere verwarring te voorkom.



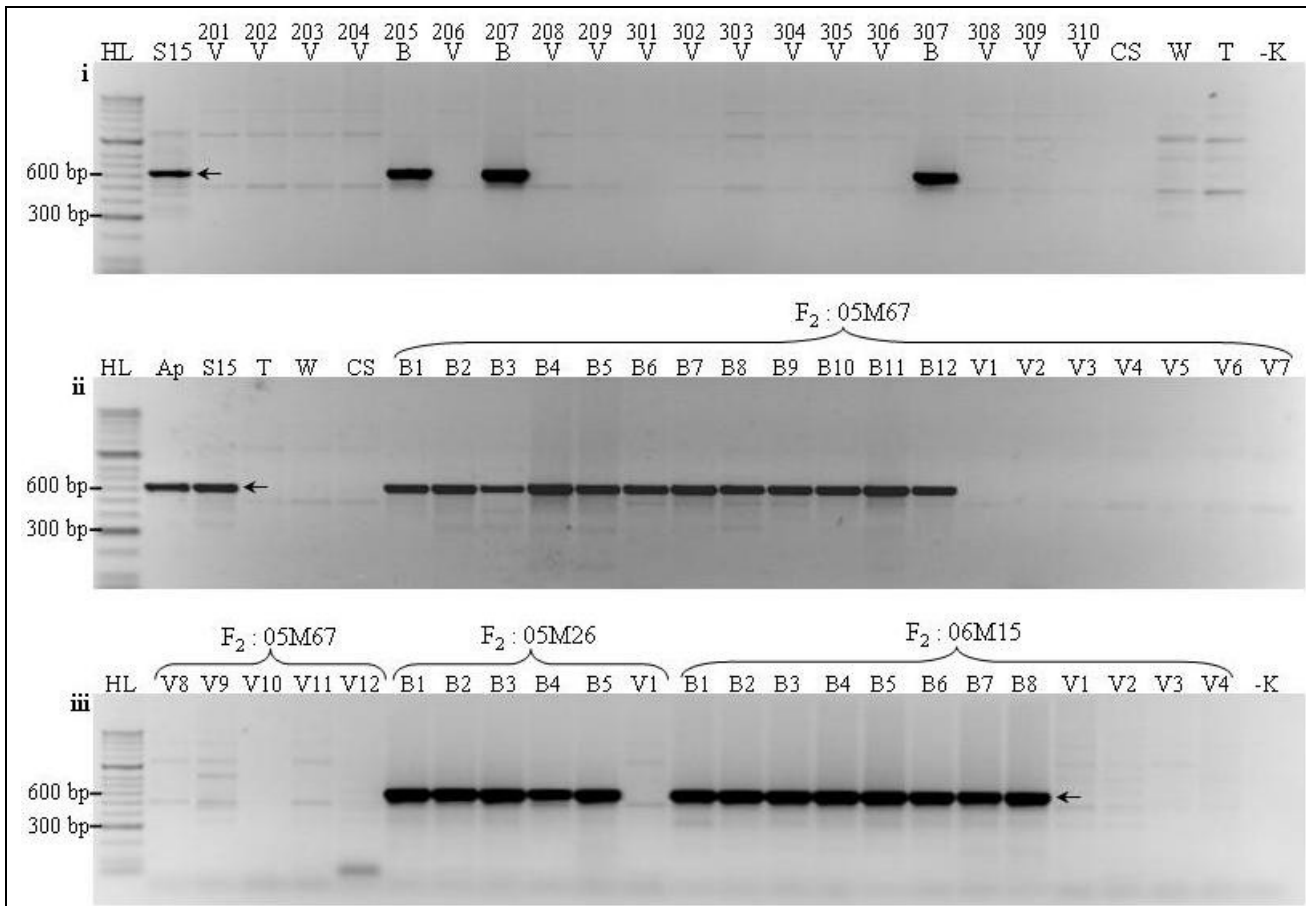
Figuur 3.10. SCAR-analise van verskeie S15 terugkruisingspopulasies met die inleierpaar S15-T3F¹.

i) 201 tot 310 = vatbare (V) en bestande (B) plante van die TK₂F₁:0516/3*Thatcher.

ii) F₂ 05M67 segregate B1 - B12 (bestand) en V1 – V7 (vatbaar).

iii) F₂ 05M67 segregate V8 –V12 (vatbaar); F₂ 05M26 segregate B1-B5 (bestand) en V1 (vatbaar); F₂ 06M15 segregate B1 – B8 (bestand) en V1 - V4 (vatbaar). L= “Hyperladder II”, CS=Chinese Spring, W=W84-17, T=Thatcher. Ap=*Aegilops peregrina*.

Stambome: 0516 = CS*2/*Ae. peregrina*-680//10*W84-17, 05M67 = 0516/2*Thatcher; 05M26 = 0516/Thatcher; 06M15 = 0516/3*Thatcher.



Figuur 3.11. SCAR-analise van verskeie S15 terugkruisingspopulasies met die inleierpaar S15-T3F¹ S15-T3RB¹.

i) 201 tot 310 = vatbare (V) en bestande (B) plante van die TK₂F₁:0516/3*Thatcher.

ii) F₂ 05M67 segregate B1 - B12 (bestand) en V1 - V7 (vatbaar).

iii) F₂ 05M67 segregate V8 -V12 (vatbaar); F₂ 05M26 segregate B1-B5 (bestand) en V1 (vatbaar); F₂ 06M15 segregate B1 - B8 (bestand) en V1 - V4 (vatbaar). L= "Hyperladder II", CS=Chinese Spring, W=W84-17, T=Thatcher. Ap=*Aegilops peregrina*.

Stambome: 0516 = CS*2/*Ae. peregrina*-680//10*W84-17, 05M67 = 0516/2*Thatcher; 05M26 = 0516/Thatcher; 06M15 = 0516/3*Thatcher.

3.2.6 Die *Aegilops biuncialis* translokasie (Smac).

3.2.6.1 RAPD-analise

Van die 230 RAPD-inleiers wat getoets is, het 17 potensieel nuttige polimorfismes vir die Smac translokasie opgelewer. Die toetspaneel het bestaan uit agt gewone koring teellyne met diverse spesie-verhaalde weerstandsgene plus die vatbare kontroles; Chinese Spring, W84-17 en Thatcher. Die inleiers wat die potensieële merkerfragmente geamplifiseer het is vervolgens getoets teen 'n paneel van veertien vatbare en weerstandbiedende segregerende plante uit die terugkruisings-F₁: 03M107/Thatcher, om te bepaal of die polimorfisme herhaalbaar was en altyd saam met die

weerstand segregeer het. Geeneen van hierdie merkers het 'n herhaalbare polimorfisme geamplifiseer nie en die vatbare en bestande plante kon nie van mekaar onderskei word nie. 'n Bestendige RAPD-polimorfisme kon dus nie vir die Smac translokasie opgespoor word nie.

3.2.6.2 RGAP-analise

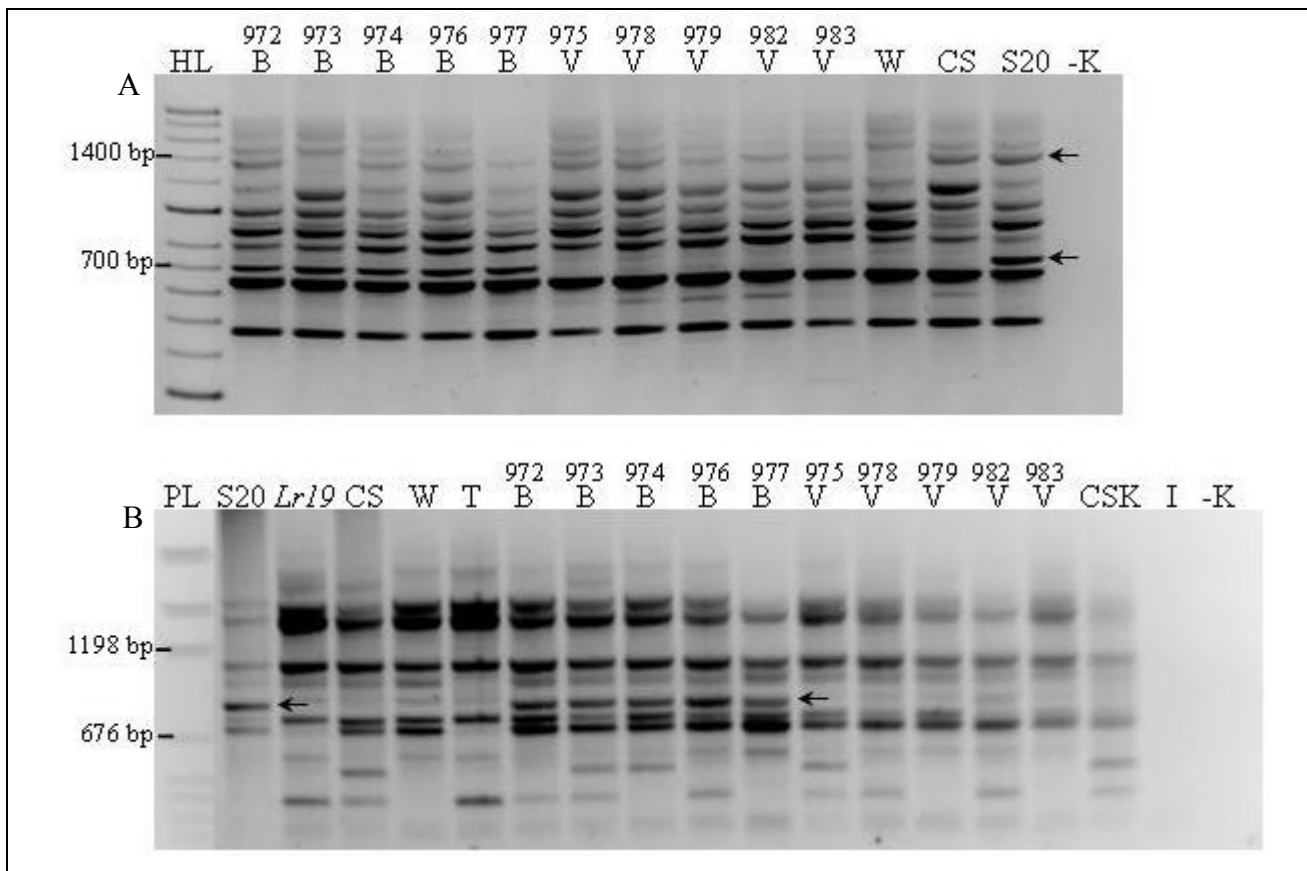
Drie van die RGA inleierkombinasies (Tabel 2) het 'n totaal van vyf potensieel nuttige RGAP-polimorfismes geïdentifiseer. Geeneen van hierdie polimorfismes kon egter herhaal word op die F₁:03M107/Thatcher paneel van vatbare en bestande plante nie.

3.2.7 Die *Aegilops neglecta* translokasie (S20)

3.2.7.1 RAPD-analise

Van die 230 RAPD-inleiers het 11 potensieel nuttige polimorfismes vir die S20 translokasie geamplifiseer. Twee van hierdie inleiers, OPW-7 en OPO-7, het duidelike fragmente geamplifiseer in bestande plante van die TK₁F₁: 03M119-71A/2*Thatcher populasie (Figuur 3.12A en 3.12B). Hierdie fragmente was afwesig in vatbare plante van dieselfde populasie sowel as in die terugkruisingsouer plante CS, W84-17 en Thatcher. Die twee RAPD-inleiers kon dus oënskynlik gebruik word om diagnostiese bande te amplifiseer in plante wat die S20-translokasie bevat (Figuur 3.12A en 3.12B). Die OPW-7 resultaat was egter nie herhaalbaar in daaropvolgende ontledings van 'n F₁ : 06M84-populasie nie. Die fragment wat aanvanklik geïdentifiseer is as polimorfisme vir S20 en geamplifiseer is met OPW-7 was om en by 1400 bp groot (Figuur 4.25). Hierdie fragment was wel herhaalbaar in die S20 translokasie-lyn (Figuur 3.12A) maar het ook 'n fragment in Chinese Spring geamplifiseer wat nie die geval was met die aanvanklike RAPD-reaksie nie. Die fragment het verder ook nie konsekwent slegs in bestande plante geamplifiseer nie. 'n Duidelike band van ongeveer 700 bp is egter in dieselfde profiele waargeneem wat wel slegs in bestande plante van die F₁: 06M84 (= CS/03M119//W84-17) en die S20-translokasielyn aanwesig was. Hierdie fragment was afwesig in al die vatbare plante van dieselfde populasie sowel as in die gewone koringlyne CS, Thatcher en W84-17. Alhoewel hierdie fragment in die S8-introgressie, sowel as die S12-, S14-, S15-, S19- en S20-translokasies geamplifiseer het in die OPW-7 RAPD-reaksie (Figure 4.25 en 3.13A), en nie aanvanklik as 'n polimorfisme vir S20 onderskei kon word nie, het toetsing op die S20 segregerende paneel aangedui dat hierdie fragment wel 'n nuttige merker kan wees. Die twee teikenfragmente vir OPW-7 en OPO-7 is daarom

afsonderlik uit die agarose jels gesuiwer en gekloneer (afdelings 2.1.6 tot 2.1.9) vir moontlike omskakeling na meer herhaalbare SCAR-merkers.



Figuur 3.12. RAPD-polimorfismes geamplifiseer vir die S20 translokasiëfragment. Die genotipe-profiel het bestaan uit bestande (B) (972, 973, 974, 976, 976) en vatbare (V) (975, 978, 979, 982, 983) plante uit die F_1 06M84 (= CS/03M119//W84-17); die S20 translokasiëlyn (03M119-71 (= CSDM3B-5B//CS*5/*Ae. neglecta*-155/3/W84-17), sowel as die vatbare kontroles Chinese Spring (C), W84-17 (W), Thatcher (T), Chinese Spring kort (CSK) en Inia 66 (I). **A.** PCR-produkte en diagnostiese band (pyltjies) geamplifiseer met RAPD-inleier OPW-7. HL = “Hyperladder II” molekuleêre massa merker **B.** PCR-produkte en diagnostiese band (pyltjies) geamplifiseer met RAPD-inleier OPO-7. PL = pGem molekuleêre grootte merker.

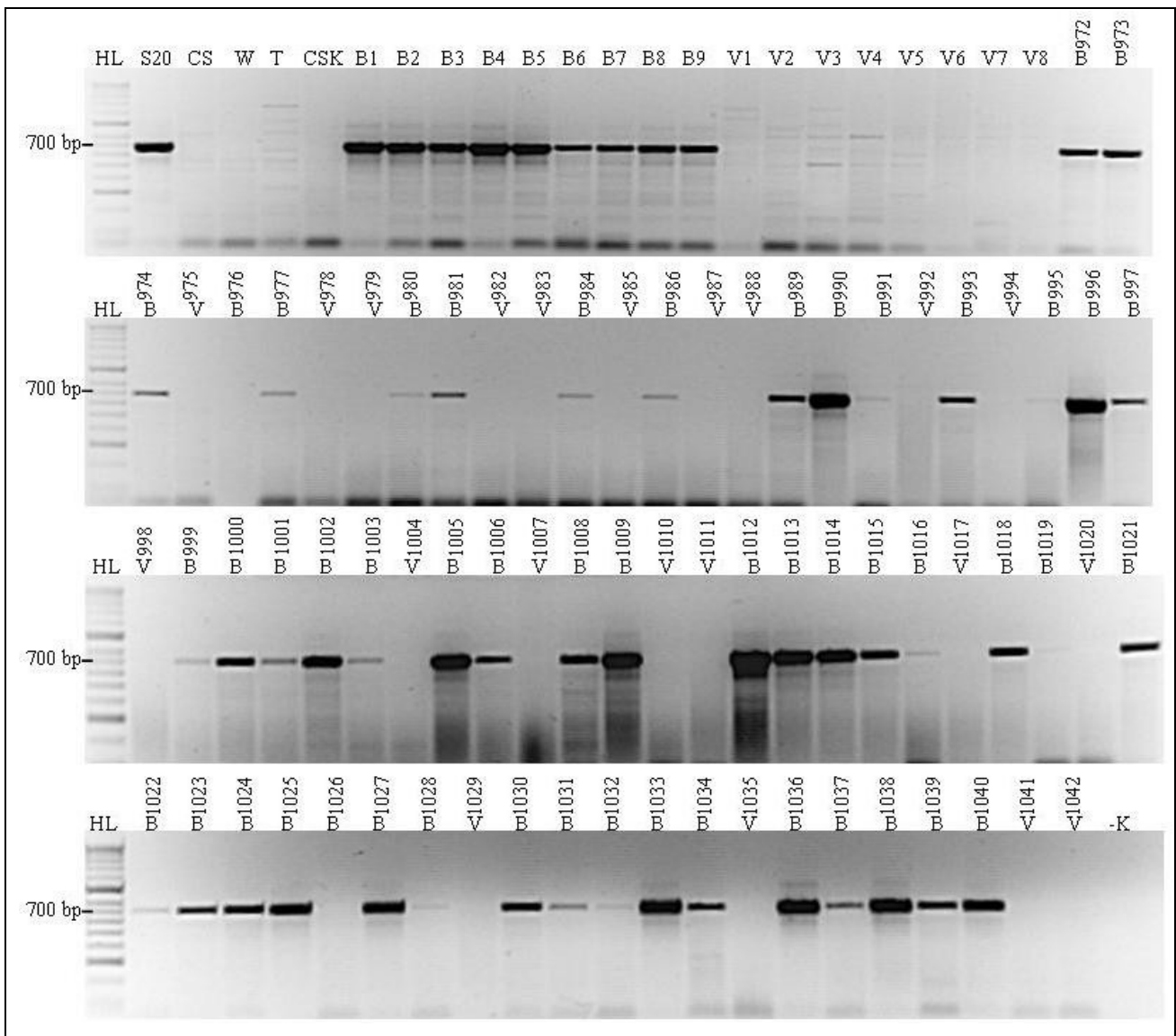
3.2.7.2 SCAR-ontwerp en analise

Volgorde bepaling van die gekloneerde OPO-7 RAPD-fragment het ’n produk van 840 bp gelever wat die oorspronklike RAPD-inleierbindingsetels ingesluit het. Die inleierpaar AEO-7 F en AEO-7 R is ontwerp deur die oorspronklike RAPD-merkervolgorde te verleng. PCR-amplifikasie met hierdie inleiers het ’n enkele bandjie van verwagte grootte (840 bp) gelever na agarose jellektroforese. Hierdie bandjie het ongelukkig in beide vatbare en bestande plante van die F_1 : 06M17 (= 03M119/2*Thatcher) populasie geamplifiseer, sowel as in die kontroles CS, W84-17 en

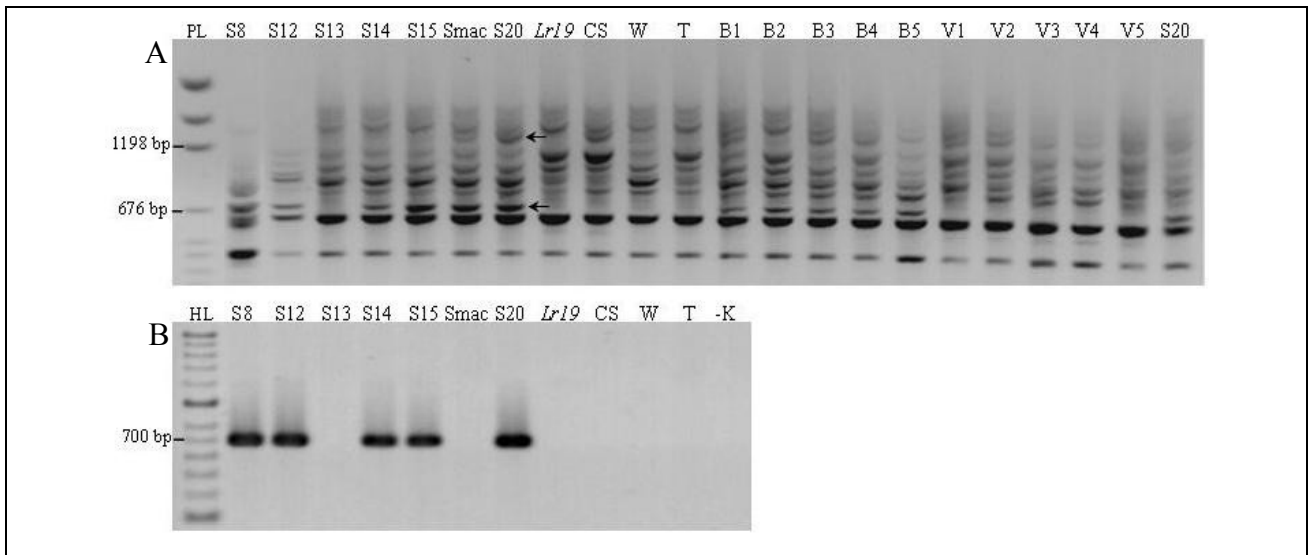
Thatcher (resultate nie getoon). Die inleiers is ook op die 06M84 paneel van 80 plante getoets en weereens is 'n enkele bandjie van die verwagte 840 bp geamplifiseer, maar vatbare en bestande plante kon geensins van mekaar onderskei word nie. 'n Tweede stel inleiers nl. AEO-7BF¹ en AEO-7BR¹ is vervolgens vanaf die OPO-7 RAPD-fragmentvolgorde ontwerp in 'n poging om 'n spesifieke merker te vind wat die fragment slegs in bestande plante sal amplifiseer. PKR-amplifikasie met hierdie merkers het egter soortgelyke resultate gelewer as die eerste stel inleiers, waar vatbare en bestande plante nie van mekaar onderskei kon word nie (resultate nie getoon). Die inleierpare is verder ook in elke moontlike voor- en terugwaartse kombinasie gebruik, maar geen verandering is in die geamplifiseerde profiel waargeneem nie.

Volgorde analyse van die gekloneerde OPW-7 PKR-produk het getoon dat die polimorfiese fragment, wat die oorspronklike RAPD-inleier bindingsetel insluit, se werklike grootte 705 bp is. Die inleierpaar OPW-7.2 F en OPW-7.2 R is ontwerp deur die RAPD-inleier volgorde te verleng. PKR-amplifikasie met die SCAR-inleierstel OPW-7.2 het 'n duidelike diagnostiese band vir plante met die S20-translokasie geproduseer in ooreenstemming met 'n verwagte grootte van 700 bp (Figuur 3.13). Die SCAR-merker is ook getoets op die aanvanklike toetspaneel van plante (Tabel 2.1) wat die verskeie wilde-spesie verhaalde introgressie/translokasies bevat het. Soos met die OPW-7 RAPD-inleier waarvan die OPW 7.2 inleiers ontwerp is, is 'n enkele duidelike bandjie geamplifiseer in die S8-introgressie, sowel as in die S12-, S14-, S15- en S20-translokasie individue. Die fragment was weereens afwesig in die S13-translokasie, die gewone koring-lyne CS, Thatcher en W84-17, maar nou ook in Smac waar dit voorheen geamplifiseer het. Die eerste afleiding wat hieruit gemaak kan word is dat die fragment wel vanaf die wilde spesie genepoel oogedra is na gewone koring. Daar is ook bevestig dat die fragment segregeer in bestande plante wat die S20-translokasie besit en gebruik kan word vir die seleksie van hierdie plante binne die nageslag van kruisings tussen hierdie spesifieke ouerplante en gewone koring (Figure 3.13 en 3.14A). Die merker kan moontlik verder ook nuttig gebruik word vir die seleksie van die ander *Triticum* en *Aegilops* spesie-verhaalde introgressie/translokasielyne wat in hierdie studie gebruik is (Tabel 2.1). Die merker sal egter op gepaste segregerende panele (en moontlik ook die wilde spesie ouers) van hierdie lyne getoets moet word om dit te bevestig. Die RAPD-merker amplifiseer moontlik 'n gekonserveerde, homoloë volgorde in die S8-introgressie (6B), sowel as die S12- (6A), S14- (2D), S15- (3A) en S20- translokasies (6A). Hierdie volgorde is waarskynlik nie heeltemal identies in die verskillende spesies nie. Dit is moontlik om hierdie rede dat die fragment na omskakeling na 'n SCAR-merker nie meer geamplifiseer het in die Smac-

translokasielyn nie. Die korter, minder spesifieke RAPD-merker het aan die 3'-ente verskil van die SCAR-inleiers en hierdie verskil het moontlik tot die differensiële amplifikasie gelei.



Figuur 3.13. PKR-analise met die SCAR inleierstel OPW-7.2 wat die herhaalbaarheid van die diagnostiese band in plante wat die S20 translokasie bevat, bevestig het. L = “Hyperladder II”, S20 = 03M119-71(= CSDM3B-5B//CS*5/*Ae. neglecta*-155/3/W84-17), CS = Chinese Spring, W = W84-17, T = Thatcher, CSK = Chinese Spring kort. Bestande (B1, B2, B3, B4, B5, B8, B9) en vatbare (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8) plante van die TK₁F₁: 03M119-71A/2*Thatcher populasie. Nommers 972 tot 1042 = vatbare (V) en bestande (B) plante uit die F₁ 06M84 (= CS/03M119//W84-17); -K = Kontrole (geen DNS).



Figuur 3.14. A. PCR-produkte en diagnostiese band (pyltjie 676 bp) geamplifiseer met RAPD-inleier OPW-7. Die pyltjie by 1198 bp dui die aanvanklik-geïdentifiseerde polimorfisme vir die S20-translokasie aan wat nie bestendig in slegs vatbare plante geamplifiseer het nie. Verifikasie is gebaseer op bestande (B1, B2, B3, B4, B5) en vatbare (V1, V2, V3, V4, V5) plante van die TK₁F₁: 03M119-71A/2*Thatcher populasie. B. PCR-produkte geamplifiseer met SCAR-inleier OPW 7.2. Afkortings: S8 = F₁: 05M64 = CS*4/T. *dicoccoides*-479//3*CS-S/3/CS/4/2* Thatcher. S12 = F₁: 05M65 = CS*9/*Ae. sharonensis*-174//3*W84-17/3/CS/4/W84-17/5/2*Thatcher. S13 = F₁: (S13= CS*7/*Ae. speltoides*-691)/W84-17. S14 = F₁: 03M130 = CSM2D//CS*4/*Ae. kotshyi*-617/3/2*Thatcher. S15 = F₁: 0516 = CS*2/*Ae. peregrina*-680//10*W84-17. Smac = 03M107 = CSDM 3B-5B//CS*8/*Ae. biuncialis*-683/3/W84-17. S20 = 03M119-71(= CSDM3B-5B//CS*5/*Ae. neglecta*-155/3/W84-17). *Lr19* = 05M88 = CSLr19-149-299.478 rekombinant/2*Thatcher. PL = pGem molekulêre grootte merker. HL = "Hyperladder II" molekulêre massa merker.

3.2.7.3 RGAP-analise

Van die 21 RGA-inleierkombinasies (Tabel 2.4) wat getoets is, het twee inleierpare elkeen 'n potensieel nuttige polimorfisme vir die S20-translokasie geamplifiseer. Dit was onderskeidelik die Pto kin 2 en RLRR rev kombinasie (Figuur 4.33), sowel as die Pto kin 4 en S2 (Figuur 4.47) RGA kombinasie. Die RGAP-merkers is elkeen op panele van segregerende plante vir die S20-translokasie herhaal. Die produkte van die Pto kin 4 en S2 inleierkombinasie is langer geëlektroforeer as in die eerste lopies (Figuur 4.47) in 'n poging om die polimorfisme beter te kan onderskei tussen vatbare en bestande plante en moontlik 'n duidelike enkele bandjie te lewer. Die benadering het wel 'n beter skeiding van die fragmente gelewer wat ontblyt het dat die polimorfisme uit twee nabygeleë bande bestaan waarvan slegs die boonste bandjie (aangedui met pyltjie in Figuur 3.15) diagnosties was vir bestande S20-nageslag. Die diagnostiese bandjies wat deur die onderskeie RGA-merkers geamplifiseer is (aangedui met pyltjies in Figure 3.15 en 3.16), is elkeen individueel uit die poli-akriëlamied jel geïsoleer en as templaats gebruik vir PCR-amplifikasiesering met die onderskeie RGA-inleiers. Die PCR-produkte van hierdie reaksies is geskei op 'n 2 % agarose jel. Pto kin 2 - RLRR rev, sowel as Pto kin 4-S2 het elkeen 'n bandjie

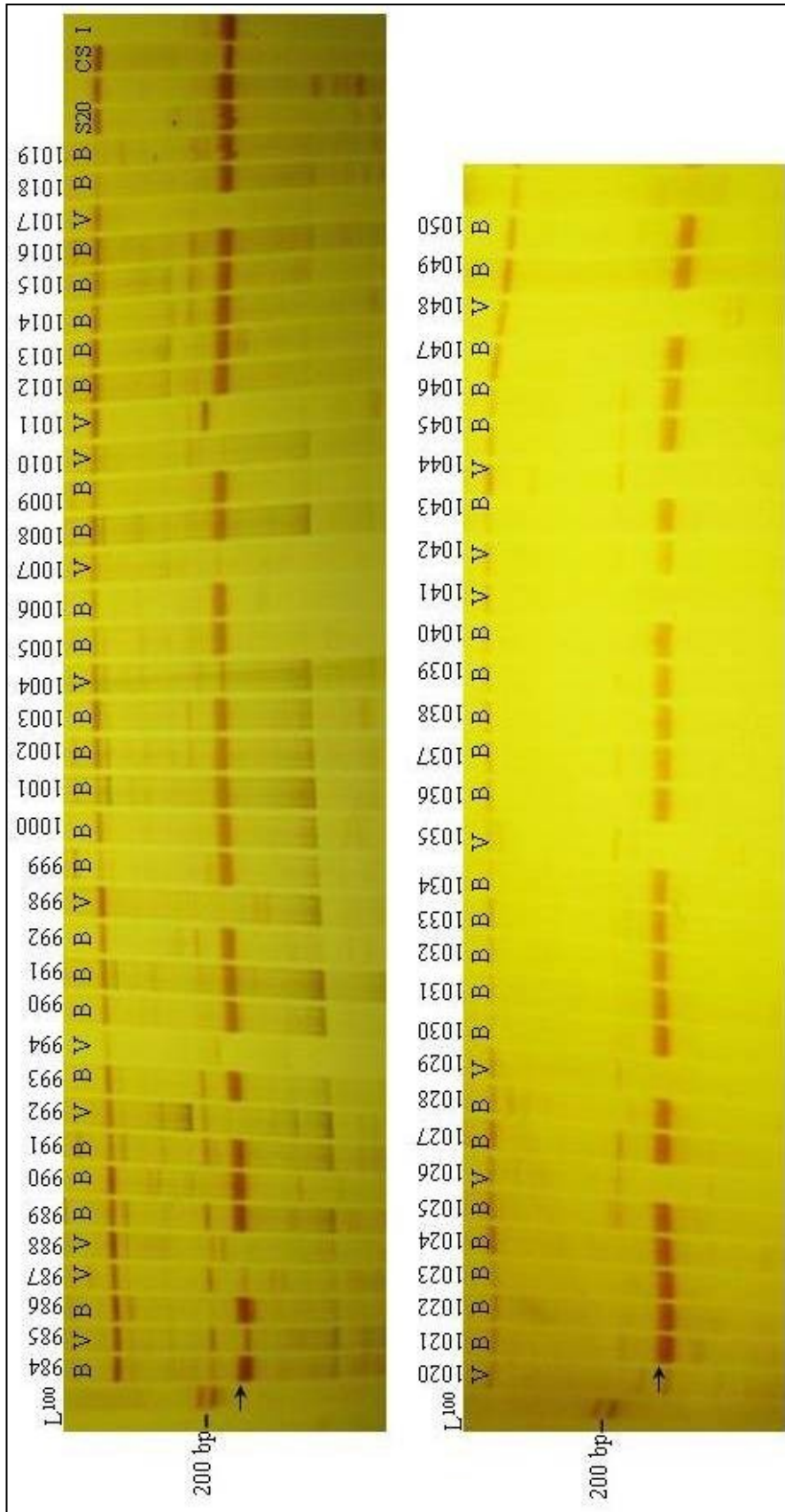
geamplifiseer waarvan die grootte ooreengestem het met die van die oorspronklike RGAP-polimorfisme op die poli-akriëlamied jel. Hierdie bandjies is vervolgens uit die agarose jel geïsoleer en gekloneer (afdeling 2.1.6 tot 2.1.9). Vir elkeen van die twee inleierkombinasies is twee positiewe wit *E. coli* kolonies (waarvan die korrekte grootte invoeging bevestig is met 'n kolonie-PKR) gekies vir plasmiedvermeerdering en volgordebepaling.

3.2.7.4 SCAR-ontwerp en analise

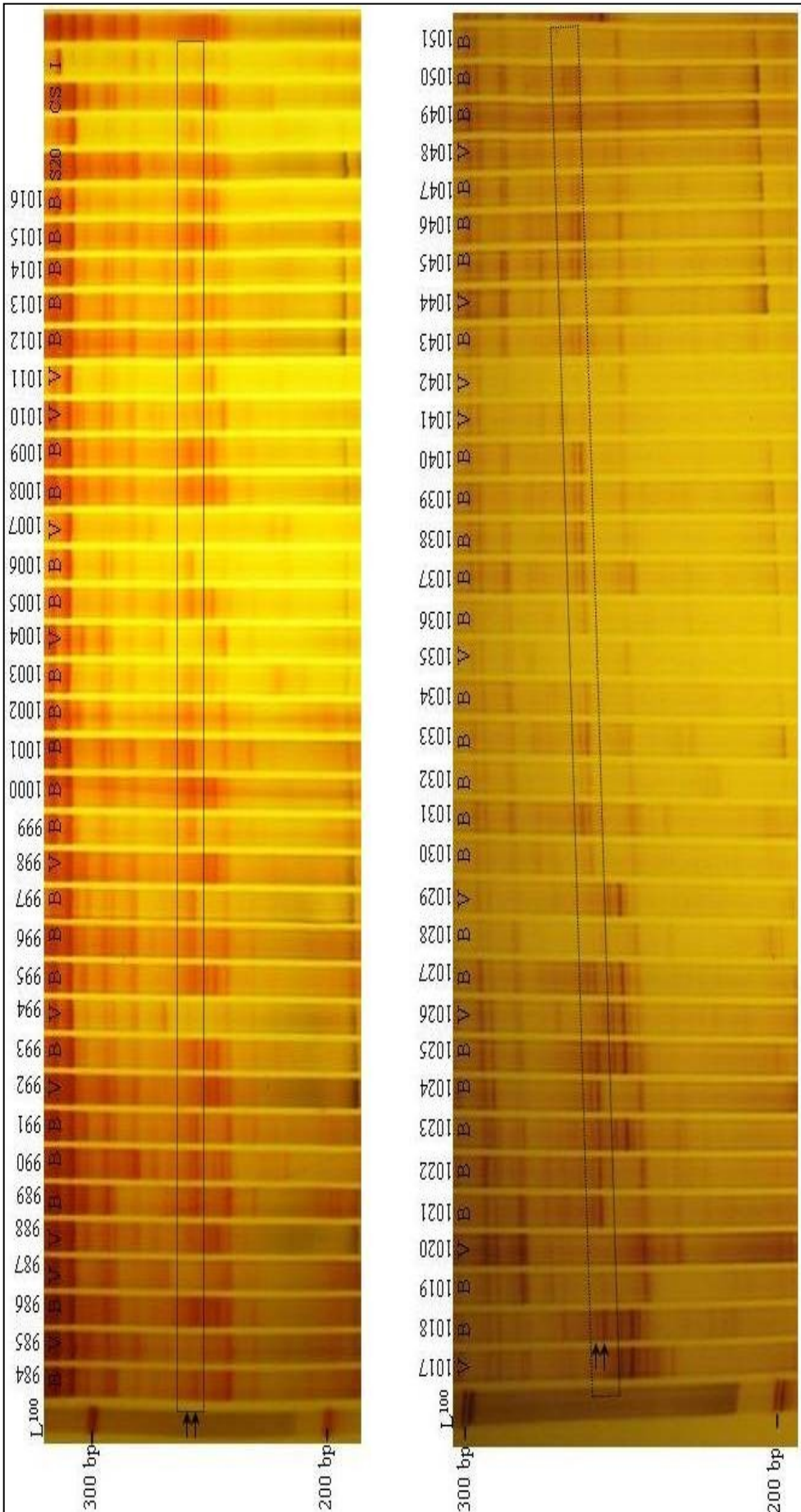
Volgorde analise van die gekloneerde Pto kin 2 -RLRR 2 RGAP diagnostiese fragment het getoon dat die fragment, wat die oorspronklike RGAP-inleier bindingsetel insluit, se werklike grootte 250 bp is. Die inleiers AEPto kin 2 , AERLRRr, AEPto kin 2.1, AEPto kin 2.2, AERLRR r 2.1 en AERLRR r 2.2 (Tabel 3.7) is vanaf die volgorde ontwerp. Sommige inleiers het verskillende lengtes van die RGA-bindingsetels ingesluit terwyl ander op interne volgordes gebaseer is. Die inleiers AEPto kin 2 en AERLRRr is die enigste kombinasie wat die diagnostiese band geamplifiseer het (Figuur 3.17).

Volgorde analise van die gekloneerde Pto kin 4-S2 RGAP diagnostiese fragment het getoon dat die fragment wat die oorspronklike RGAP-inleier bindingsetel insluit se werklike grootte 200 bp is. Die inleiers AEPto kin 4, AES 2, AEPto kin 4.1, AEPto kin 4.2, AES 1.1, AES 1.2 is vanaf die volgorde ontwerp en het verskillende lengtes van die oorspronklike RGA bindingsetels ingesluit of was op interne nukleotiedvolgordes gebaseer. Hierdie inleiers is in alle moontlike voor-en terugwaartse volgordes met mekaar, sowel as met die RGA-inleiers, getoets. Slegs inleierkombinasie AES 2 en Pto kin 4 (oorspronklike RGA) het 'n diagnostiese bandjie geamplifiseer vir plante wat die S20 translokasie bevat het (Figuur 3.18).

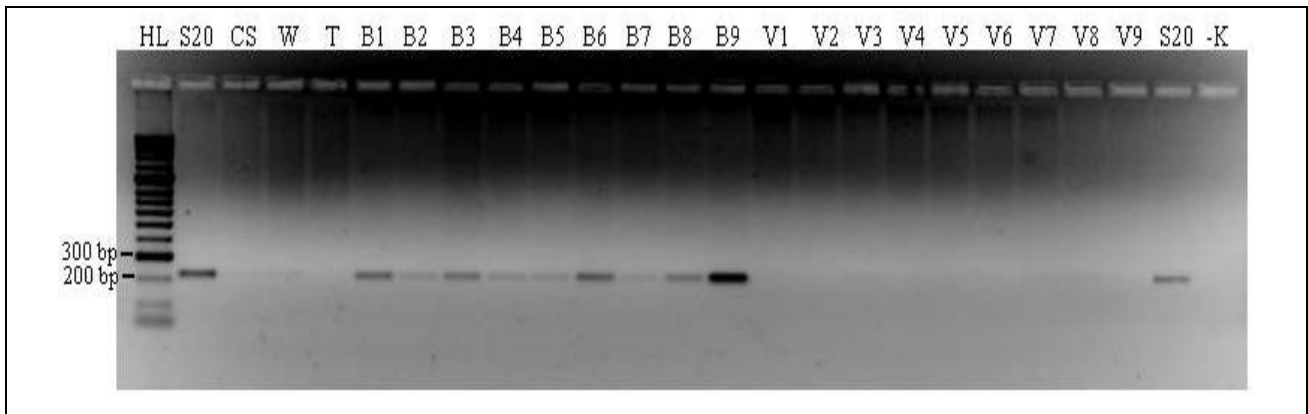
Die resultate verkry met die inleiers AEPto kin 2 en AERLRRr sowel as AES 2 en Pto kin 4 kon egter nie bestendig herhaal word nie. Hierdie inleiers sal dus verder opgevolg moet word in 'n poging om die herhaalbaarheid van die reaksies te optimaliseer.



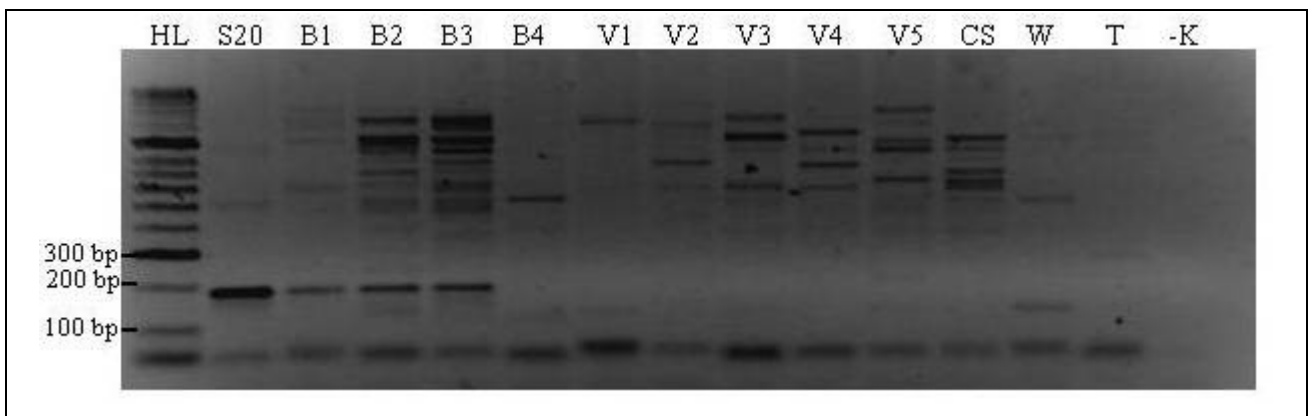
Figuur 3.15. RGAP-polimorfismes bevestig vir die S20 translokasie. L¹⁰⁰ = 100 bp molekuleêre massa merker (Promega), S20 = 03M119-71 (= CSDM3B-5B//CS*5/Ae. neglecta-155/3/W84-17), CS = Chinese Spring, I = Inia 66, -K = Geen DNS. 984-1050 = bestande (B) en vatbare (V) plante uit die F₁ 06M84 (= CS/03M119//W84-17). Die diagnostiese S20 fragment geamplifiseer met die RGA-inleierpaar Ptokin 4 – S2 word met die pyltjie aangedui onder die 200 bp molekuleêre merker. Twee nabygeleë bandjies is geamplifiseer, waarvan die boonste een slegs in bestande plante voorkom.



Figuur 3.16. RGAP-polimorfismes bevestig vir die S20 translokasie. PKR-produkte is ge-elektroforese op 6 % PAA in 1X TBE-buffer en met silwer gekleur. L¹⁰⁰= 100 bp molekule massa merker (Promega), S20 = 03M119-71(= CSDM3B-5B//CS*5/Ae. neglecta-155/3/W84-17). 984-1051 = bestande (B) en vatbare (V) plante uit die F₁ 06M84 (= CS/03M119//W84-17); CS = Chinese Spring, I = Inia 66, -K = Kontrolle met geen DNS. Die diagnostiese S20 fragment geamplifiseer met die RGA-inleierpaar RLRR rev – Pto kin 2 word met die pyltjie aangedui tussen 200 bp en 300 bp van die 100 bp molekule massa merker. Twee nabygeleë bandjies is geamplifiseer, waarvan die boonste een slegs in bestande plante voorkom. Hierdie bandjie is uitgesny en gekloneer.



Figuur 3.17. PCR-analise met die RGAP-verhaalde SCAR-merkers AEP₁tokin 2 en AERLRRr. PCR-produkte is op 'n 2 % agarose-jel ge-elektroforeer teen 100 mV vir 1.5 h, gekleur met EtBr en gevisualiseer onder UV-lig. L = "Hyperladder II", S20 = 03M119-71 (= CSDM3B-5B//CS*5/*Ae. neglecta*-155/3/W84-17), CS = Chinese Spring, W = W84-17, T = Thatcher. Bestande (B1, B2, B3, B4, B5, B8, B9) en vatbare (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9) plante van die TK₁F₁: 03M119-71A/2*Thatcher populasie. Die diagnostiese bandjie kan tussen 200 bp en 300 bp in bestande plante waargeneem word.



Figuur 3.18. PCR-analise met die RGAP-verhaalde SCAR-merkers AES 2 en P₁tokin 4. PCR-produkte is op 'n 2 % agarose-jel ge-elektroforeer teen 100 mV vir 1.5 h, gekleur met EtBr en gevisualiseer onder UV-lig. L = "Hyperladder II", S20 = 03M119-71 (= CSDM3B-5B//CS*5/*Ae. neglecta*-155/3/W84-17), CS = Chinese Spring, W = W84-17, T = Thatcher. Bestande (B1, B2, B3, B4) en vatbare (V1, V2, V3, V4, V5) plante van die TK₁F₁: 03M119-71A/2*Thatcher populasie. Die diagnostiese bandjie kan net onder 200 bp in bestande plante waargeneem word.

Tabel 3.7. PKR-merkers ontwikkel vir die S20 translokasiesegment. I = Interne inleiers. Onderstreepte gedeeltes verteenwoordig die oorspronklike RAPD/RGA-inleierbindingsetels. Klein, kursief gedrukte volgordes verteenwoordig inleiers wat op hul eie of in kombinasie met die ander inleiers gebruik is, maar nie 'n diagnostiese band oplewer het nie.

Inleier	Naam	Nukleotiedvolgorde van inleier 5'-3'	Grootte van amplicon	T _A °C	PKR-program ¹	PKR-mengsel ²
RAPD	OPW-7	CTGGACGTCA	708bp	35	1	A
SCAR	OPW-7.2F	<u>CAGGAGCATAGTCATACTTGGG</u>	700 bp	60	3	C
	OPW-7.2R	<u>CTGGACGTCAACAATGGC</u>				
RAPD	OPO-7	CAGCACTGAC	850 bp	34	1	A
	<i>AEO-7 F</i>	<i>CAGCACTGACCATATGACATAG</i>				
	<i>AEO-7 R</i>	<i>GCACTGACTACAAGCAAACAAC</i>				
	<i>AEO-7 BF^f</i>	<i>TTGGCAATAGAAGACTTGGTAG</i>				
	<i>AEO-7BR^f</i>	<i>GCAAGCAATTAGCGCTAGCC</i>				
RGA	Pto kin 2	AGGGGGACCACCACGTAG	250 bp	45	2	B
	RLRR rev	ACACTGGTCCATGAGGTT				
SCAR	AEPto kin 2	<u>CACGTAGCAAAGCTGGGCAAG</u>	240bp	68	5	C
	AERLRRr	<u>CATGAGGTTATTTCCACAACAGG</u>				
	<i>AEPto kin 2.1</i>	<i>AGGGGGACCACCACGTAGCA</i>				
	<i>AEPto kin 2.2^f</i>	<i>AAGCTGGGCAAGAAATCATC</i>				
	<i>AERLRRr 2.1</i>	<i>ACACTGGTCCATGAGGTTATT</i>				
	<i>AERLRRr 2.2^f</i>	<i>TTCCACAACAGGTGCCATCA</i>				
RGA	Pto kin 4	5'-AGTGTCTTGTAGGGTATC-3'	200	45	2	B
	S2	5'-GGIGGIGTIGGIAAIAAC-3'				
SCAR	AES2	<u>GGGGAGAACGACAAACAAAAC</u>	190	58	5	B
	Pto kin 4	5'-AGTGTCTTGTAGGGTATC-3'				

¹ PKR-program soos beskryf in Tabel 2.5 (Materiaal en Metodes)

² PKR-reaksiemengsel soos beskryf in Tabel 2.6 (Materiaal en Metodes)

Tabel 3.7. vervolg. PKR-merkers ontwikkel vir die S20 translokasiesegment. I = Interne inleiers. Onderstreepte gedeeltes verteenwoordig die oorspronklike RAPD/RGA-inleierbindingsetels. Klein, kursief gedrukte volgordes verteenwoordig inleiers wat op hul eie of in kombinasie met die ander inleiers gebruik is, maar nie 'n diagnostiese band opgelewer het nie.

Inleier	Naam	Nukleotiedvolgorde van inleier 5'-3'	Grootte van amplicon	T _A °C	PKR-program ¹	PKR-mengsel ²
	<i>AEPtokin 4</i>	<u>GTATCACAGGAAACAAGGAC</u>				
	<i>AEPtokin 4.1</i>	<u>AGTGTCTTGTAGGGTATCAC</u>				
	<i>AEPtokin 4.2</i>	<u>GGAAACAAGGACAACCCCTCG</u>				
	<i>AES 1.1</i>	<u>GGGGGTGGGGAAGACGACAA</u>				
	<i>AES 1.2¹</i>	<u>CAAAACAAAAGTCAATCGACCG</u>				

¹ PKR-program soos beskryf in Tabel 2.5 (Materiaal en Metodes)

² PKR-reaksiemengsel soos beskryf in Tabel 2.6 (Materiaal en Metodes)

3.3 SAMEVATTING

Hierdie studie het gepoog om SCAR-merkers vanaf RAPD- en RGA- polimorfismes te ontwikkel. Hoewel hierdie twee PKR merkertegniese nie soveel polimorfismes genereer as die AFLP-tegniek nie, het ondervinding geleer dat die eenvoudiger amplifikasieprofiel van eersgenoemde merkers meer geskik is vir klonering van die korrekte teikenfragment. AFLP-profiel verteenwoordig 'n veel groter reeks van fragmente wat pogings om die korrekte fragment te kloner, kompliseer. Die herwinning van teikenfragmente uit AFLP-jelle is uiteraard ook baie meer omslagtig en ingewikkeld.

Vanuit die 260 RAPD-inleiers wat in hierdie studie gebruik is het 230 inleiers bande geproduseer wat ge-evalueer kon word. Tussen drie tot twaalf bande is per baan op elkeen van die agarose jels waargeneem; waarvan in totaal 84 bande polimorfies was en geblyk het om met wilde spesie verhaalde chromatien geassosieer te wees. Uiteindelik is nege herhaalbare fragmente geïdentifiseer vir vier van die wilde-spesie-verhaalde weerstandsgenkomplekse (S8, S13, S15 en S20) waarvan vyf omgeskakel kon word na 'n meer herhaalbare SCAR-merker (Tabel 3.8). Dus het slegs ongeveer 3.5 % van die totale aantal RAPD-inleiers wat aanvanklik gesif is bygedra tot die identifisering van geskikte merkerfragmente.

Die 21 RGA-inleierkombinasies het om en by dieselfde totale aanvanklike aantal polimorfiese bande geproduseer as die 260 RAPD-inleiers wat gebruik is. Sestien van die RGA-inleierkombinasies het bande geproduseer wat ge-evalueer kon word. Vyftien tot dertig bandjies is per laan op die poli-akriëlamied jels waargeneem waarvan nagenoeg 10 % geblyk het om vreemde chromatien-geassosieerde bande te genereer. Vanuit 75 totale aanvanklik geïdentifiseerde RGAP fragmente het slegs vyf bestendig, herhaalbare polimorfismes behoue gebly vir twee van die wilde-spesie verhaalde weerstandsgeenkomplekse nl. S13 en S20 (Tabel 3.8). Dus het ongeveer 24 % van die totale aantal RGA-inleiers (kombinasies) wat aanvanklik gesif is bygedra tot die identifisering van geskikte RGAP-merkerfragmente waarvan twee (beide vir die S20 translokasie) omgeskakel kon word na SCAR-merkers.

In hierdie studie kon beide RAPDs en RGAs suksesvol geïmplementeer word as bronne van nuwe merkers vir geen-introgressie. Alhoewel die RAPDs in hierdie studie minder polimorfismes as die RGA-inleierkombinasies geproduseer het op 'n per merker basis, was die diagnostiese bande gegeneer deur die RAPD-inleiers veel makliker om om te skakel na SCAR-merkers. Minder tyd is spandeer aan pogings om die aanvanklike merker reaksies (RAPD teenoor RGAP) te optimaliseer, sowel as met die omskakeling na SCAR-merkers vanaf die onderskeie merkers. Daar is dus gevind dat RAPDs 'n beter opsie is as merker vir geen-introgressie in terme van omskakeling na 'n SCAR-merker (wat makliker is om te evalueer in die sifting van groot aantal segregate bevattende die geïntegreerde vreemde chromatien). Alhoewel die RGAP-fragmente wat omgeskakel is na SCAR-merkers slegs 'n enkele bandjie geproduseer het op die agarose jels, was die probleem wat merendeels ondervind is dat dit teenwoordig was in beide vatbare en bestande plante van segregerende populasies. Die RGA-inleiers is afgelei van gekonserveerde domeine van gekloneerde weerstandsgene. En hoewel die RGA-inleier polimorfiese bande produseer is dit moontlik dat dit ná omskakeling na 'n SCAR-merker (langer inleiers wat interne basispare van die RGAP-fragmente insluit, en gebruik word onder strenger reaksiekondisies) ook die gekonserveerde volgordes op homoeoloë chromosome kan amplifiseer.

Alhoewel die totale aantal merkers wat uit hierdie studie verhaal is veel laer is as wat aanvanklik verwag is (aangesien die meerderheid translokasies hele chromosoomarms of groot gedeeltes daarvan in beslag neem), kon nuttige merkers vir die S8 introgressie, sowel as vir die S13, S15 en S20 translokasies wel verkry word. Verskeie van die nuwe merkers (vir die S13, S15 en S20 translokasies) kon reeds met groot sukses aangewend word in ander lopende projekte vir die kartering en verkorting van hierdie translokasies. 'n Aantal RAPD- en RGA-fragmente kon nie in

hierdie studie gereedlik omgeskakel word na SCAR-merkers nie; dit beteken egter nie noodwendig dat dit glad nie moontlik is om hulle om te skakel nie en opvolg-pogings mag meer suksesvol wees.

Tabel 3.8. Opsomming van die diagnostiese, herhaalbare RAPD en RGA merkers wat opgespoor is en waarvan sommige suksesvol na SCAR-merkers omgeskakel kon word vir elke tersaaklike introgressie/translokasie.

	RAPD	SCAR (RAPD)	RGA	SCAR (RGA)
S8	OPN-1 (500 bp) & (300 bp)	S8N1-OF & S8N1-OR (500bp) S8N-1OF & S8N-1RB (500bp)	Geen	Geen
S12	Geen	Geen	Geen	Geen
S13	OPN-15 (1500bp)	Nie omgeskakel na SCAR	Pto kin 2 & RLRR for (140bp)	Geen
	OPO-2 (1600bp)	OPO-2R & S13-O2F (1600 bp)		
	OPR-16 (819 bp)	R-16S13R & R-16S13F (605 bp)	Pto kin 2 & Pto kin 4 (352 bp)	Geen
		R-16F ¹ & R-16S13F (819 bp) R-16R ¹ & R-16S13F (730 bp) R-16R ¹ & R-16S13F (695 bp)		
OPT-14 (920 bp)	Nie suksesvol omgeskakel na SCAR	RLRR for & S2 (300-400 bp)	Nie opgevolg	
S14	Geen	Geen	Geen	Geen
S15	OPT-3 (850 bp)	S15-T3F ¹ & S15-T3R ¹ (622 bp)	Geen	Geen
		S15-T3F ¹ & S15-T3RB ¹ (622 bp)	Geen	Geen
Smac	Geen	Geen	Geen	Geen
S20	OPO-7 (850 bp)	Nie suksesvol omgeskakel na SCAR	Pto kin 2 & RLRR rev (250 bp)	<i>AEPto kin 2 & AERLRR (240 bp)*</i>
	OPW-7 (708 bp)	OPW 7.2R & OPW 7.2F (700 bp)	Pto kin 4 & S2 (199 bp)	<i>AES 2 & Pto kin 4 (199 bp)*</i>

* Inleiers produseer 'n enkele diagnostiese fragment vir die S20 translokasie, maar opvolgstudie word benodig om die herhaalbaarheid van die merkers te optimiseer.

HOOFSTUK 4. ADDENDUMS

4.1. ADDENDUM A: RAPD-INLEIERSTELLE

RAPD-inleiers gebruik in hierdie studie is verkry van “Operon Technologies™ ” (Alimede, Kalifornië). Die inleiers word verskaf in stelle van 20 RAPD-inleiers elk. Die 260 inleiers (13 stelle) wat in hierdie studie ondersoek is word in Tabel 4.1 weergegee.

Tabel 4.1. Tabel van die Operon inleierstelle gebruik met gedetailleerde inleiervolgorde informasie en die aanhegtingstemperature gebruik vir PKR-amplifisering. 'n Totaal van 260 RAPD-inleiers (13 stelle) is getoets.

Kode	Nukleotiedvolgorde	Aanhegtings-temperatuur °C
Inleierstel OPC		
OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'	35.8
OPC-02	5'-GTGAGGCGTC-3'	38.7
OPC-03	5'-GGGGGTCTTT-3'	34.3
OPC-04	5'-CCGCATCTAC-3'	33
OPC-05	5'-GATGACCGCC-3'	38.8
OPC-06	5'-GAACGACTC-3'	32.8
OPC-07	5'-GTCCCGACGA-3'	40.1
OPC-08	5'-TGGACCGGTG-3'	40.4
OPC-09	5'-CTCACCGTCC-3'	37.4
OPC-10	5'-TGTCTGGGTG-3'	34.7
OPC-11	5'-AAAGTGC GG-3'	38.1
OPC-12	5'-TGTATCCCC-3'	34.1
OPC-13	5'-AAGCCTCGTC-3'	35.8
OPC-14	5'-TGC GTGTTG-3'	38.8
OPC-15	5'-GACGGATCAG-3'	32.3
OPC-16	5'-CACACTCCAG-3'	32.4
OPC-17	5'-TTCCCCCAG-3'	38.7
OPC-18	5'-TGAGTGGGTG-3'	34.7
OPC-19	5'-GTTGCCAGCC-3'	40.2
OPC-20	5'-ACTTCGCCAC-3'	36.9
Inleierstel OPE		
OPE-1	5'-CCCAAGGTCC-3'	36.9
OPE-2	5'-GGTGCGGGAA-3'	41.6
OPE-3	5'-CCAGATGCAC-3'	33.8
OPE-4	5'-GTGACATGCC-3'	34.4
OPE-5	5'-TCAGGAGGT-3'	35.2
OPE-6	5'-AAGACCCCTC-3'	33.3
OPE-7	5'-AGATGCAGCC-3'	36.3
OPE-8	5'-TCACCACGGT-3'	38.1
OPE-9	5'-CTTACCCGA-3'	35
OPE-10	5'-CACCAGGTGA-3'	34.7
OPE-11	5'-GAGTCTCAGG-3'	30.6
OPE-12	5'-TTATCGCCCC-3'	35.1
OPE-13	5'-CCCGATTCGG-3'	38.2
OPE-14	5'-TGCGGTGAG-3'	41.9
OPE-15	5'-ACGCACAACC-3'	38.1
OPE-16	5'-GGT GACTGTG-3'	33
OPE-17	5'-CTACTGCCGT-3'	35.2
OPE-18	5'-GGACTGCAGA-3'	34.9
OPE-19	5'-ACGGCGTATG-3'	36.8
OPE-20	5'-AACGGTGACC-3'	36.1

Kode	Nukleotiedvolgorde	Aanhegtings-temperatuur °C
Inleierstel OPF		
OPF-1	5'-ACGGATCCTG-3'	34.8
OPF-2	5'-GAGGATCCCCT-3'	32.2
OPF-3	5'-CCTGATCACC-3'	31.8
OPF-4	5'-GGTGATCAGG-3'	31.8
OPF-5	5'-CCGAATCCCC-3'	33.1
OPF-6	5'-GGGAATTCGG-3'	33.1
OPF-7	5'-CCGATATCCC-3'	31
OPF-8	5'-GGGATATCGG-3'	31
OPF-9	5'-CCAAGCTTCC-3'	33.5
OPF-10	5'-GGAAGCTTGG-3'	33.5
OPF-11	5'-TTGGTACCCC-3'	33.8
OPF-12	5'-ACGGTACCAG-3'	34.4
OPF-13	5'-GGCTGCAGAA-3'	36.8
OPF-14	5'-TGCTGCAGGT-3'	39.8
OPF-15	5'-CCAGTACTCC-3'	30.5
OPF-16	5'-GGAGTACTGG-3'	30.5
OPF-17	5'-AACCCGGGAA-3'	37.9
OPF-18	5'-TTCCCGGGTT-3'	37.9
OPF-19	5'-CCTCTAGACC-3'	29.3
OPF-20	5'-GGTCTAGAGG-3'	29.3
Inleierstel OPM		
OPM-1	5'-GTTGGTGGCT-3'	36.5
OPM-2	5'-ACAACGCCTC-3'	36.9
OPM-3	5'-GGGGGATGAG-3'	35.8
OPM-4	5'-GGCGGTTGTC-3'	39.8
OPM-5	5'-GGGAACGTGT-3'	36.1
OPM-6	5'-CTGGGCAACT-3'	35.9
OPM-7	5'-CCGTGACTCA-3'	35.1
OPM-8	5'-TCTGTTCCCC-3'	33.9
OPM-9	5'-GTCTTGCGGA-3'	36.4
OPM-10	5'-TCTGGCGCAC-3'	42.4
OPM-11	5'-GTCCACTGTG-3'	33
OPM-12	5'-GGGACGTTGG-3'	38.4
OPM-13	5'-GGTGGTCAAG-3'	32.8
OPM-14	5'-AGGGTCGTTCC-3'	35
OPM-15	5'-GACCTACCAC-3'	31.2
OPM-16	5'-GTAACCAGCC-3'	33
OPM-17	5'-TCAGTCCGGG-3'	39.2
OPM-18	5'-CACCATCCGT-3'	35.7
OPM-19	5'-CCTTCAGGCA-3'	35.4
OPM-20	5'-AGGTCTTGGG-3'	33.9

Tabel 4.1 vervolg. Tabel van die Operon inleierstelle gebruik met gedetailleerde inleiervolgorde informasie en die aanhegtingstemperature gebruik vir PKR-amplifisering. 'n Totaal van 260 RAPD-inleiers (13 stelle) is getoets.

Kode	Nukleotiedvolgorde	Aanhegtings-temperatuur °C
Inleierstel OPN		
OPN-1	5'-CTCACGTTGG-3'	33.9
OPN-2	5'-ACCAGGGGCA-3'	42.9
OPN-3	5'-GGTACTCCCC-3'	35.1
OPN-4	5'-GACCGACCCA-3'	39.8
OPN-5	5'-ACTGAACGCC-3'	36.9
OPN-6	5'-GAGACGCACA-3'	36.5
OPN-7	5'-CAGCCCAGAG-3'	37.2
OPN-8	5'-ACCTCAGCTC-3'	34.3
OPN-9	5'-TGCCGGCTTG-3'	42.9
OPN-10	5'-ACAACGGGG-3'	35.1
OPN-11	5'-TCGCCGAAA-3'	41.5
OPN-12	5'-CACAGACACC-3'	33
OPN-13	5'-AGCGTCACTC-3'	35.9
OPN-14	5'-TCGTGCGGGT-3'	44.5
OPN-15	5'-CAGCGACTGT-3'	36.5
OPN-16	5'-AAGCGACCTG-3'	36.3
OPN-17	5'-CATTGGGGAG-3'	32.2
OPN-18	5'-GGTGAGGTCA-3'	34.1
OPN-19	5'-GTCCGTAFTG-3'	32.3
OPN-20	5'-GGTGCTCCGT-3'	41.1
Inleierstel OPO		
OPO-1	5'-GGCACGTAAG-3'	34.1
OPO-2	5'-ACGTAGCGTC-3'	36.3
OPO-3	5'-CTGTTGCTAC-3'	28.6
OPO-4	5'-AAGTCCGCTC-3'	35.8
OPO-5	5'-CCCAGTCACT-3'	34
OPO-6	5'-CCACGGGAAG-3'	37.8
OPO-7	5'-CAGCACTGAC-3'	33.8
OPO-8	5'-CCTCCAGTGT-3'	34
OPO-9	5'-TCCCACGCAA-3'	39.4
OPO-10	5'-TCAGAGCGCC-3'	41.3
OPO-11	5'-GACAGGAGGT-3'	33.4
OPO-12	5'-CAGTGCTGTG-3'	34.4
OPO-13	5'-GTCAGAGTCC-3'	31.3
OPO-14	5'-AGCATGGCTC-3'	36.3
OPO-15	5'-TGGCGTCCTT-3'	38.8
OPO-16	5'-TCGCGGTTTC-3'	41.9
OPO-17	5'-GGCTTATGCC-3'	33.8
OPO-18	5'-CTCGCTATCC-3'	31.9
OPO-19	5'-GGTGCACGTT-3'	38.1
OPO-20	5'-ACACACGCTG-3'	37.6

Kode	Nukleotiedvolgorde	Aanhegtings-temperatuur °C
Inleierstel OPP		
OPP-1	5'-GTAGCACTCC-3'	32
OPP-2	5'-TCGGCACGCA-3'	45.7
OPP-3	5'-CTGATACGCC-3'	33
OPP-4	5'-GTGTCTCAGG-3'	31.8
OPP-5	5'-CCCCGGTAAC-3'	32.2
OPP-6	5'-GTGGGCTGAC-3'	38.4
OPP-7	5'-GTCCATGCCA-3'	36.1
OPP-8	5'-ACATCGCCCA-3'	38.9
OPP-9	5'-GTGGTCCGCA-3'	41.7
OPP-10	5'-TCCCGCCTAC-3'	39.4
OPP-11	5'-AACGCFTCGG-3'	43.2
OPP-12	5'-AAGGGCGAGT-3'	38.1
OPP-13	5'-GGAGTGCCTC-3'	37.2
OPP-14	5'-CCAGCCGAAC-3'	39.2
OPP-15	5'-GGAAGCCAAC-5'	34.1
OPP-16	5'-CCAAGCTGCC-3'	39.6
OPP-17	5'-TGACCCGCCT-3'	43.1
OPP-18	5'-GGCTTGGCCT-3'	41.5
OPP-19	5'-GGGAAGGACA-3'	33.9
OPP-20	5'-GACCCTAGTC-3'	29.9
Inleierstel OPQ		
OPQ-1	5'-GGGACGATGG-3'	37.4
OPQ-2	5'-TCTGTCCGTC-3'	34.6
OPQ-3	5'-GGTCACTA-3'	34.1
OPQ-4	5'-AGTGCCTGA-3'	39.6
OPQ-5	5'-CCGCTCTTG-3'	40
OPQ-6	5'-GAGCGCCTTG-3'	39.9
OPQ-7	5'-CCCCGATGGT-3'	39.8
OPQ-8	5'-CTCCAGCGGA-3'	40
OPQ-9	5'-GGCTAACCGA-3'	35.2
OPQ-10	5'-TGTGCCGAA-3'	39.4
OPQ-11	5'-TCTCCGCAAC-3'	36.4
OPQ-12	5'-AGTAGGGCAC-3'	34.2
OPQ-13	5'-GGAGTGGACA-3'	34.1
OPQ-14	5'-GGACGCTTCA-3'	36.4
OPQ-15	5'-GGGTAACGTG-3'	33.2
OPQ-16	5'-AGTGCAGCCA-3'	39.3
OPQ-17	5'-GAAGCCCTTG-3'	33.5
OPQ-18	5'-AGGTCTGGGTG-3'	40.2
OPQ-19	5'-CCCCCTATCA-3'	32.1
OPQ-20	5'-TCGCCCAGTC-3'	40.6

Tabel 4.1. Tabel van die Operon inleierstelle gebruik met gedetailleerde inleiervolgorde informasie en die aanhegtingstemperatuur gebruik vir PKR-amplifisering. 'n Totaal van 260 RAPD-inleiers (13 stelle) is getoets.

Kode	Nukleotiedvolgorde	Aanhegtings-temperatuur °C
Inleierstel OPR		
OPR-1	5'-TGCGGGTCCT-3'	43.1
OPR-2	5'-CACAGCTGCC-3'	39.7
OPR-3	5'-ACACAGAGGG-3'	34
OPR-4	5'-CCCGTAGCAC-3'	38.1
OPR-5	5'-GACCTAGTGG-3'	30.5
OPR-6	5'-GTCTACGGCA-3'	35.3
OPR-7	5'-ACTGGCCTGA-3'	37.3
OPR-8	5'-CCCGTTGCC-3'	41.6
OPR-9	5'-TGAGCACGAG-3'	35.9
OPR-10	5'-CCATTCCTCA-3'	34.5
OPR-11	5'-GTAGCCGTCT-3'	34.7
OPR-12	5'-ACAGGTGCGT-3'	39.4
OPR-13	5'-GGACGACAAG-3'	33.3
OPR-14	5'-CAGGATTCCT-3'	31.6
OPR-15	5'-GGACAACGAG-3'	33.3
OPR-16	5'-CTCTGCGCGT-3'	42.7
OPR-17	5'-CCGTACGTAG-3'	32.1
OPR-18	5'-GGCTTTGCCA-3'	37.8
OPR-19	5'-CCTCCTCATC-3'	30.6
OPR-20	5'-ACGGCAAGGA-3'	38.8
Inleierstel OPT		
OPT-1	5'-GGGCCACTCA-3'	40.3
OPT-2	5'-GGAGAGACTC-3'	30.1
OPT-3	5'-TCCACTCCTG-3'	33.5
OPT-4	5'-CACAGAGGGA-3'	33.5
OPT-5	5'-GGGTTTGCCA-3'	37
OPT-6	5'-CAAGGCAGAG-3'	35.4
OPT-7	5'-GGCAGGCTGT-3'	41.6
OPT-8	5'-AACGGCGACA-3'	40.2
OPT-9	5'-CACCCCTGAG-3'	36.4
OPT-10	5'-CCTTCGGAAG-3'	32.6
OPT-11	5'-TTCCCGCGA-3'	43.9
OPT-12	5'-GGGTGTGTAG-3'	31.7
OPT-13	5'-AGGACTGCCA-3'	37.3
OPT-14	5'-AATGCCGCAG-3'	38.3
OPT-15	5'-GGATGCCACT-3'	35.5
OPT-16	5'-GGTGAACGCT-3'	36.9
OPT-17	5'-CCAACGTCGT-3'	37.1
OPT-18	5'-GATGCCAGAC-3'	33.2
OPT-19	5'-GTCCGTATGG-3'	32.2
OPT-20	5'-GACCAATGCC-3'	34.2

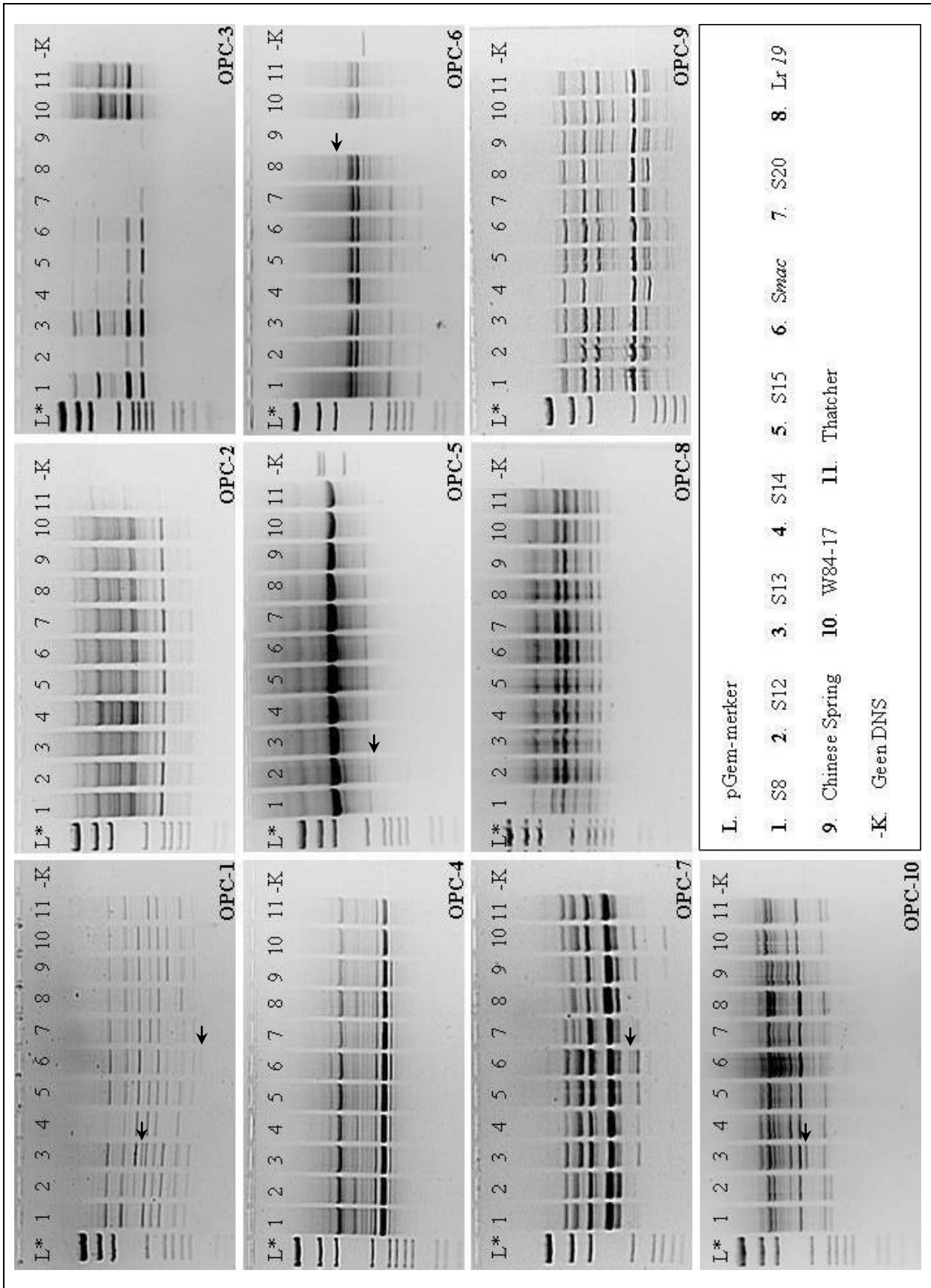
Kode	Nukleotiedvolgorde	Aanhegtings-temperatuur °C
Inleierstel OPU		
OPU-1	5'-ACGGACGTCA-3'	38.4
OPU-2	5'-CTGAGGTCTC-3'	30.6
OPU-3	5'-CTATGCCGAC-3'	33
OPU-4	5'-ACCTTCGGAC-3'	35
OPU-5	5'-TTGGCGGCCT-3'	45
OPU-6	5'-ACCTTTGCGG-3'	37.4
OPU-7	5'-CCTGCTCATC-3'	32.6
OPU-8	5'-GGCGAAGGT-3'	36.8
OPU-9	5'-CCACATCGGT-3'	35.5
OPU-10	5'-ACCTCGGCAC-3'	41.1
OPU-11	5'-AGACCCAGAG-3'	32.8
OPU-12	5'-TCACCAGCCA-3'	37.9
OPU-13	5'-GGCTGGTTCC-3'	38.3
OPU-14	5'-TGGGTCCCTC-3'	38.3
OPU-15	5'-ACGGGCCAGT-3'	43.7
OPU-16	5'-CTGCGCTGGA-3'	41.9
OPU-17	5'-ACCTGGGGAG-3'	38.2
OPU-18	5'-GAGGTCCACA-3'	34.1
OPU-19	5'-GTCAGTGC GG-3'	39.3
OPU-20	5'-ACAGCCCCCA-3'	42.9
Inleierstel OPV		
OPV-1	5'-TGACGCATGG-3'	37.1
OPV-2	5'-AGTCACTCCC-3'	33.4
OPV-3	5'-CTCCCTGCAA-3'	35.4
OPV-4	5'-CCCCTCACGA-3'	39.2
OPV-5	5'-TCCGAGAGGG-3'	38
OPV-6	5'-ACGCCAGGT-3'	43.7
OPV-7	5'-GAAGCCAGCC-3'	39
OPV-8	5'-GGACGGCGTT-3'	42.4
OPV-9	5'-TGTACCCGTC-3'	34.5
OPV-10	5'-GGACCTGCTG-3'	37.8
OPV-11	5'-CTCGACAGAG-3'	31.8
OPV-12	5'-ACCCCCACT-3'	41.4
OPV-13	5'-ACCCCTGAA-3'	36.3
OPV-14	5'-AGATCCCGCC-3'	40
OPV-15	5'-CAGTGCCGGT-3'	41.7
OPV-16	5'-ACACCCACACA-3'	37.7
OPV-17	5'-ACCGGCTTGT-3'	39.3
OPV-18	5'-TGGTGGCGTT-3'	39.9
OPV-19	5'-GGGTGTGCAG-3'	38.9
OPV-20	5'-CAGCATGGTC-3'	33.8

Tabel 4.1 vervolg. Tabel van die Operon inleierstelle gebruik met gedetailleerde inleiervolgorde informasie en die aanhegtingstemperature gebruik vir PKR-amplifisering. 'n Totaal van 260 RAPD-inleiers (13 stelle) is getoets.

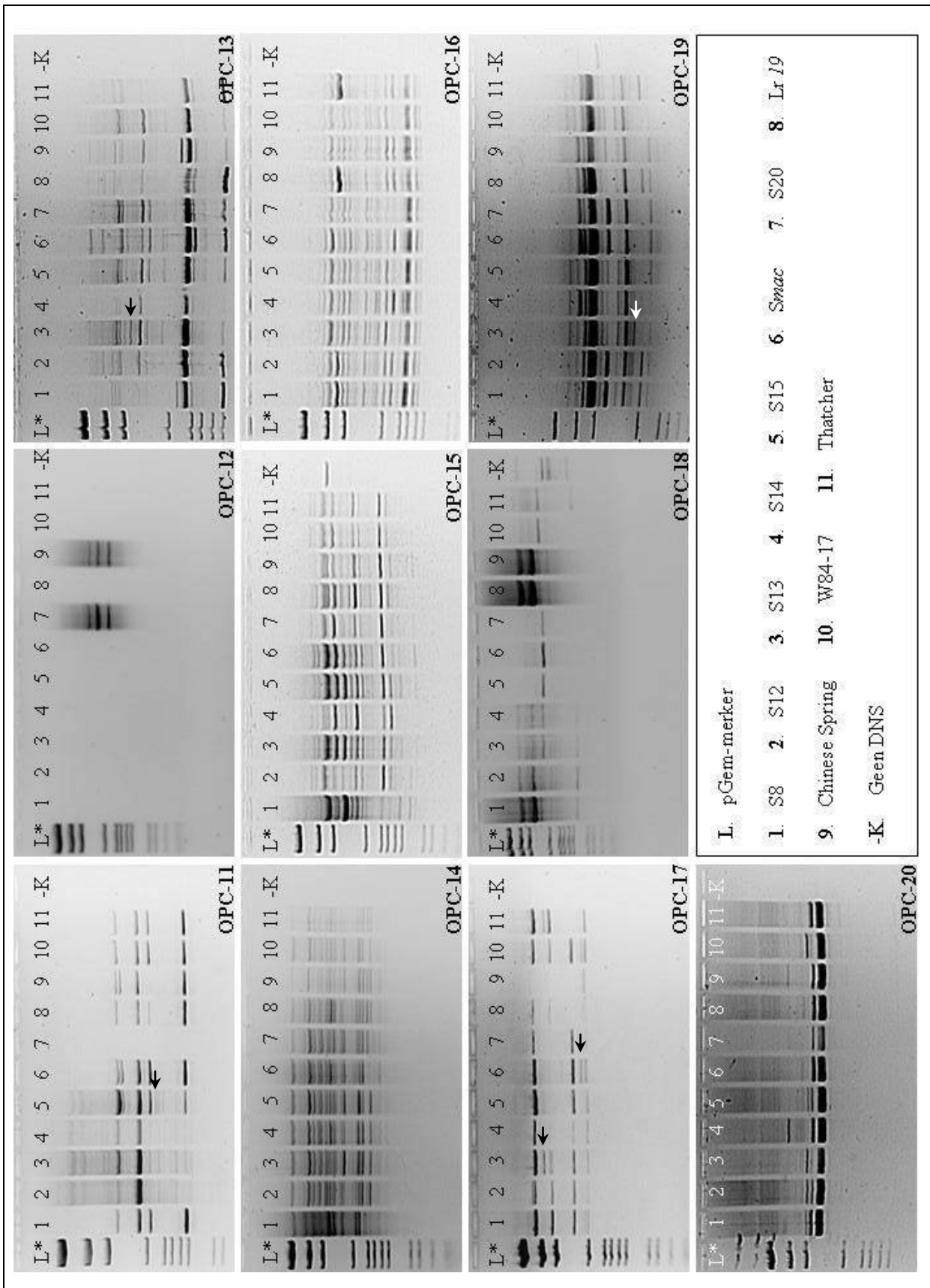
Kode	Nukleotiedvolgorde	Aanhegtings- temperatuur °C
Inleierstel OPW		
OPW-1	5'-CTCAGTGTCC-3'	31.8
OPW-2	5'-ACCCCGCCAA-3'	44.2
OPW-3	5'-GTCCGGAGTG-3'	37.4
OPW-4	5'-CAGAAGCGGA-3'	35.8
OPW-5	5'-GGCGGATAAG-3'	32.9
OPW-6	5'-AGGCCCGATG-3'	40.6
OPW-7	5'-CTGGACGTCA-3'	35.1
OPW-8	5'-GACTGCCTCT-3'	34.3
OPW-9	5'-GTGACCGAGT-3'	35.1
OPW-10	5'-TCGCATCCCT-3'	37.7
OPW-11	5'-CTGATGCGTG-3'	34.8
OPW-12	5'-TGGGCAGAAG-3'	35.4
OPW-13	5'-CACAGCGACA-3'	37.1
OPW-14	5'-CTGCTGAGCA-3'	36.3
OPW-15	5'-ACACCGGAAC-3'	36.1
OPW-16	5'-CAGCCTACCA-3'	34.2
OPW-17	5'-GTCCTGGGTT-3'	34.5
OPW-18	5'-TTCAGGGCAC-3'	36
OPW-19	5'-CAAAGCGCTG-3'	35.9
OPW-20	5'-TGTGGCAGCA-3'	39.9

4.2 ADDENDUM B: RAPD AMPLIFIKASIE PRODUKTE

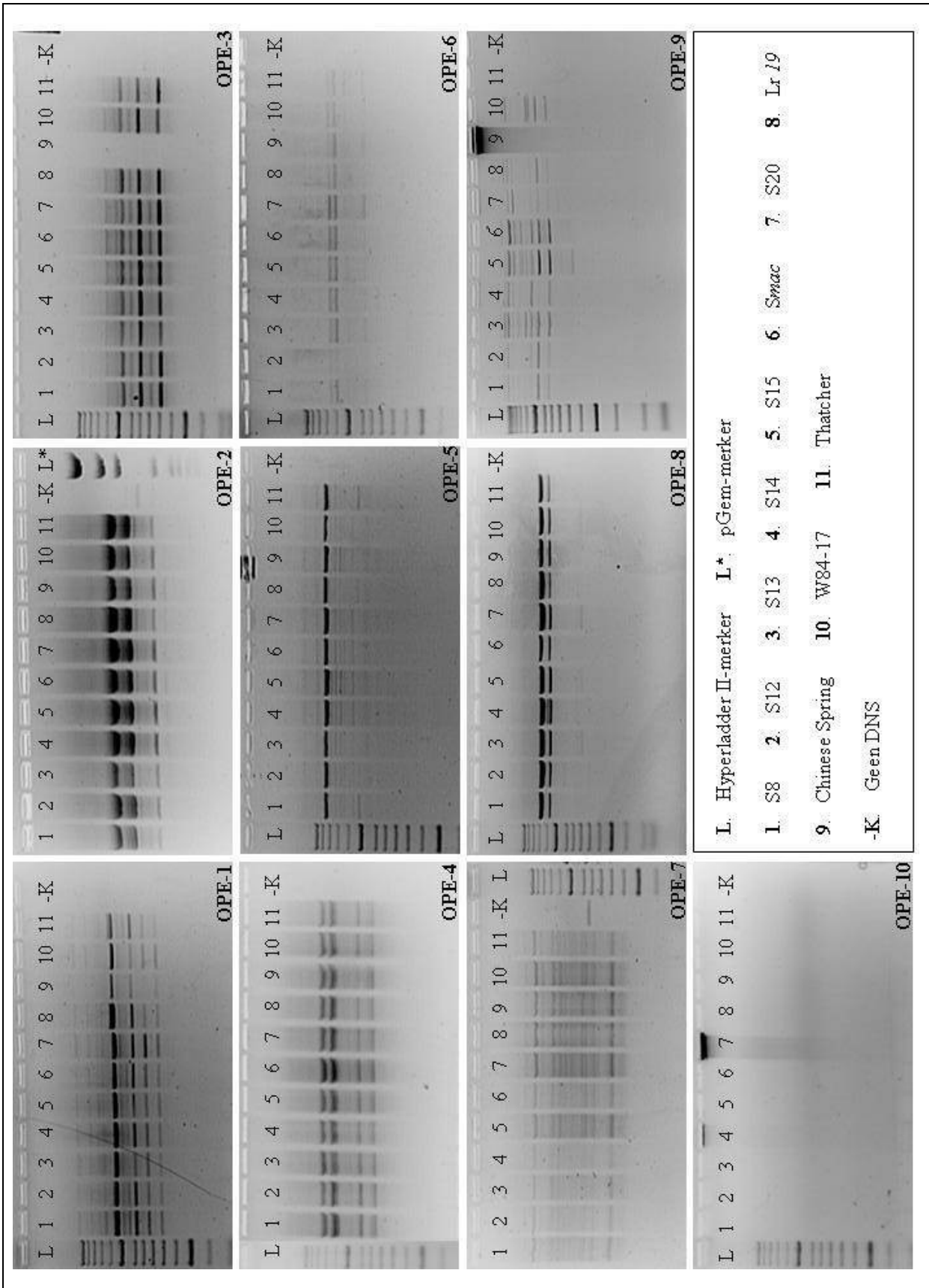
Fotos van amplifikasieprodukte geproduseer met 230 RAPD-inleierstelle (Tabel 4.1) in kombinasie met 'n aanvanklike siftingspaneel van elf genotipes (Tabel 2.1). Die genotipe kodes is soos volg: (1) = S8; (2) = S12; (3) = S13; (4) = S14; (5) = S15; (6) = Smac; (7) = S20; (8) = *Lr19*; (9) = Chinese Spring; (10) = W84-17 en (11) = Thatcher. PKR-produkte is geëlektroforeer op agarose jels en gekleur met ethidiumbromied en gevisualiseer onder UV-lig. “Hyperladder II” of pGem is as molekulêre basispaargrootte merker gebruik



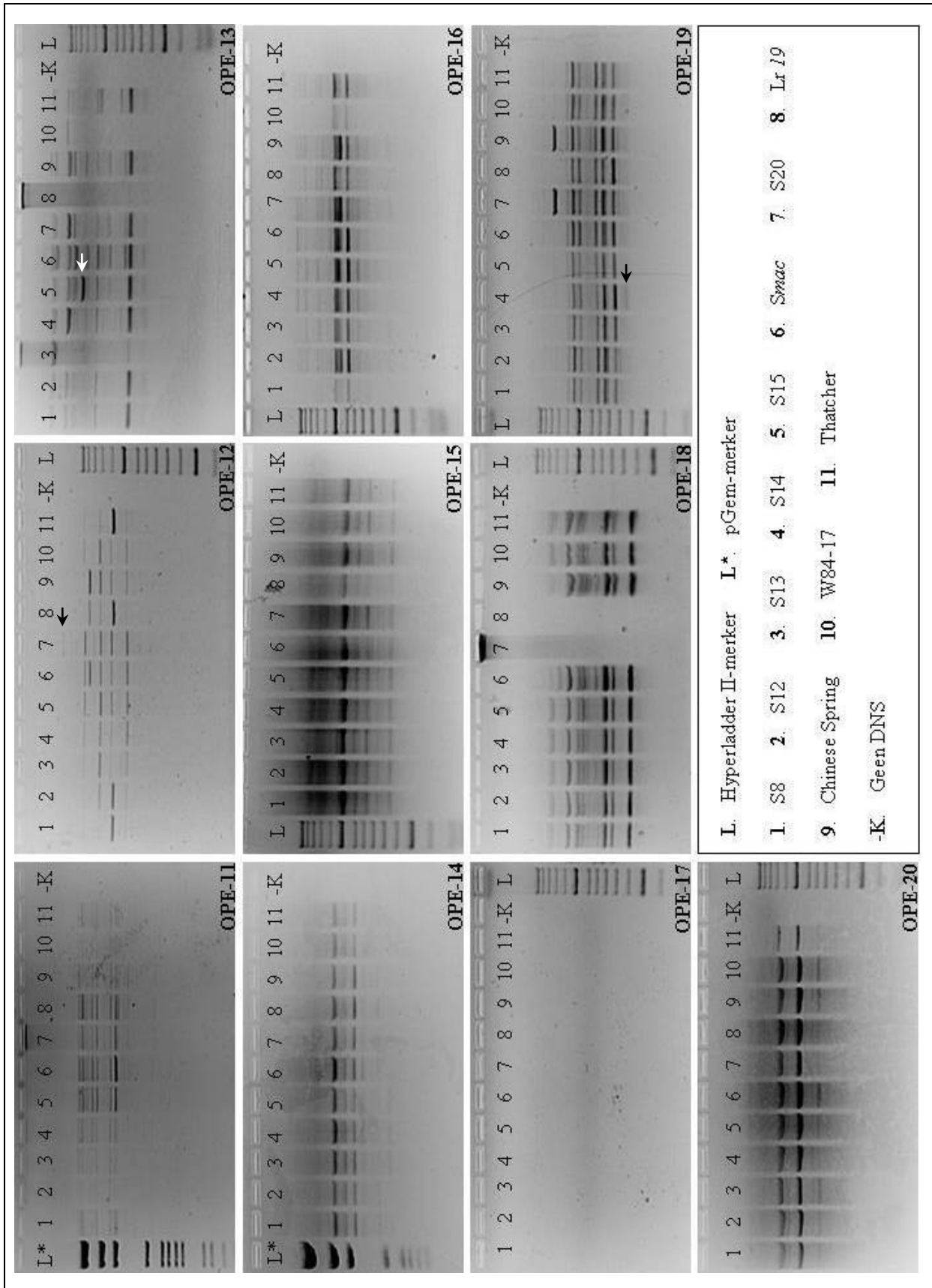
Figuur 4.1. OPC-1 tot OPC-10



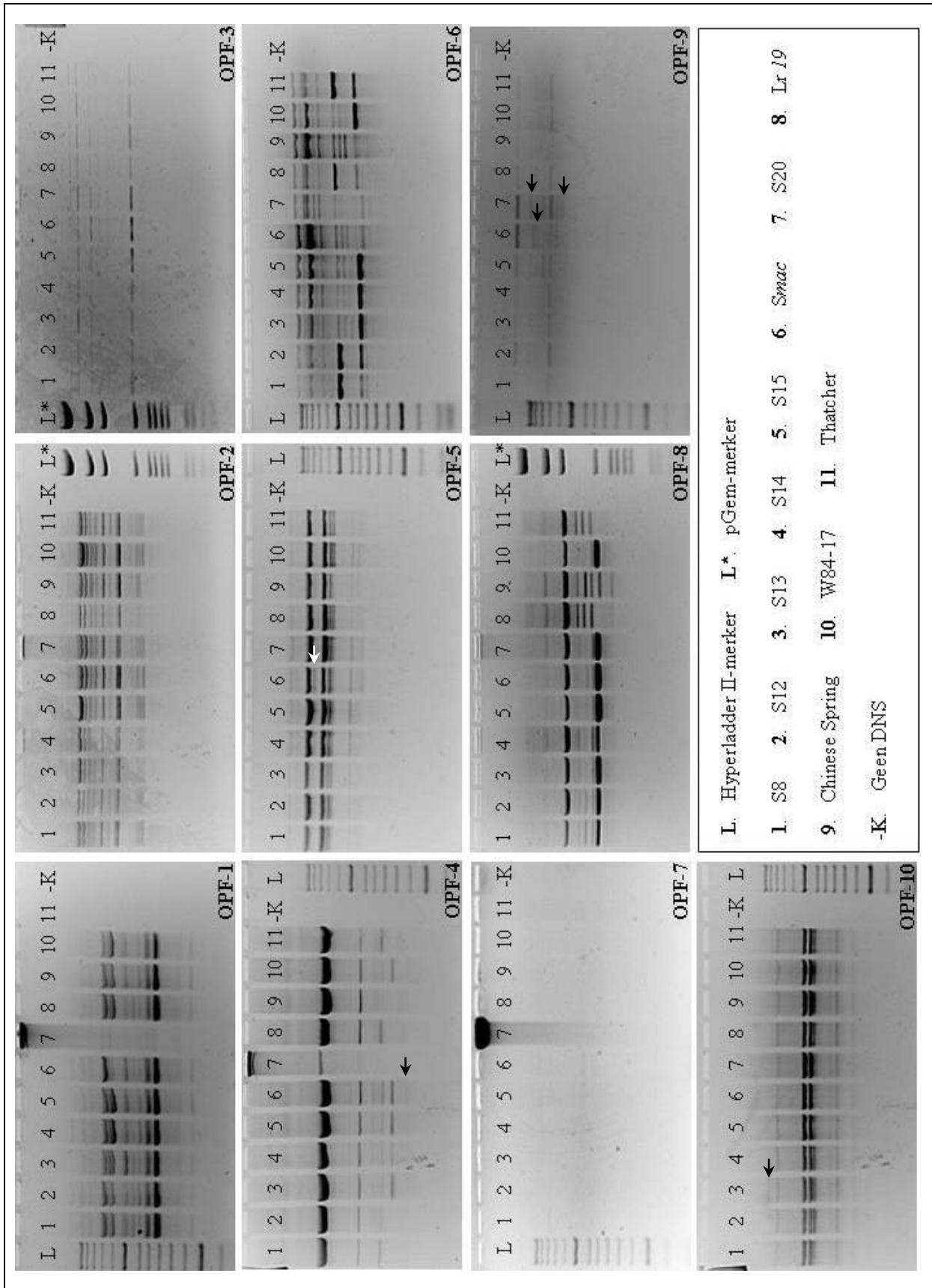
Figuur 4.2. OPC-10 tot OPC-20



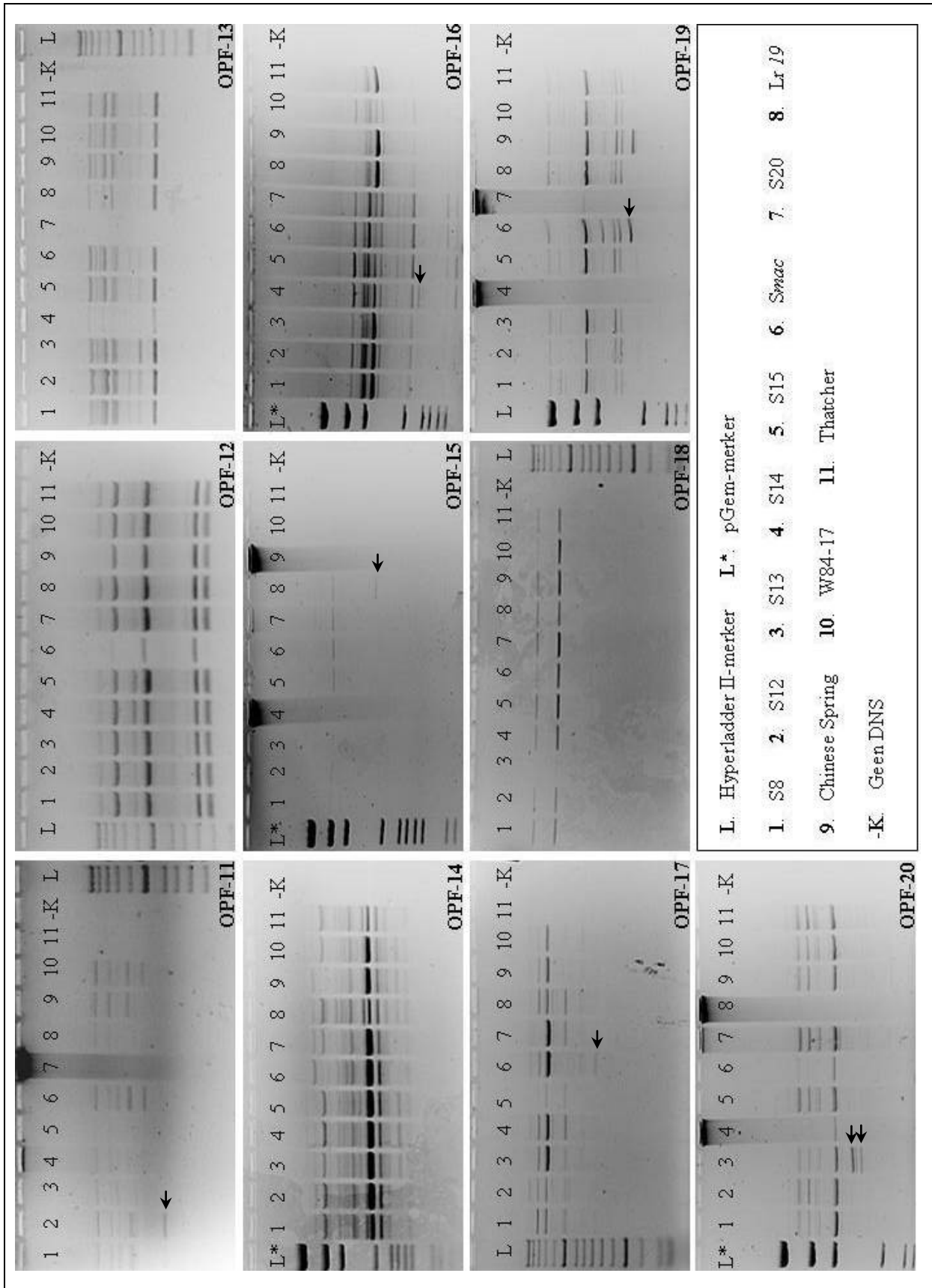
Figuur 4.3. OPE-1 tot OPE-10



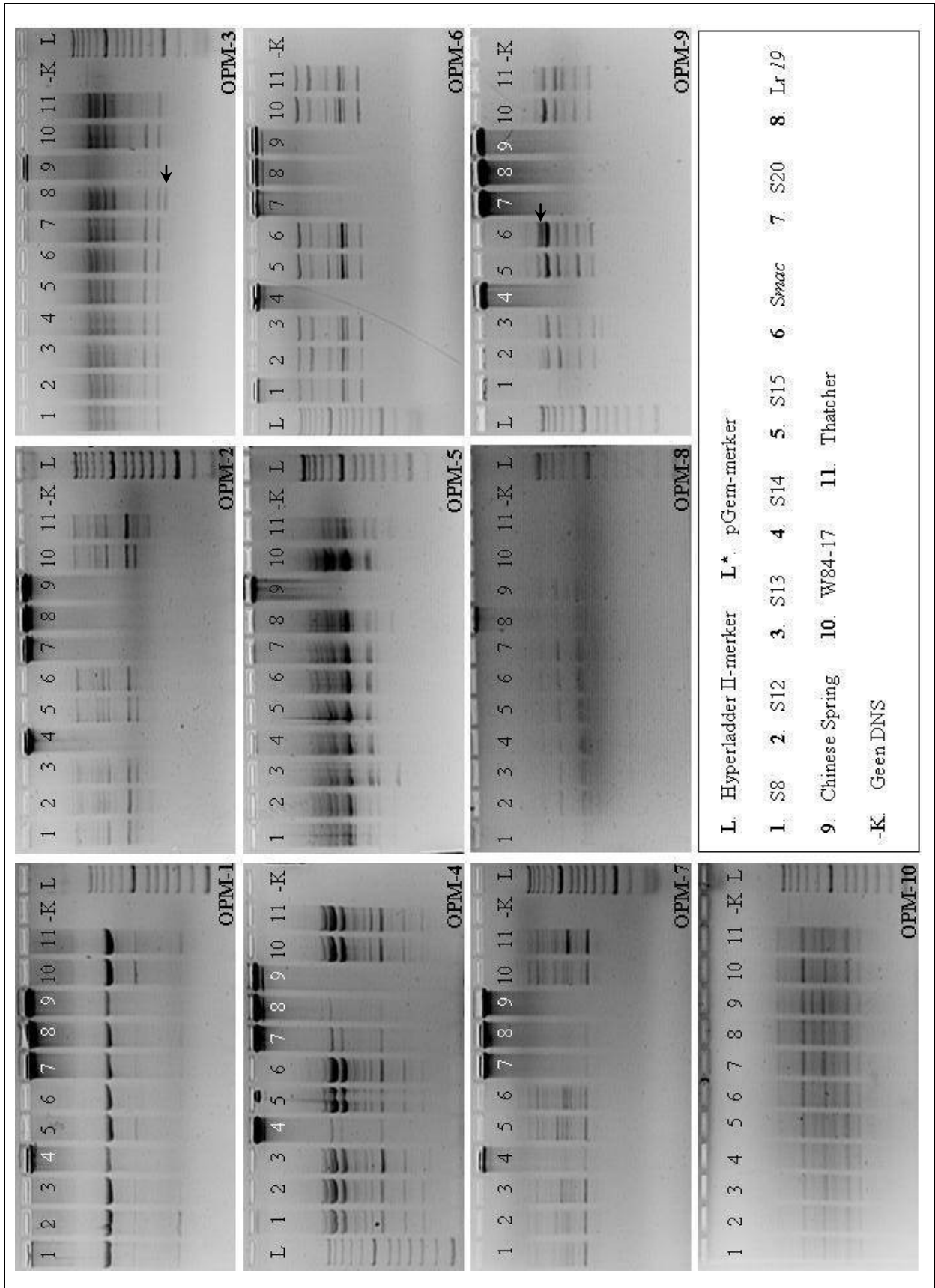
Figuur 4.4. OPE-11 tot OPE-20



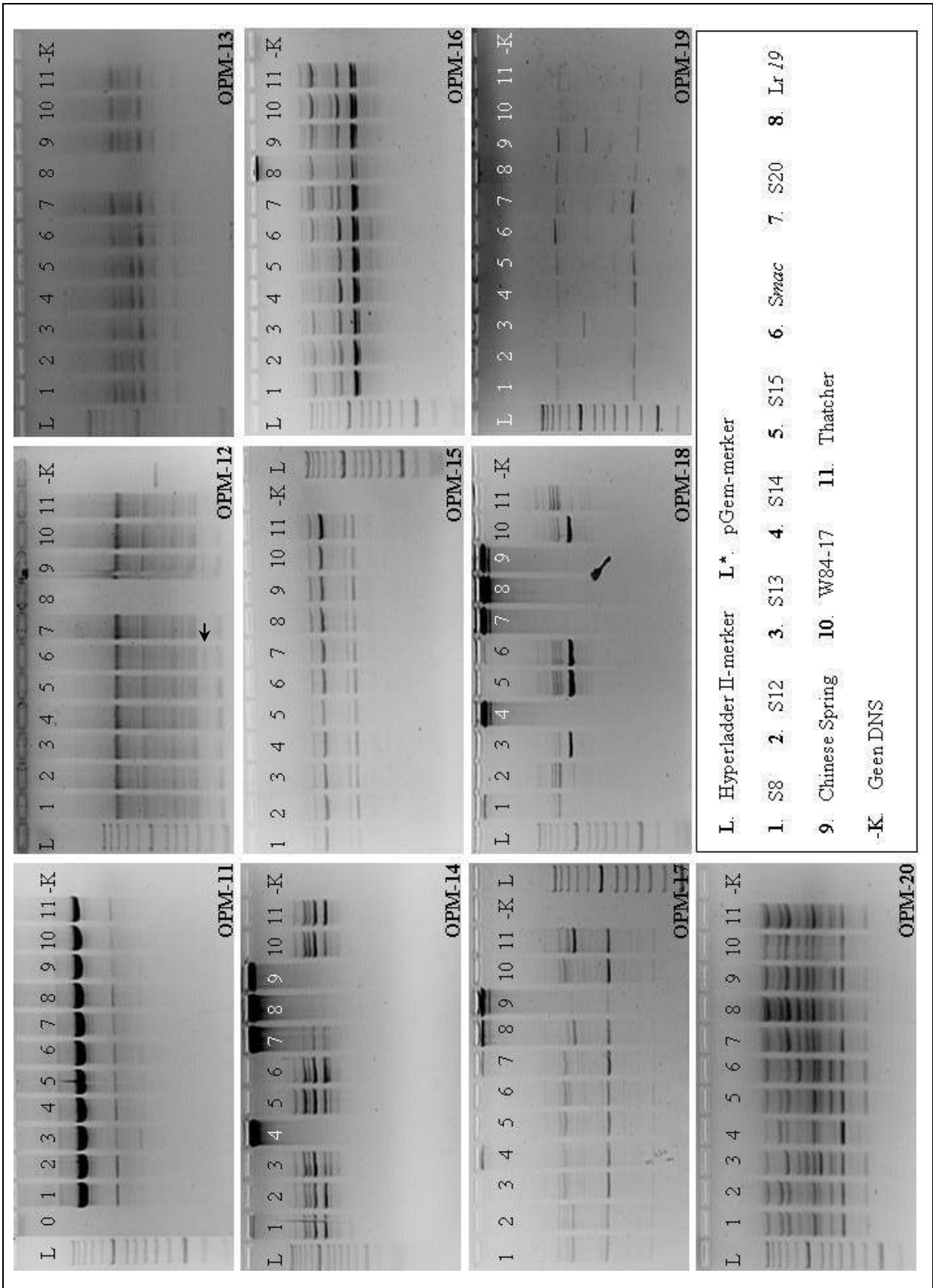
Figuur 4.5. OPF-1 tot OPF-10



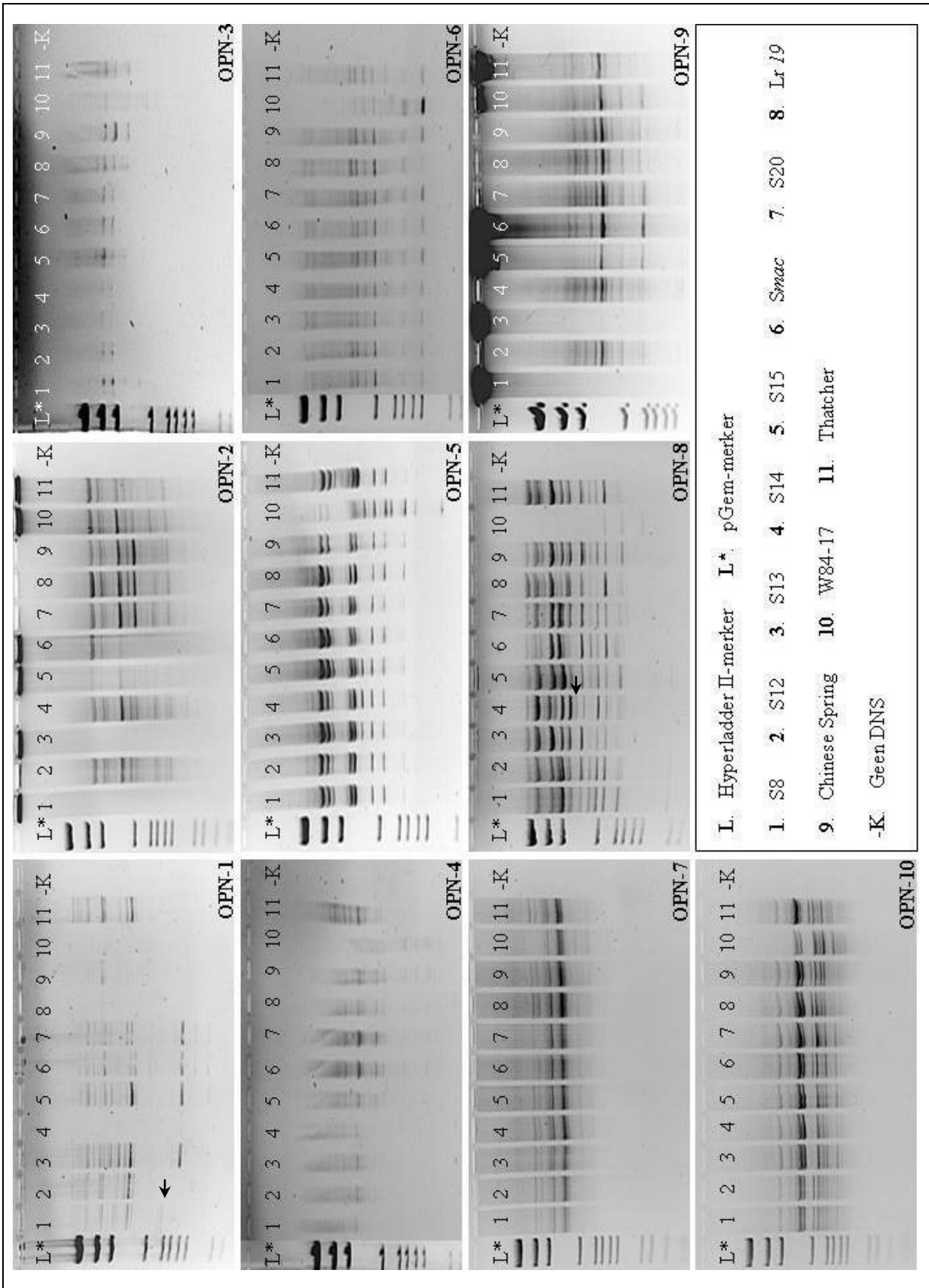
Figuur 4.6. OPF-11 tot OPF-20



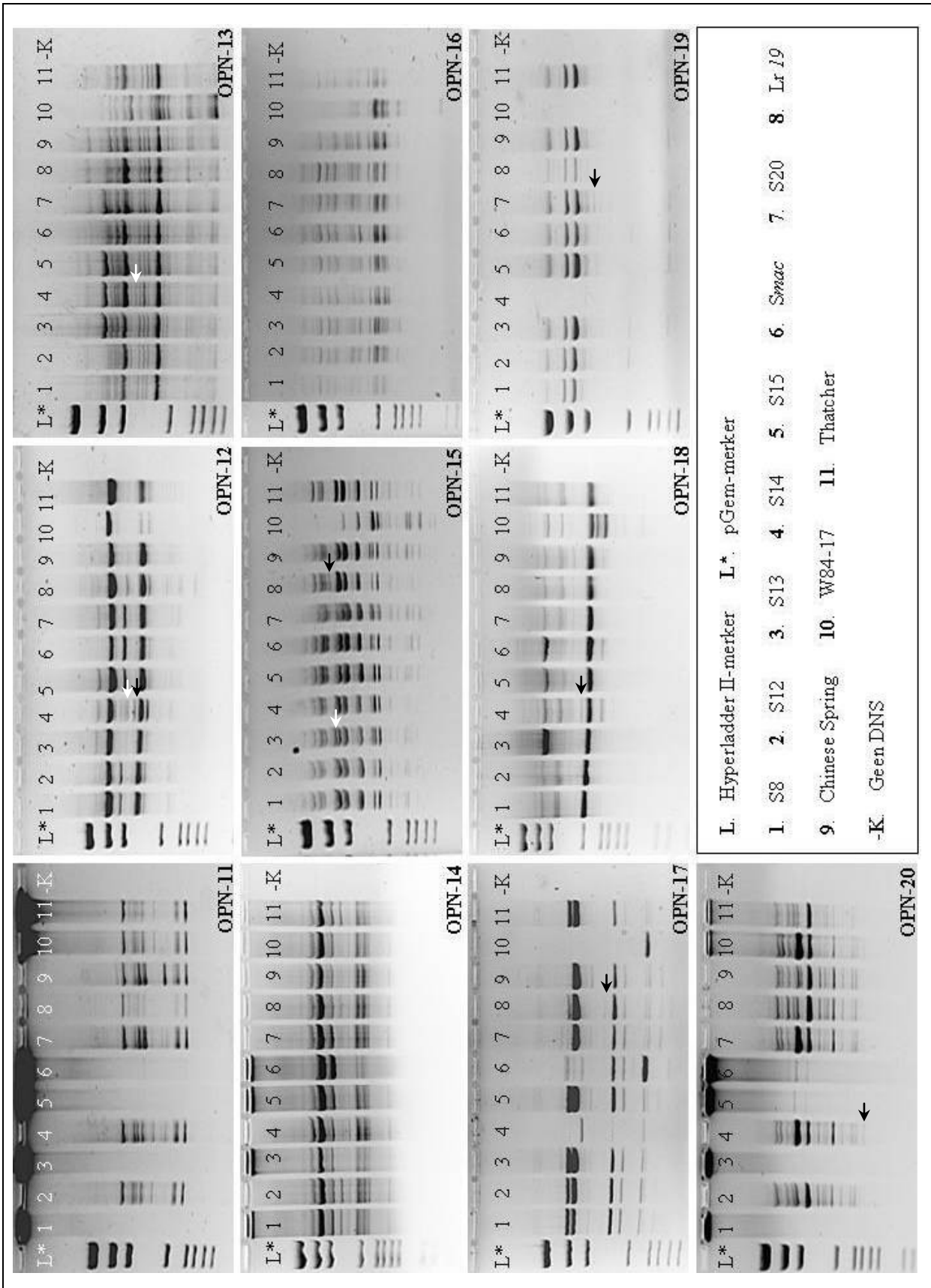
Figuur 4.7. OPM-1 tot OPM-10



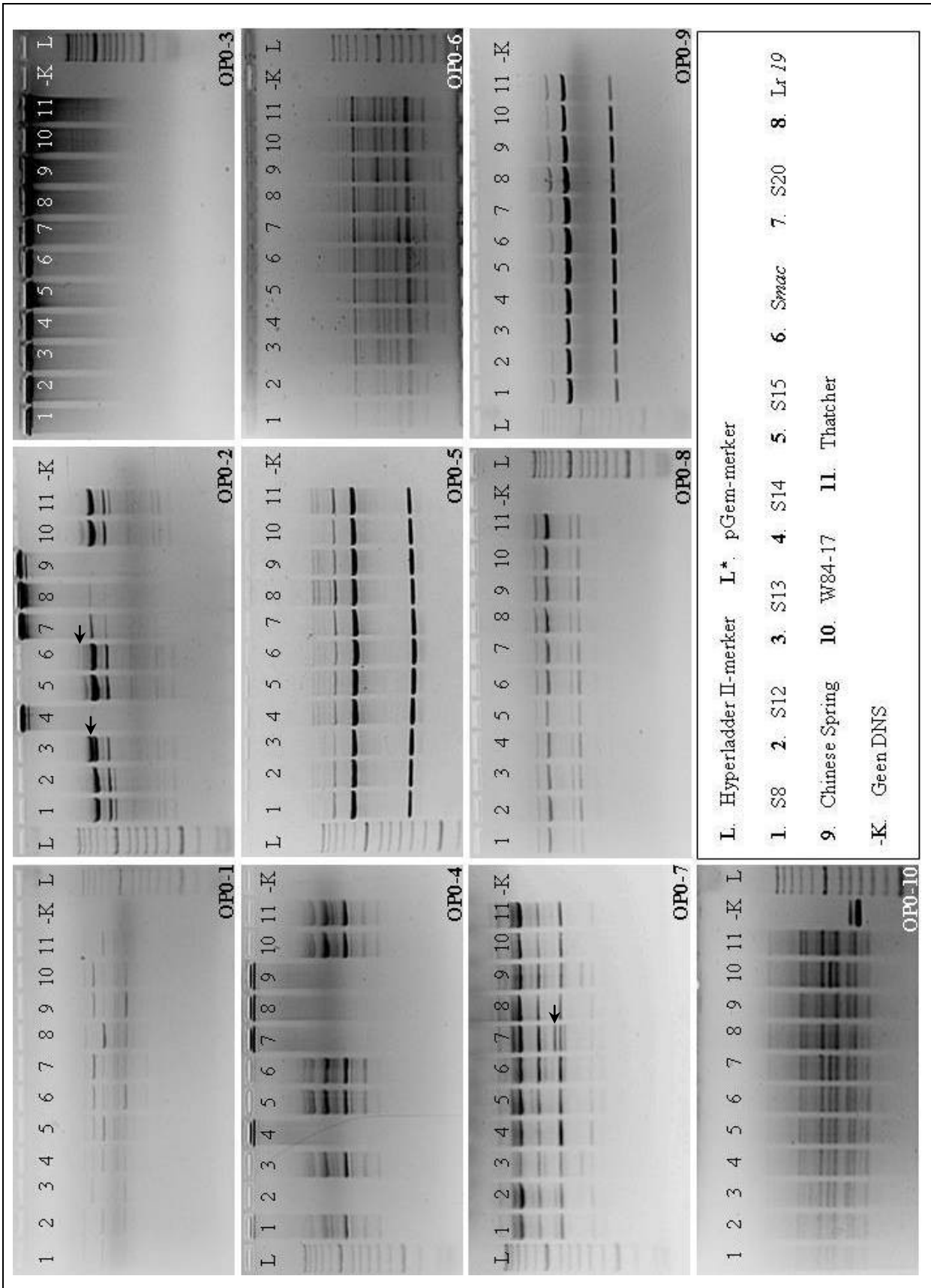
Figuur 4.8. OPM-11 tot OPM-20



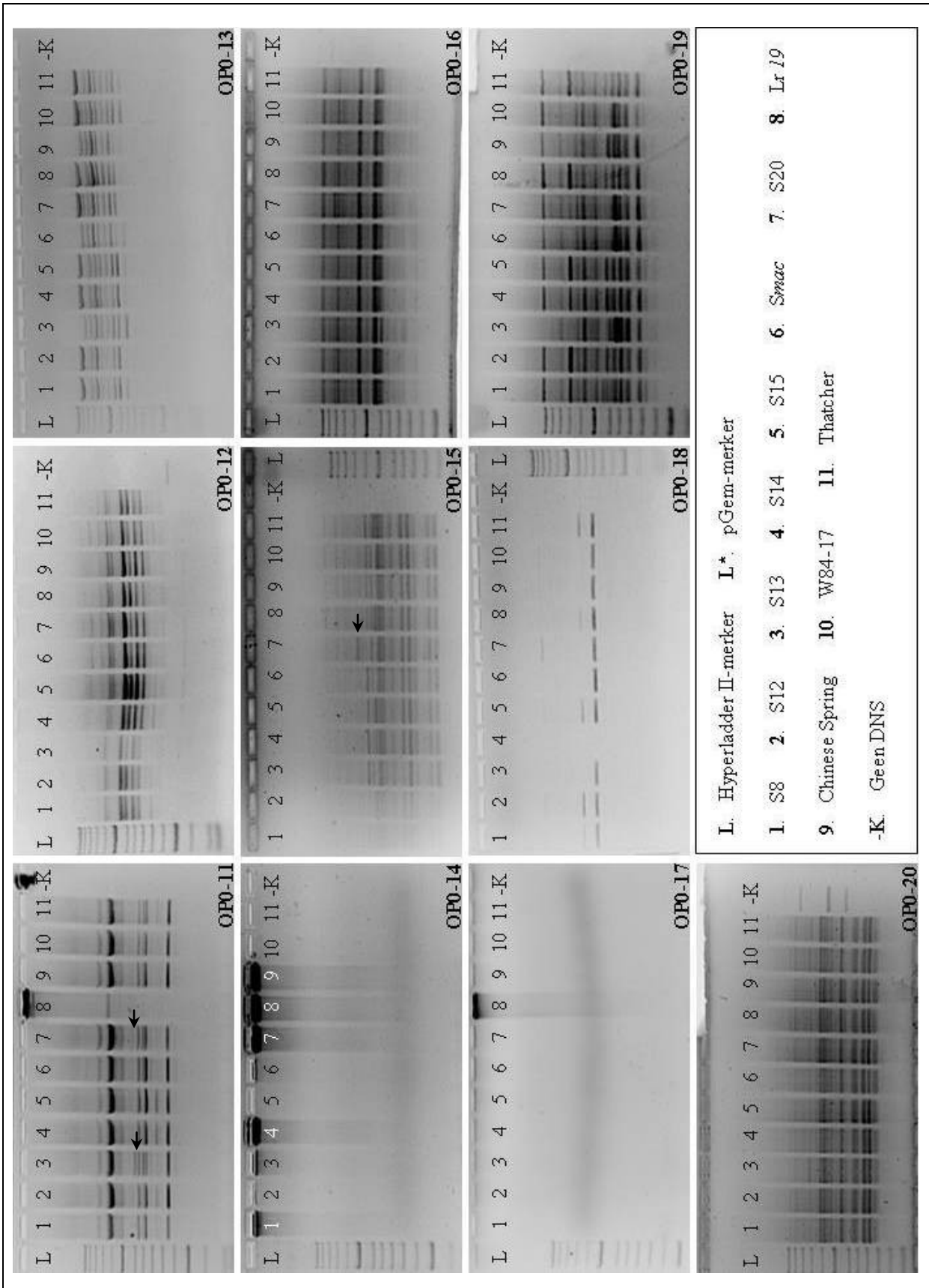
Figuur 4.9. OPN-1 tot OPN-10



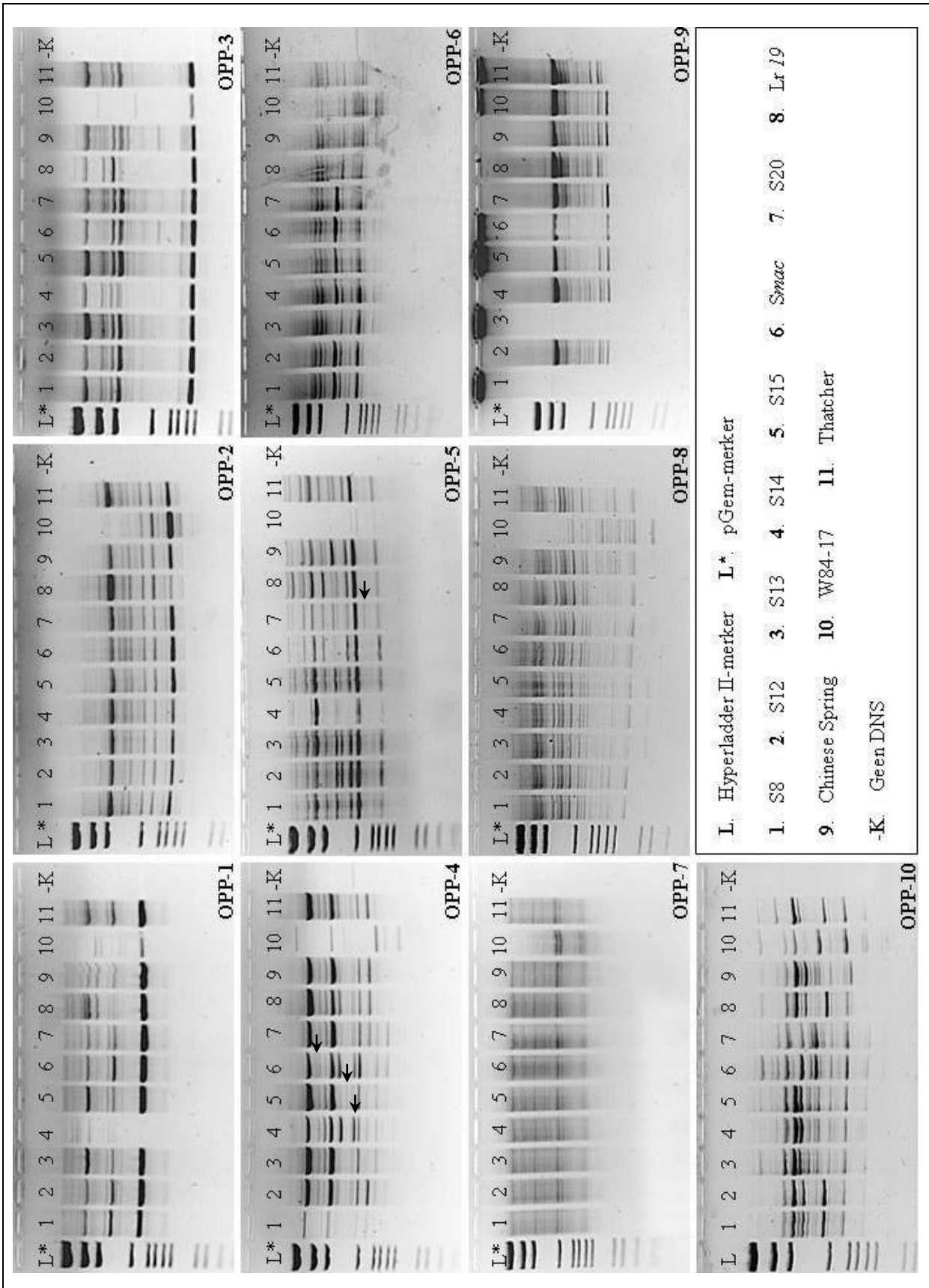
Figuur. 4.10. OPN-11 tot OPN-20



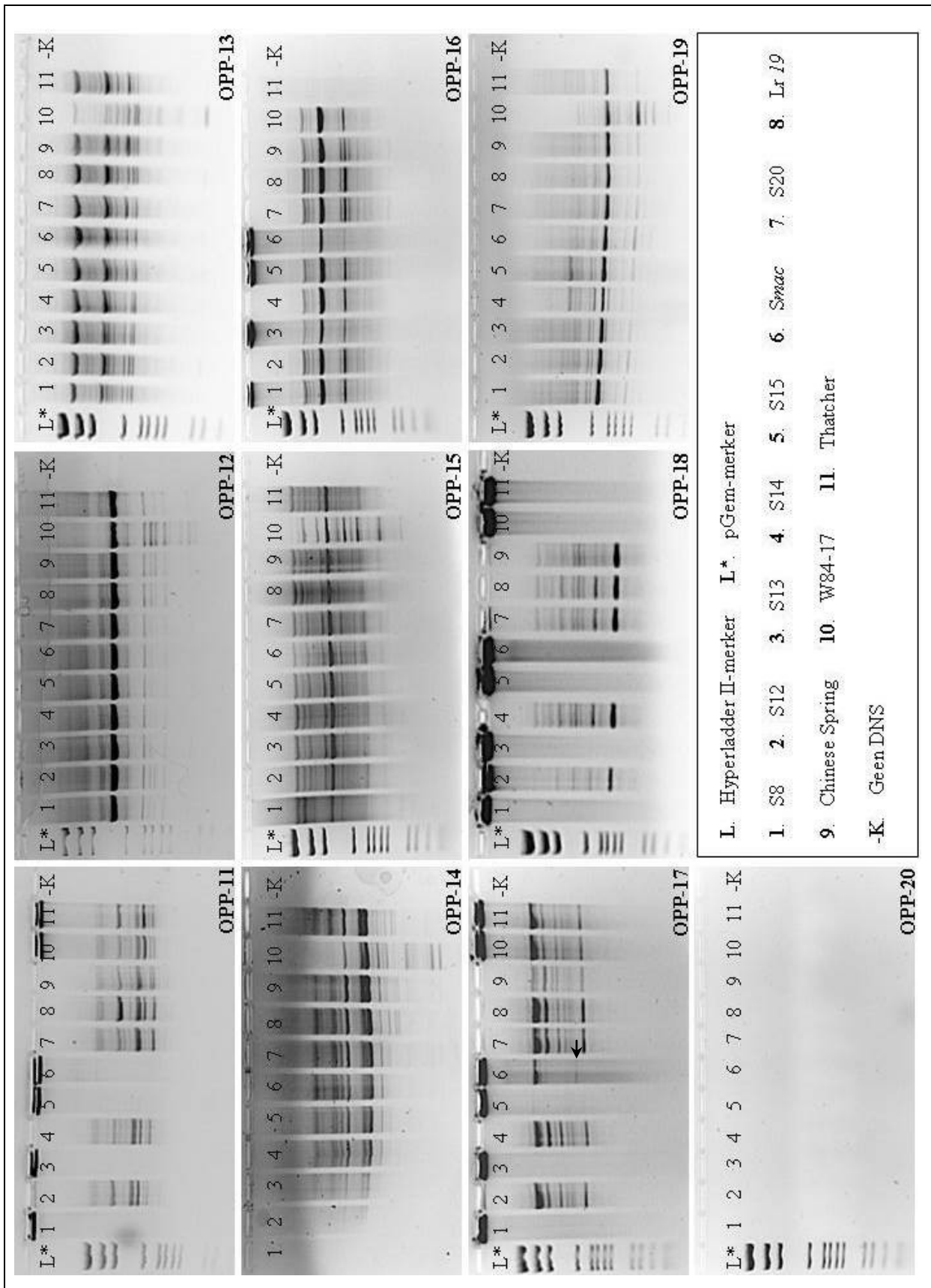
Figuur 4.11. OPO-1 tot OPO-11



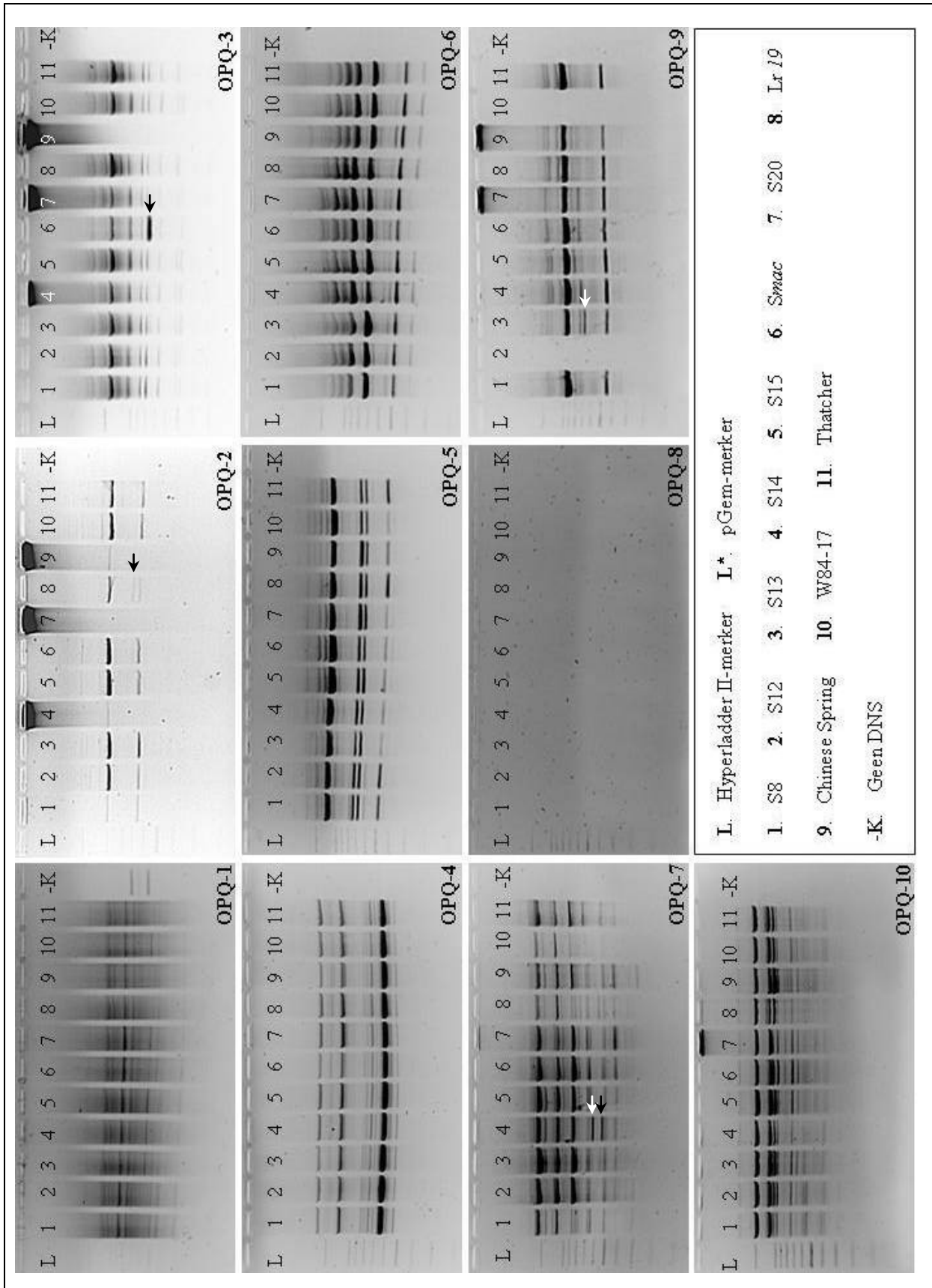
Figuur 4.12. OPO-11 tot OPO-20



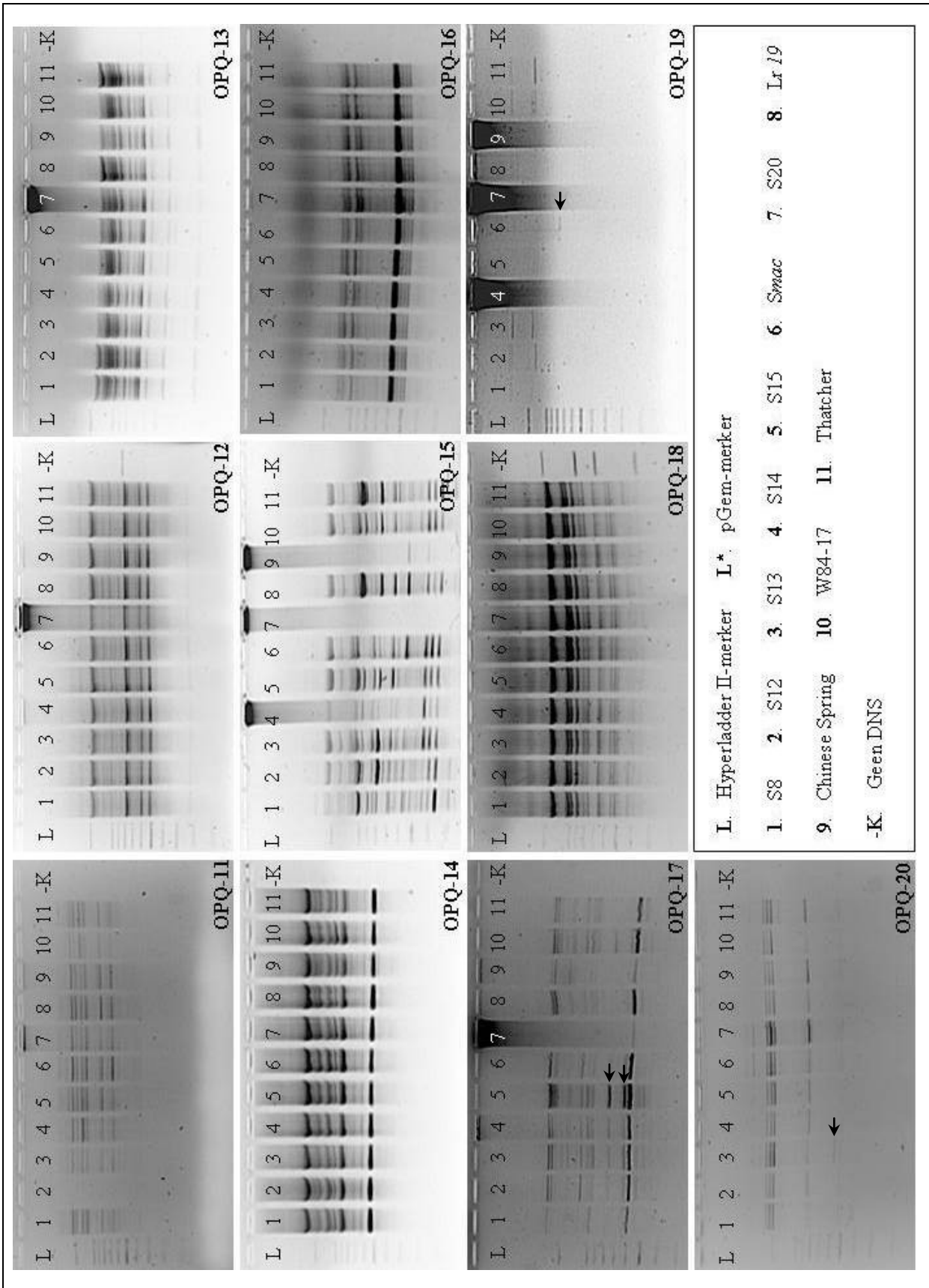
Figuur 4.13. OPP-1 tot OPP-10



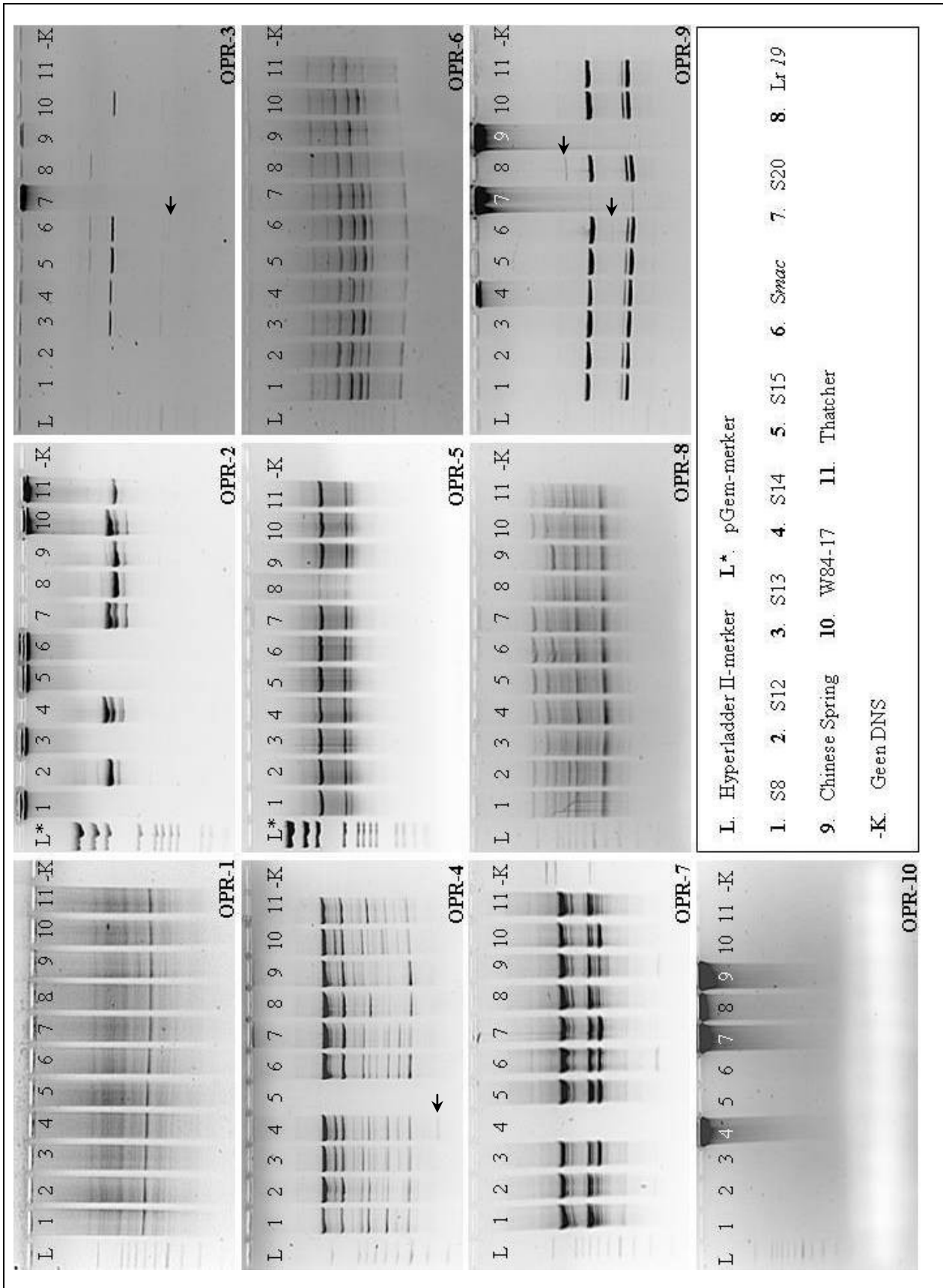
Figuur 4.14. OPP-11 tot OPP-20



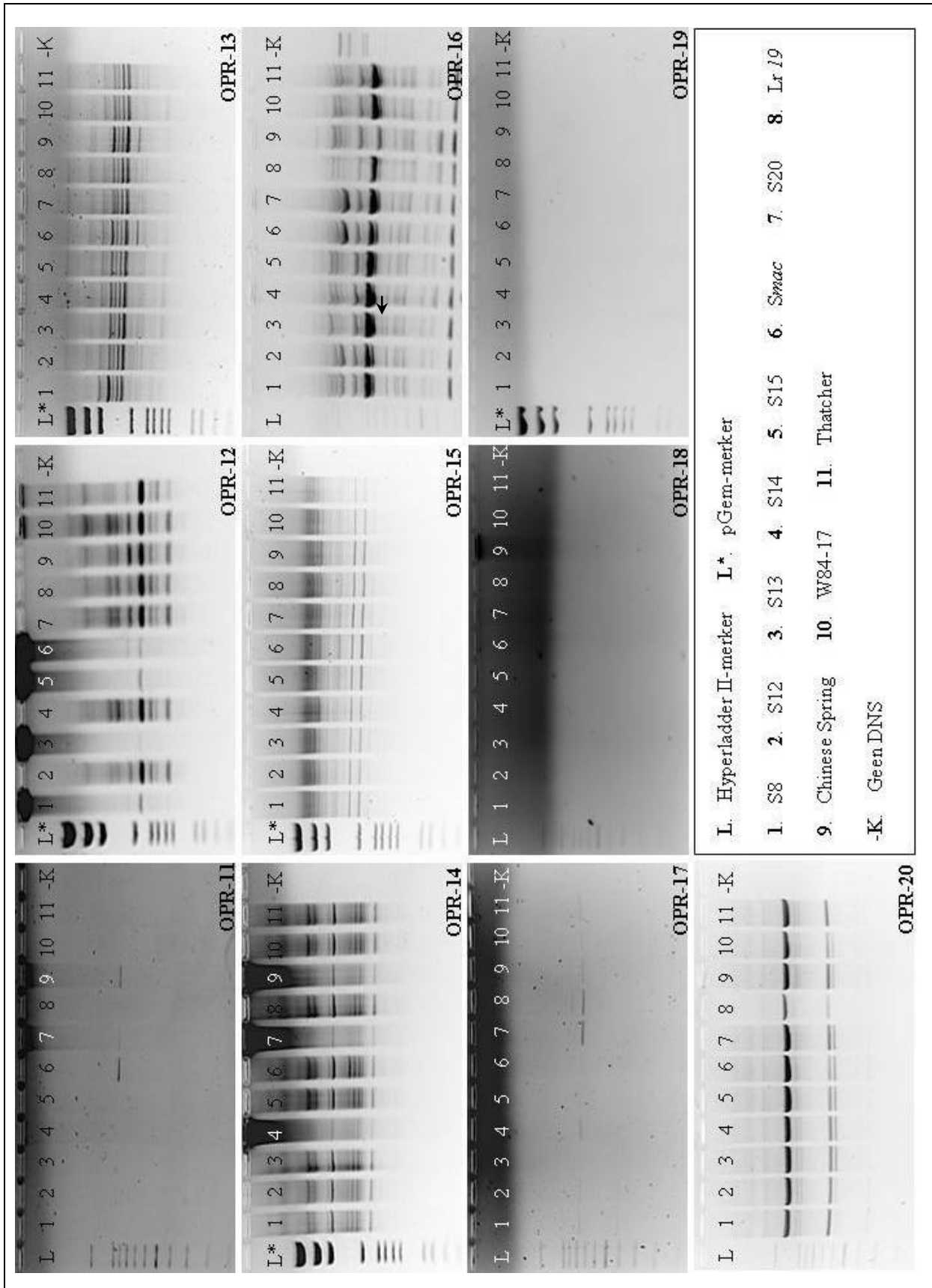
Figuur 4.15. OPQ-1 tot OPQ-10



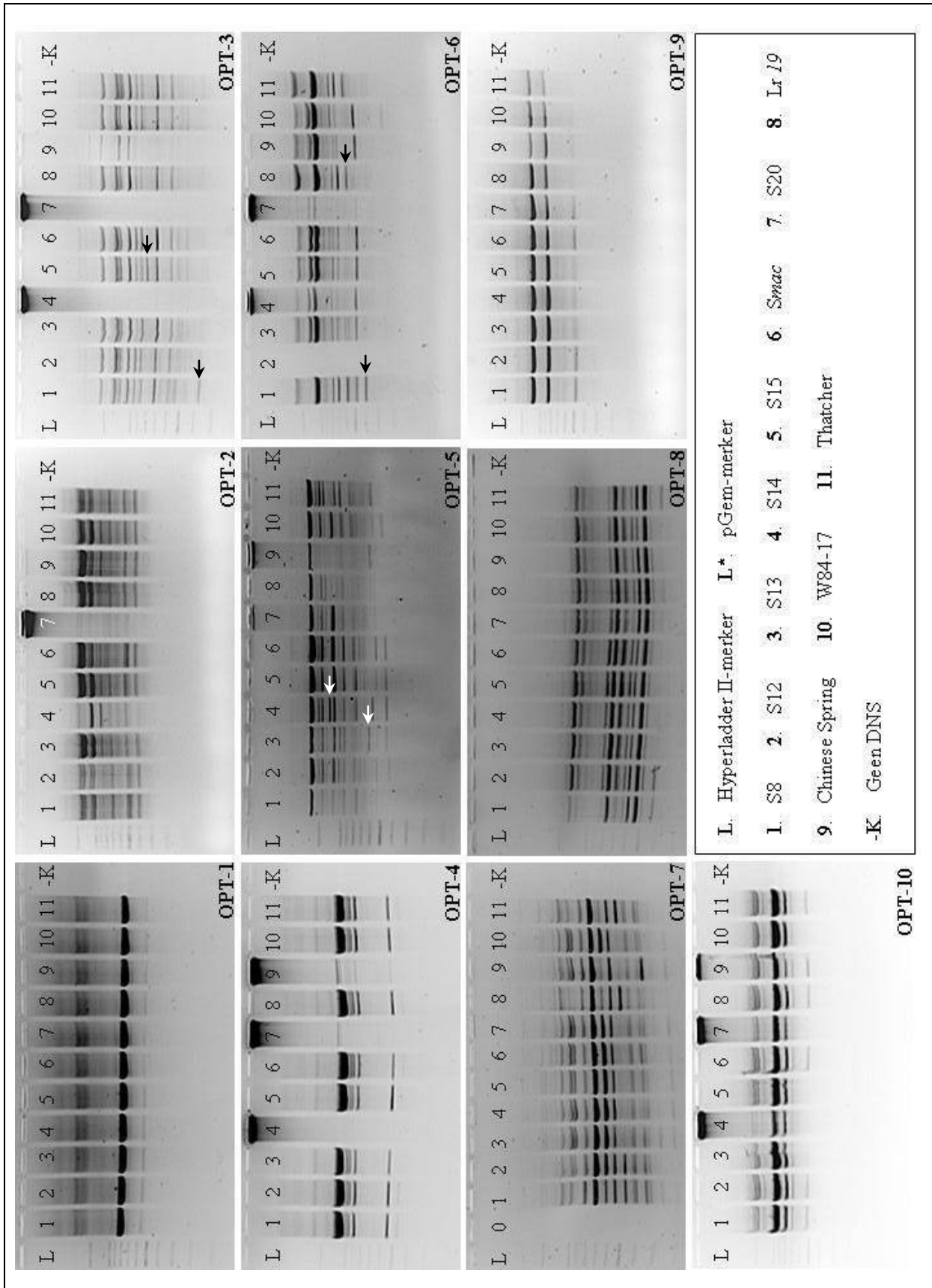
Figuur 4.16. OPQ-11 tot OPQ-20



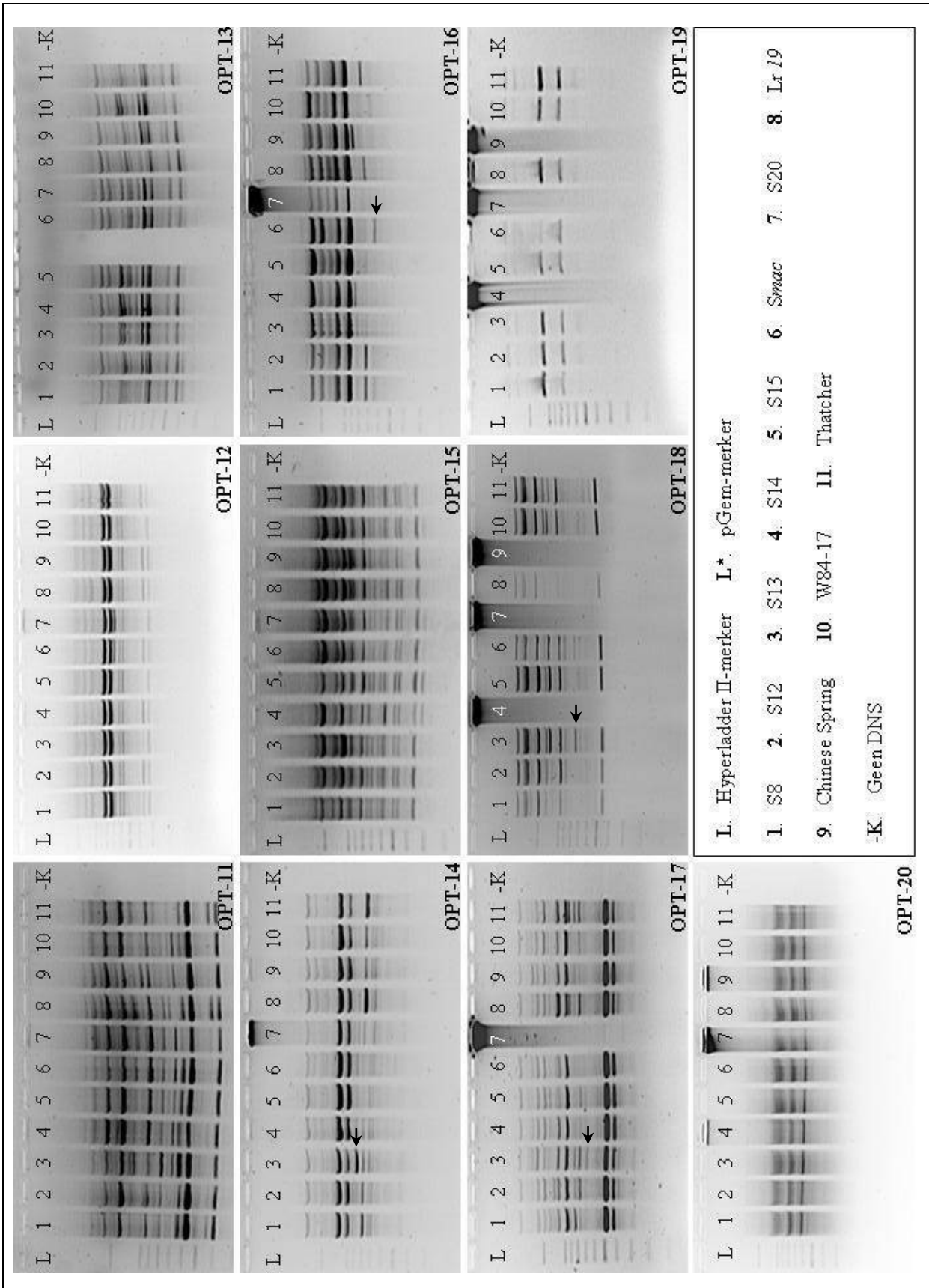
Figuur 4.17. OPR-1 tot OPR-10



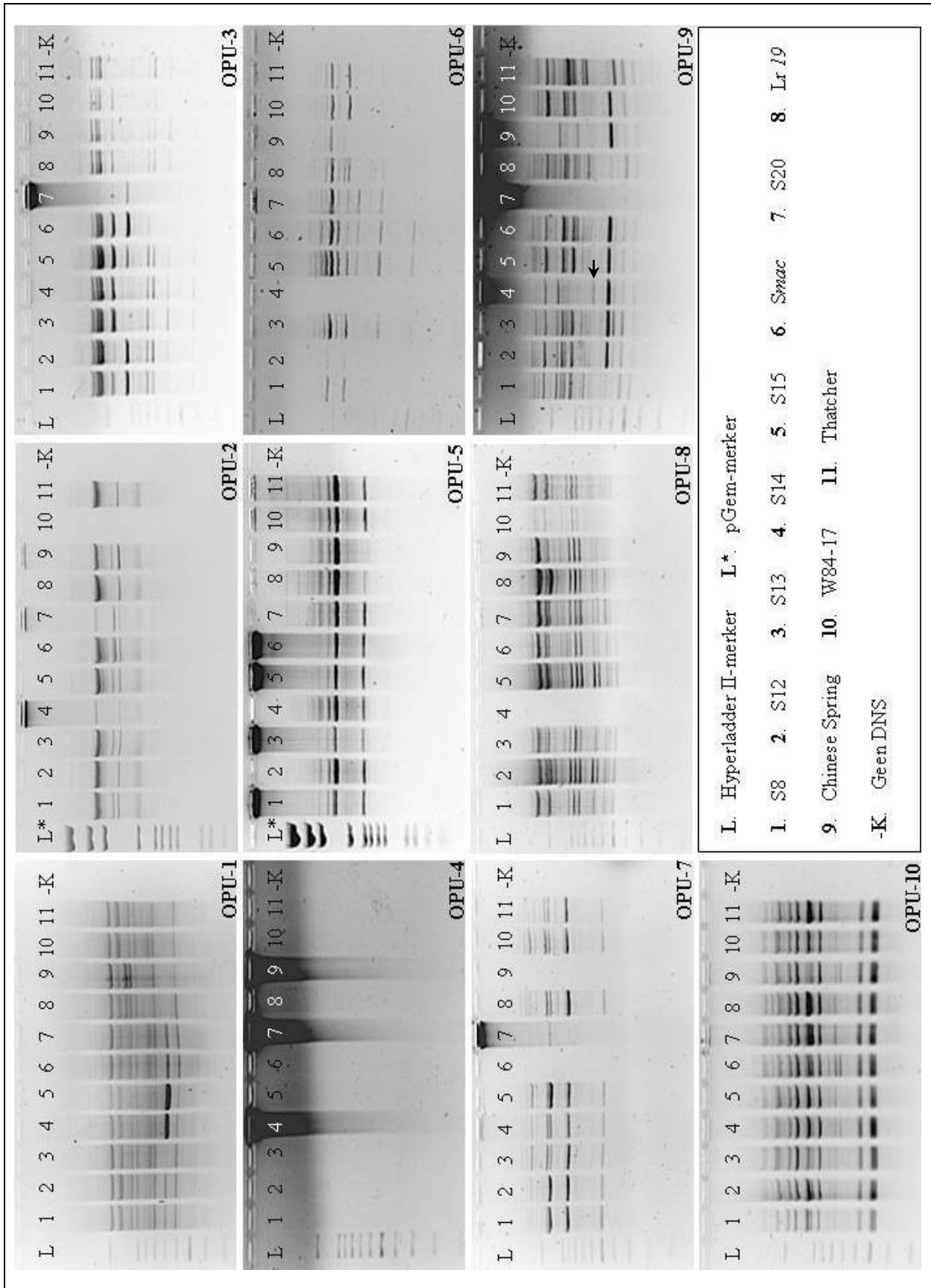
Figuur 4.18. OPR-11 tot OPR-20



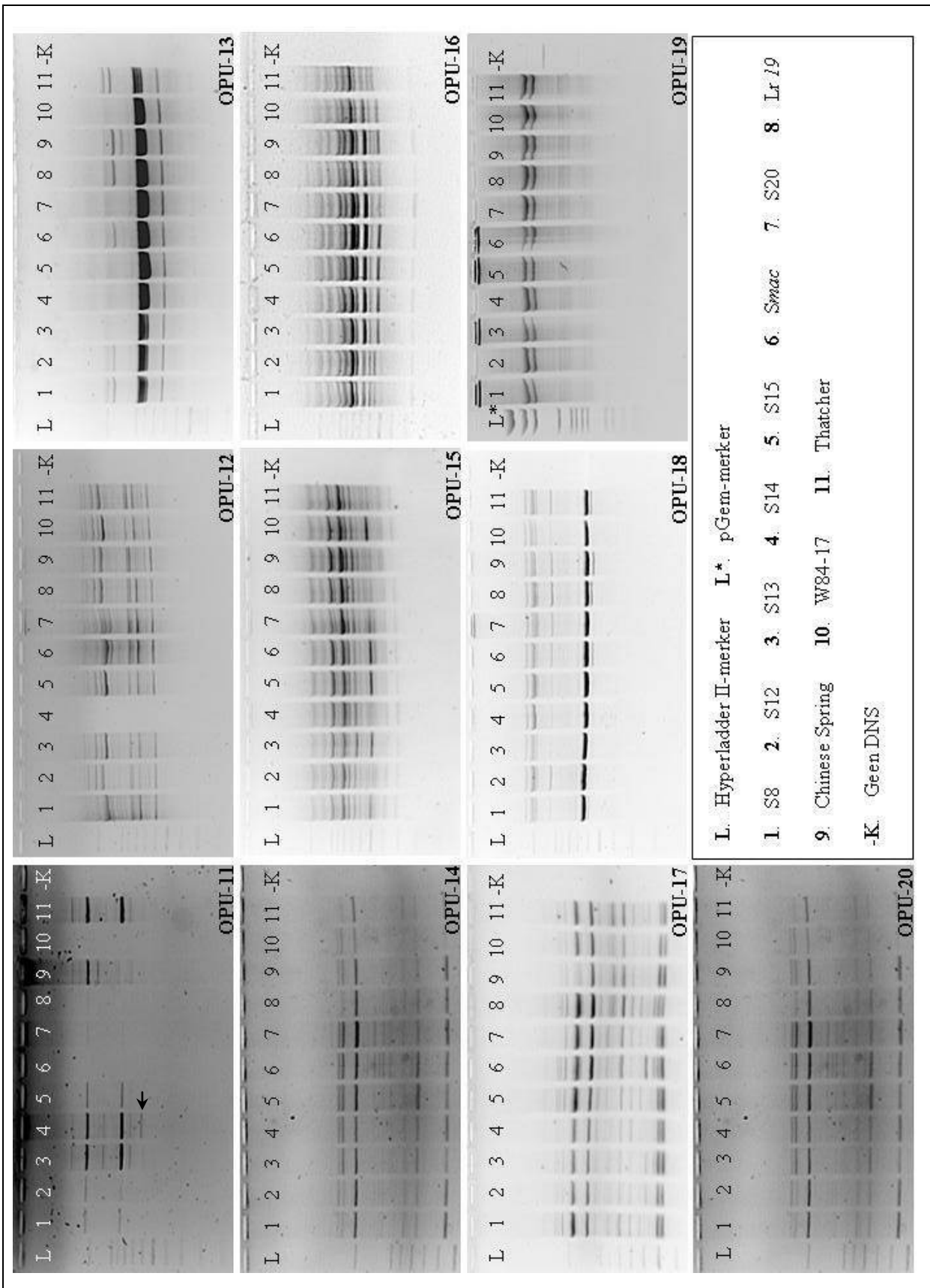
Figuur 4.19. OPT-1 tot OPT-10



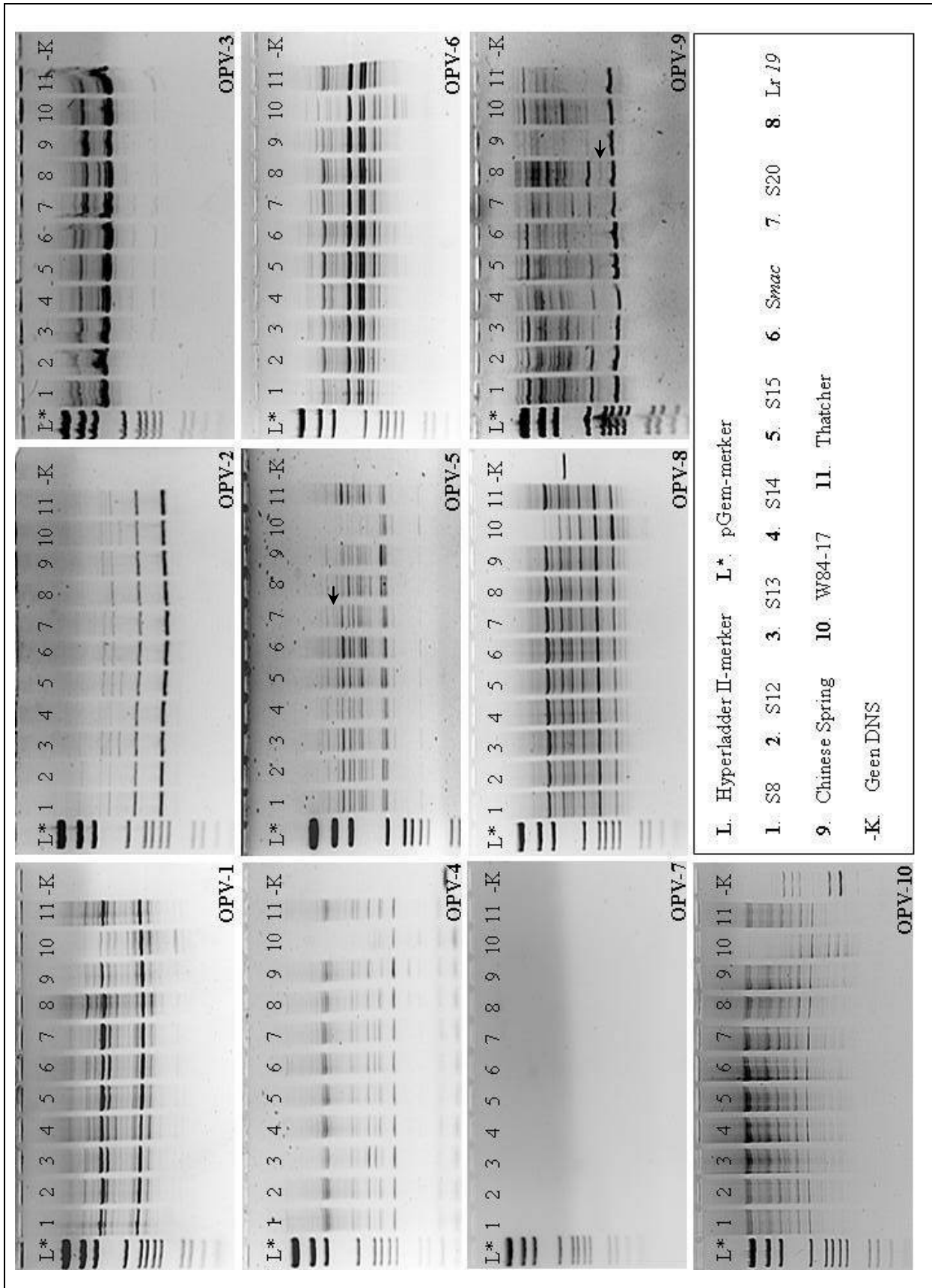
Figuur 4.20. OPT-11 tot OPT-20



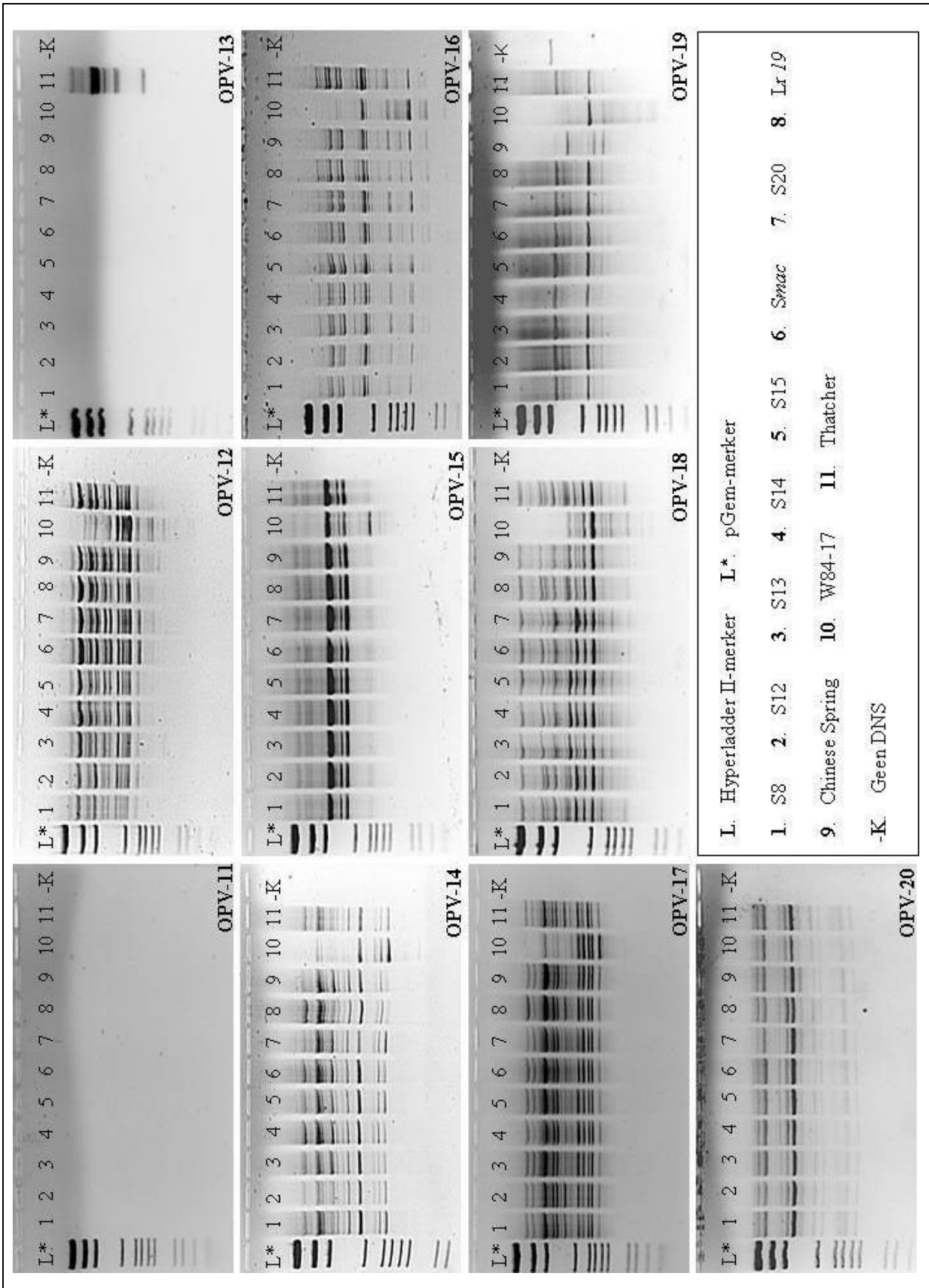
Figuur 4.21. OPU-1 tot OPU-10



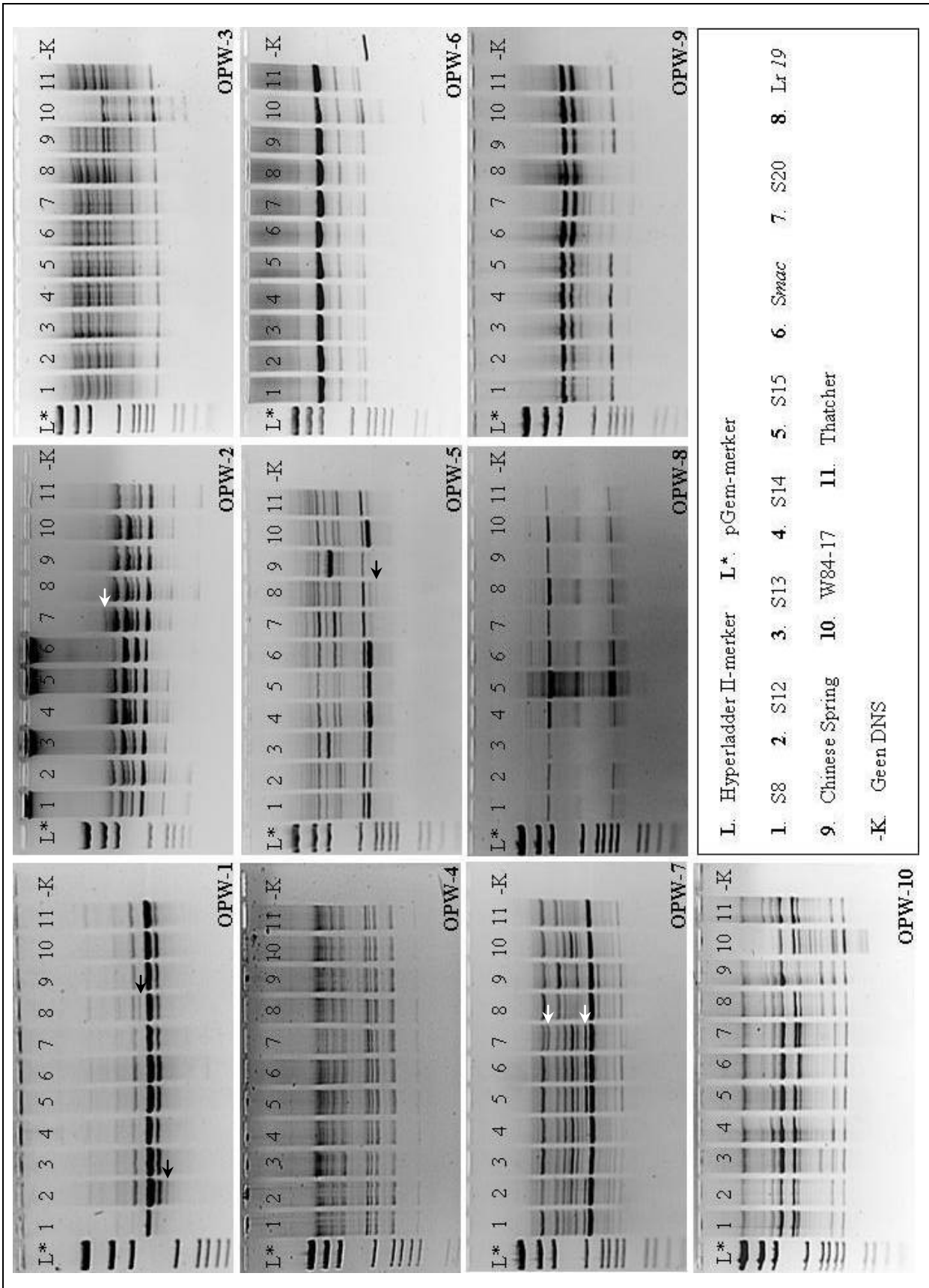
Figuur 4.22. OPU-11 tot OPU-20



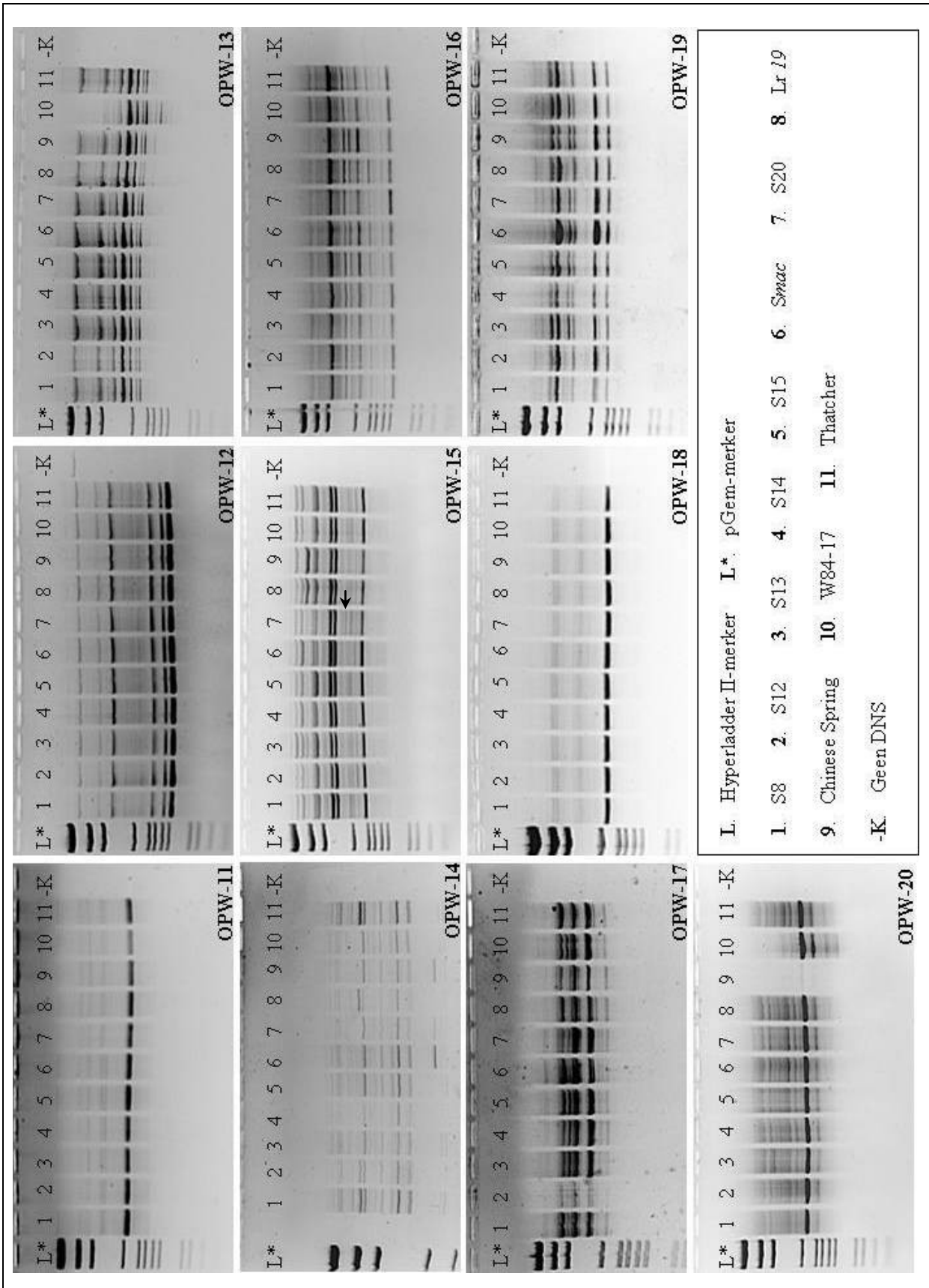
Figuur 4.23. OPV-1 tot OPV-10



Figuur 4.24. OPV-11 tot OPV-20



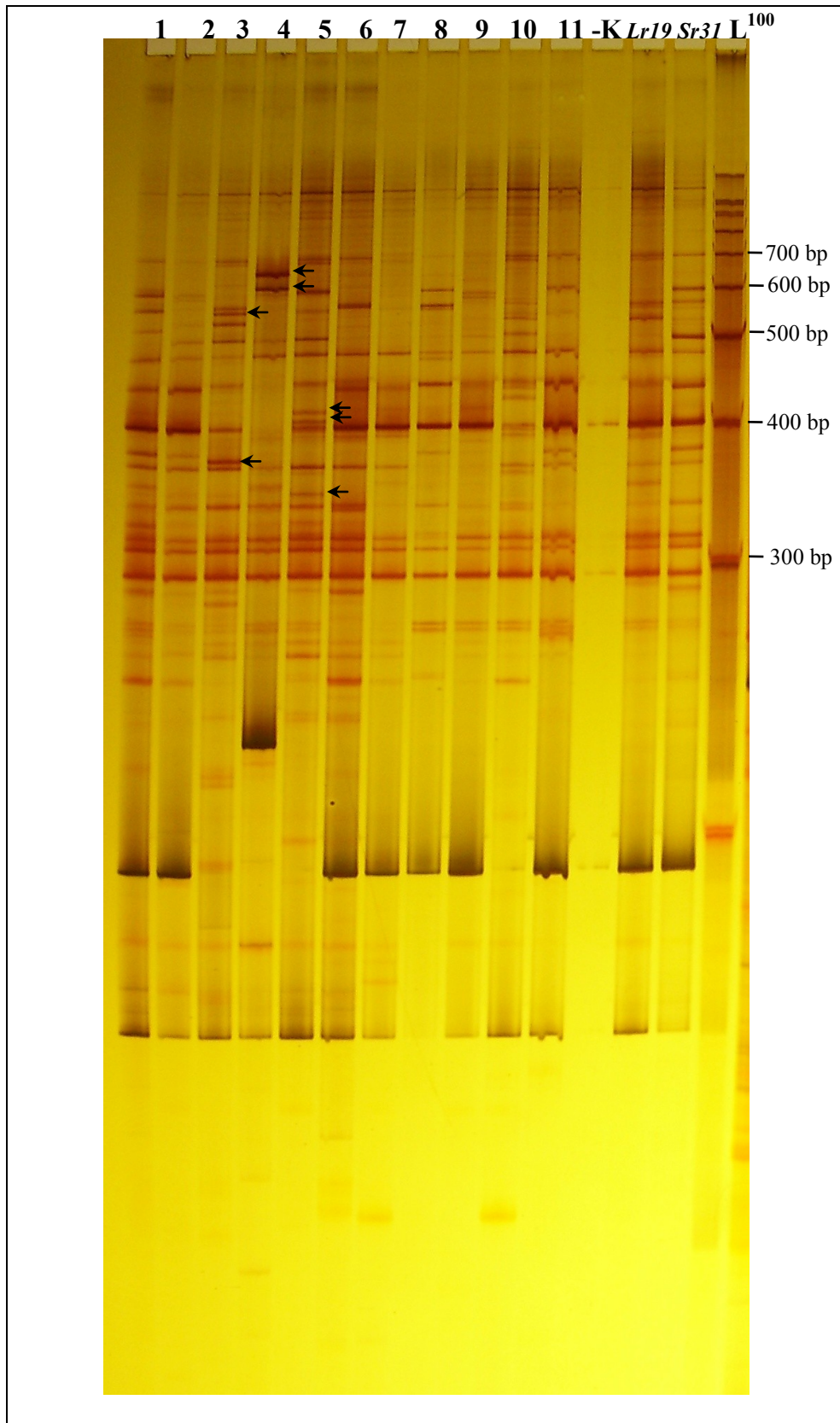
Figuur 4.25. OPW-1 tot OPW-10



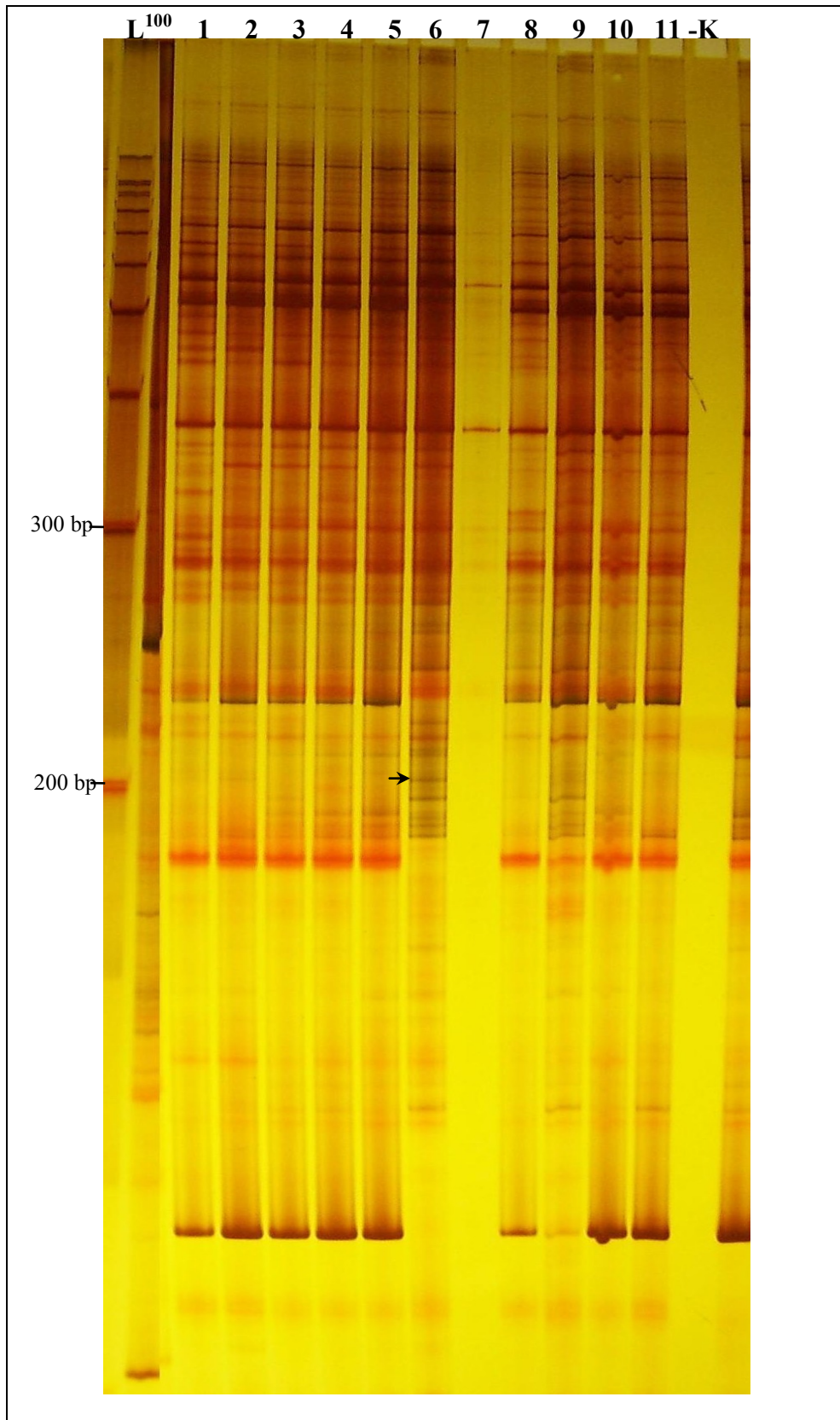
Figuur 4.26. OPW-11 tot OPW-20

4.3 ADDENDUM C: RGAP-PROFIELE

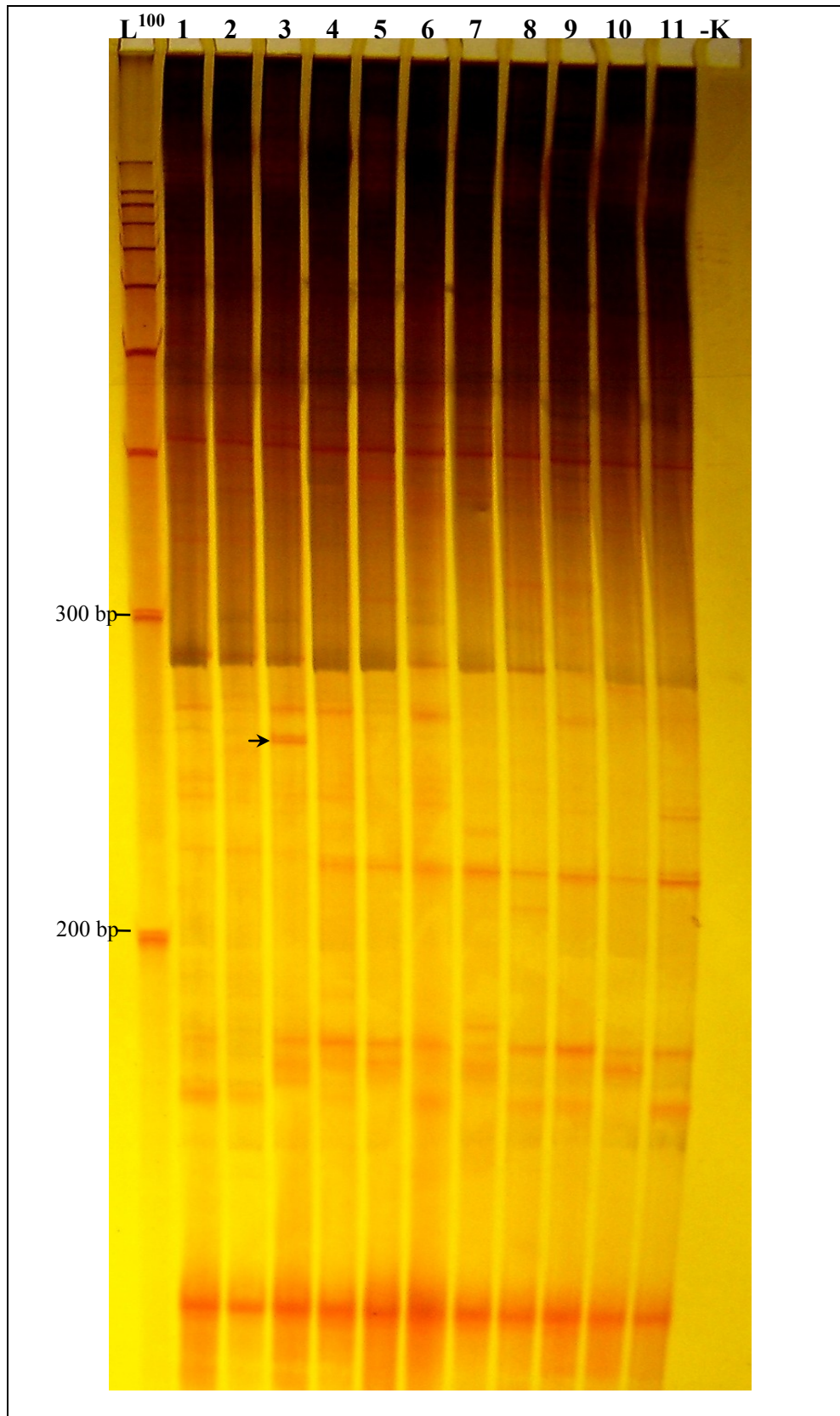
RGAP-profiele geproduseer met gebruik van 21 RGA-inleierkombinasies (Tabel 2.4) in kombinasie met 'n aanvanklike siftingspaneel van elf genotipes (Tabel 2.1). Die genotipe kodes is soos volg: (1) = S8; (2) = S12; (3) = S13; (4) = S14; (5) = S15; (6) = Smac; (7) = S20; (8) = *Lr19*; (9) = Chinese Spring; (10) = W84-17 en (11) = Thatcher. PKR-produkte is geëlektroforeer op 6 % poli-akriel-amied jels en gekleur met silwerkleuring. Die 100 bp molekulêre grootte merker van Promega is gebruik



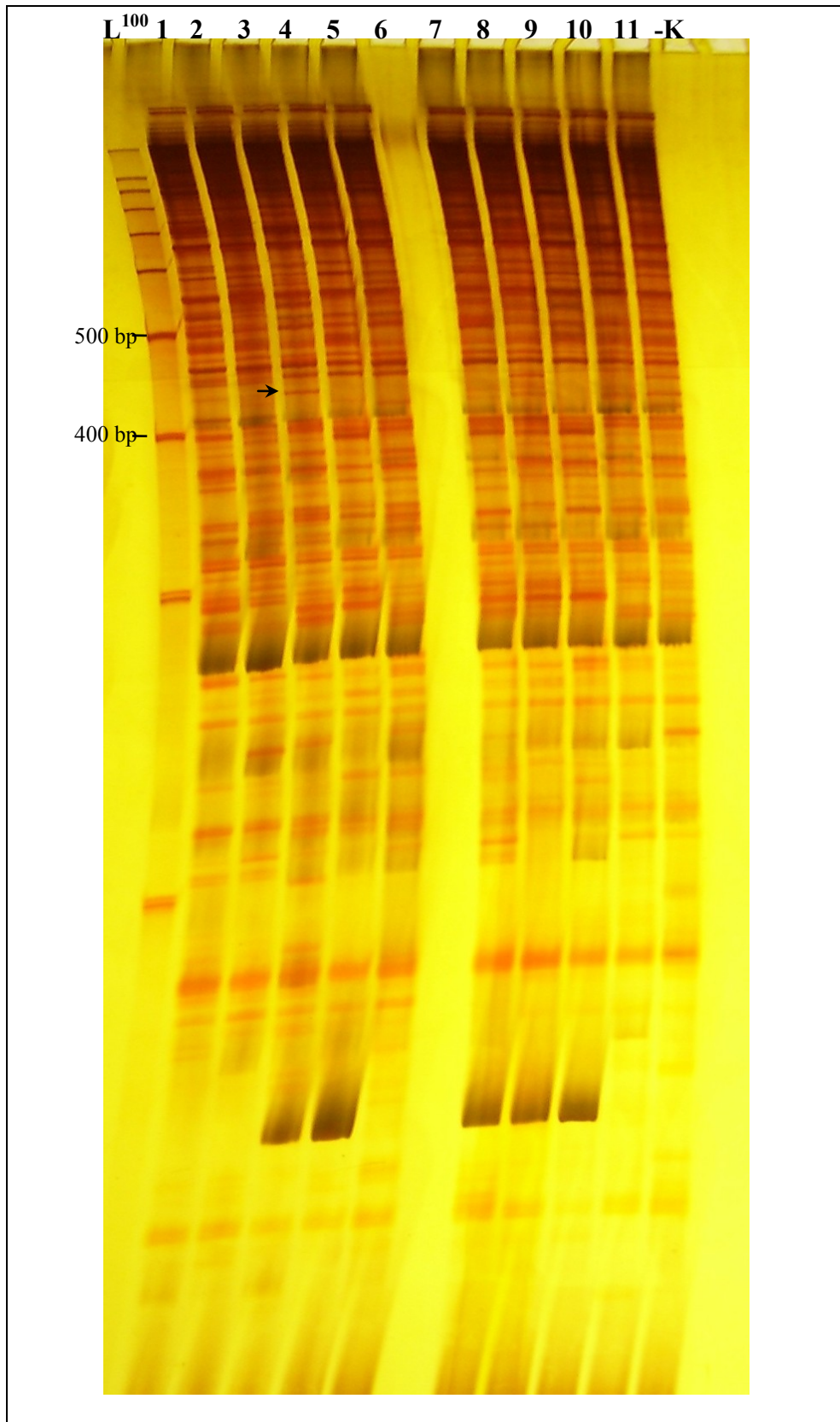
Figuur 4.27. Ptokin 1 en Ptokin 2



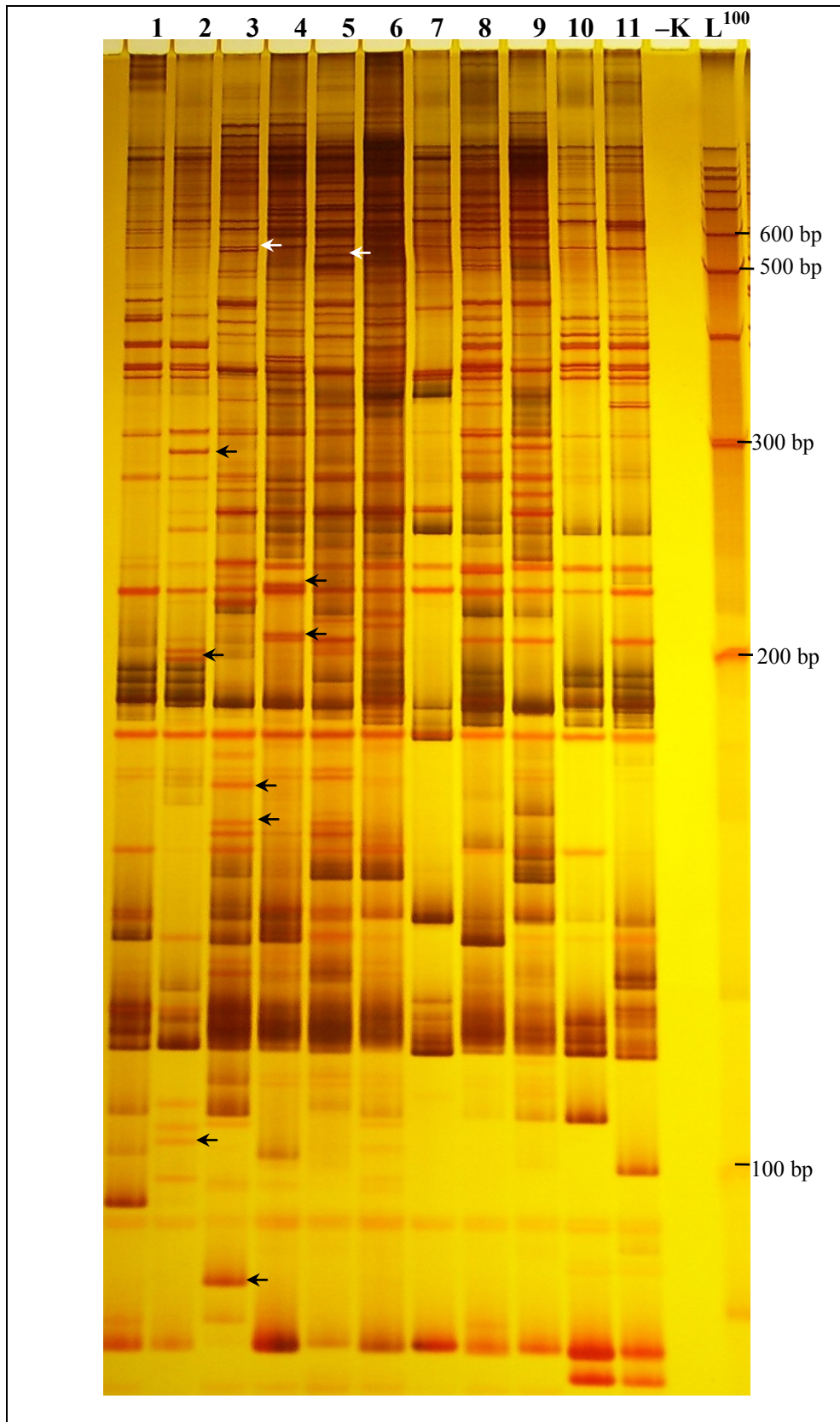
Figuur 4.28. Pto kin 1 en RLRR rev



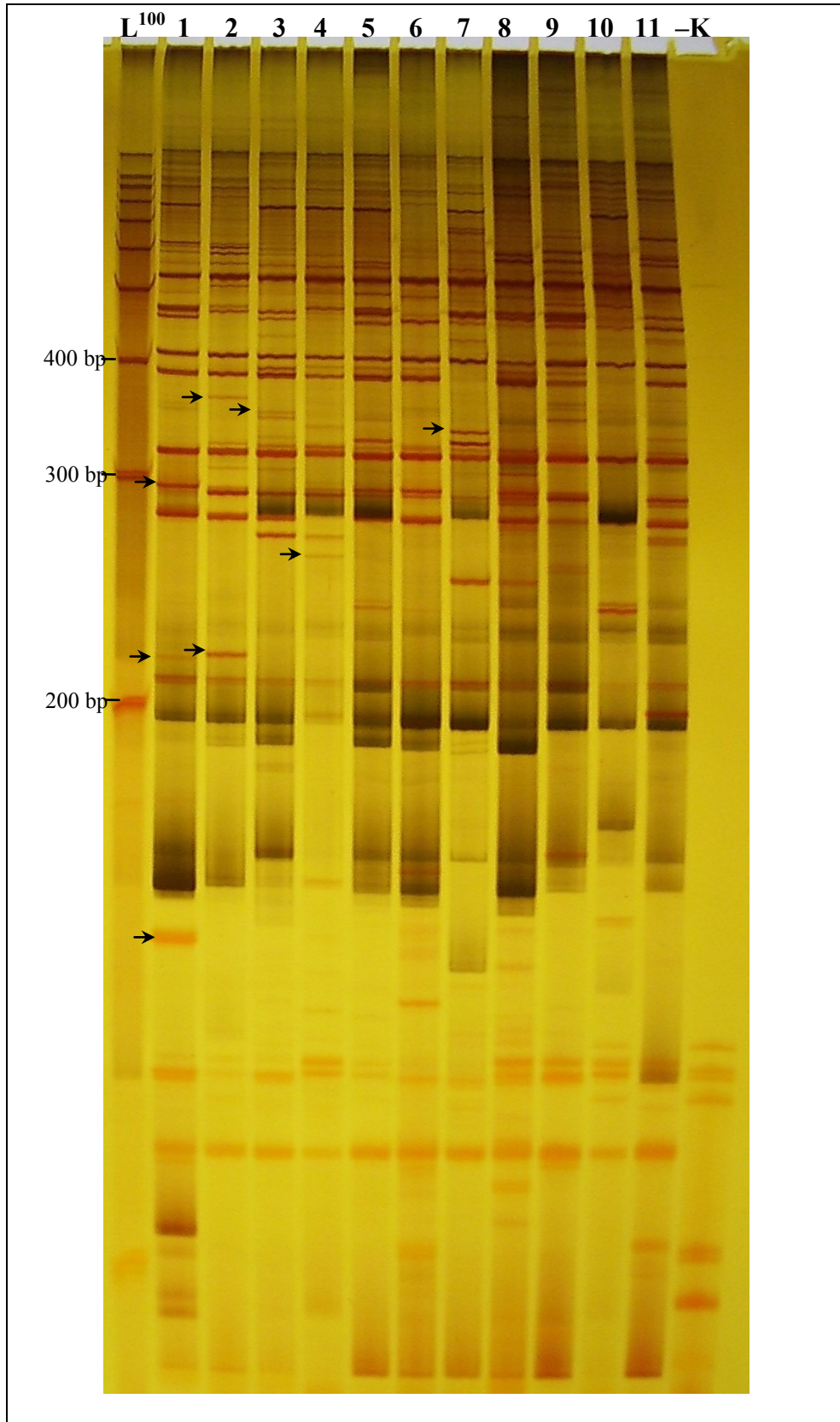
Figuur 4.29. Pto kin 1 en RLRR for



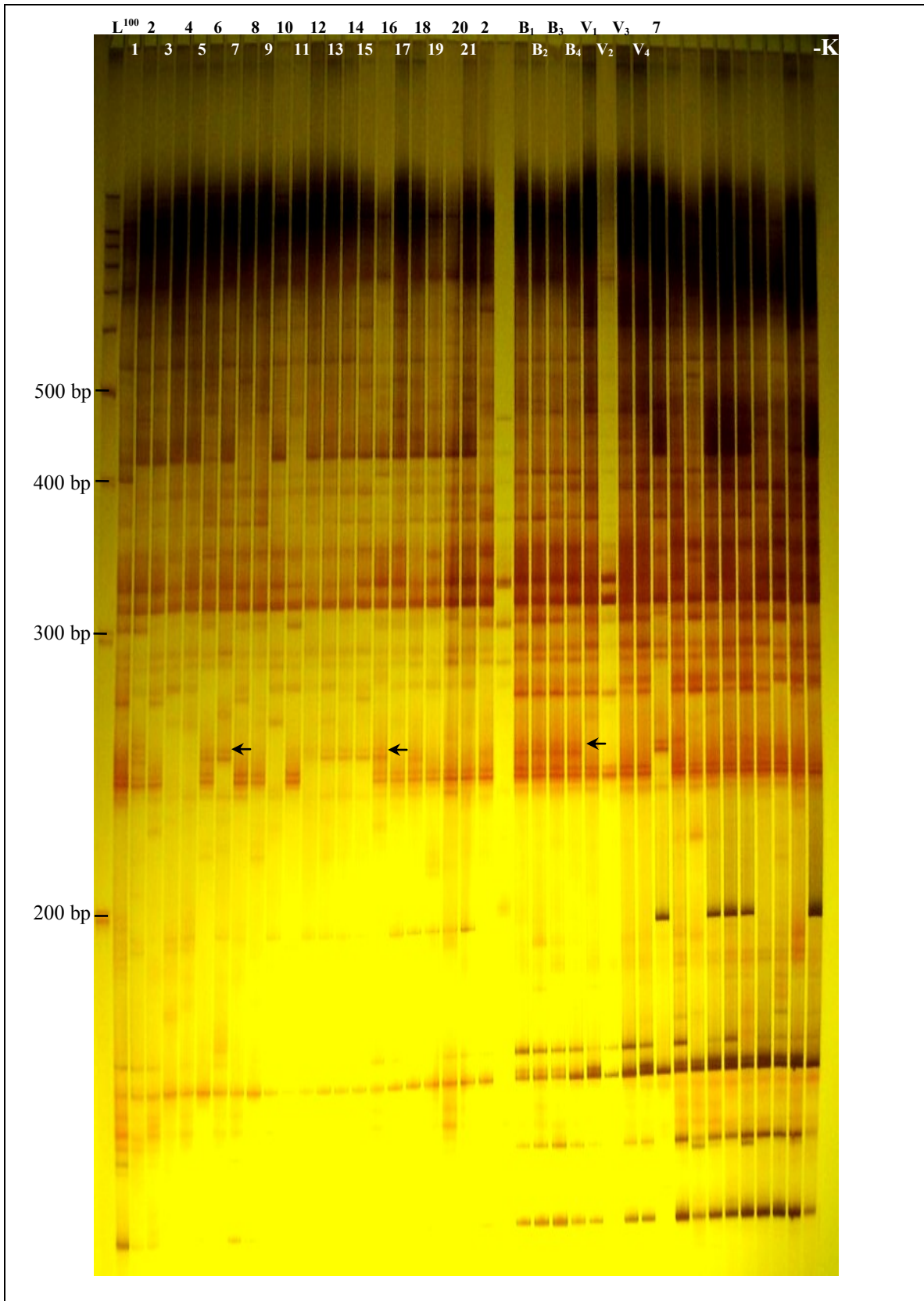
Figuur 4.30. Ptokin 1 en AS3



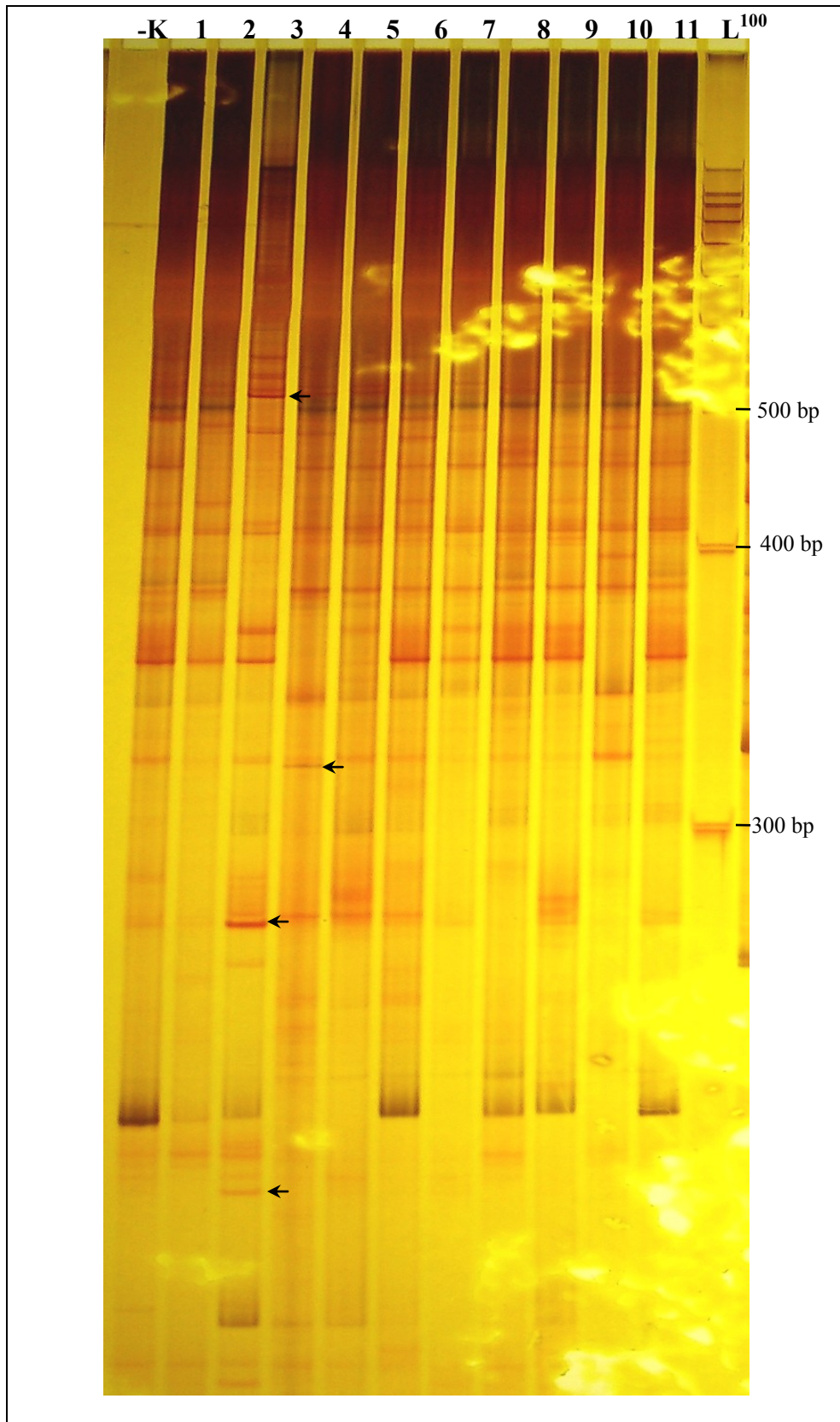
Figuur 4.31. Pto kin 1 en S2



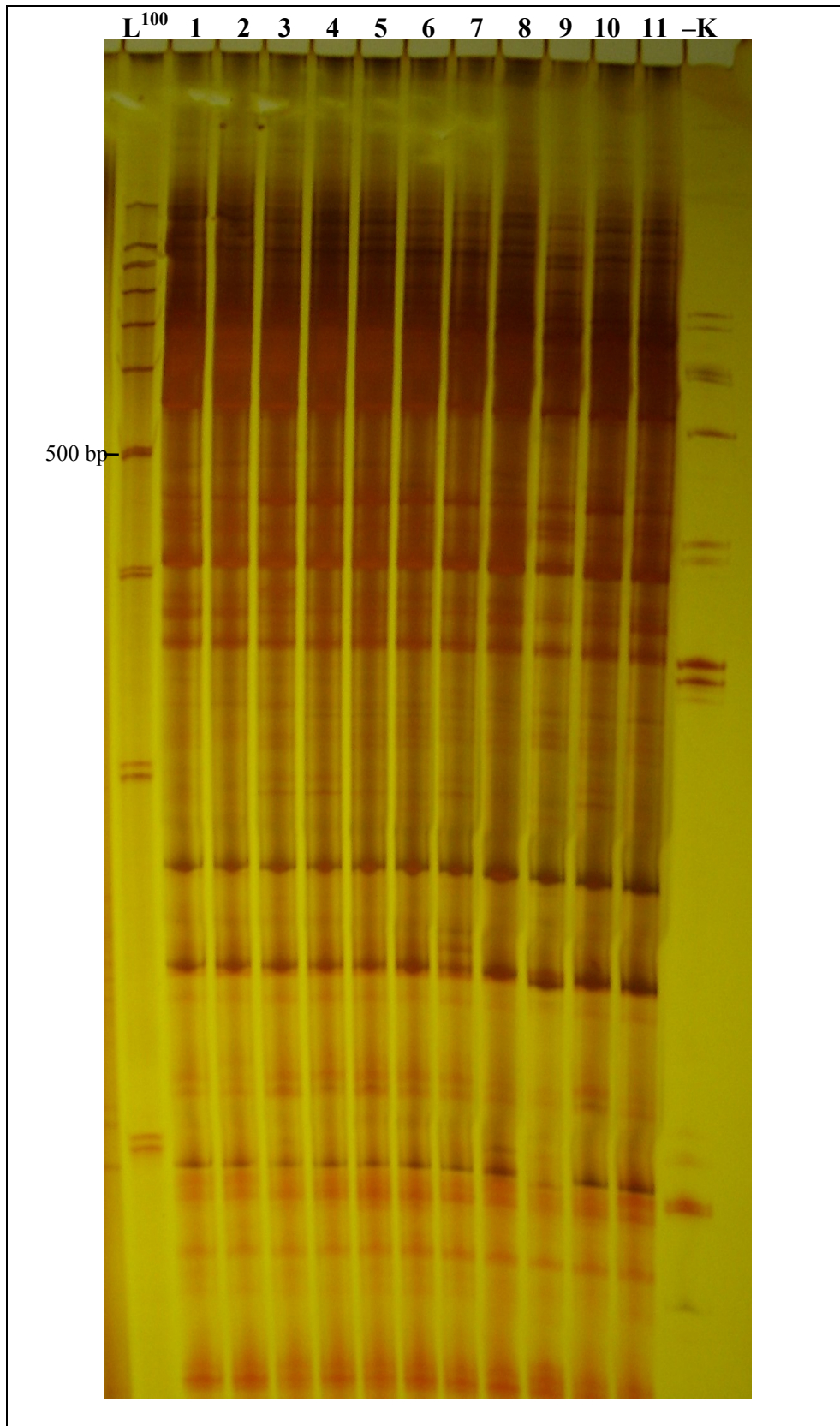
Figuur 4.32. Pto kin 1 en Pto kin 4



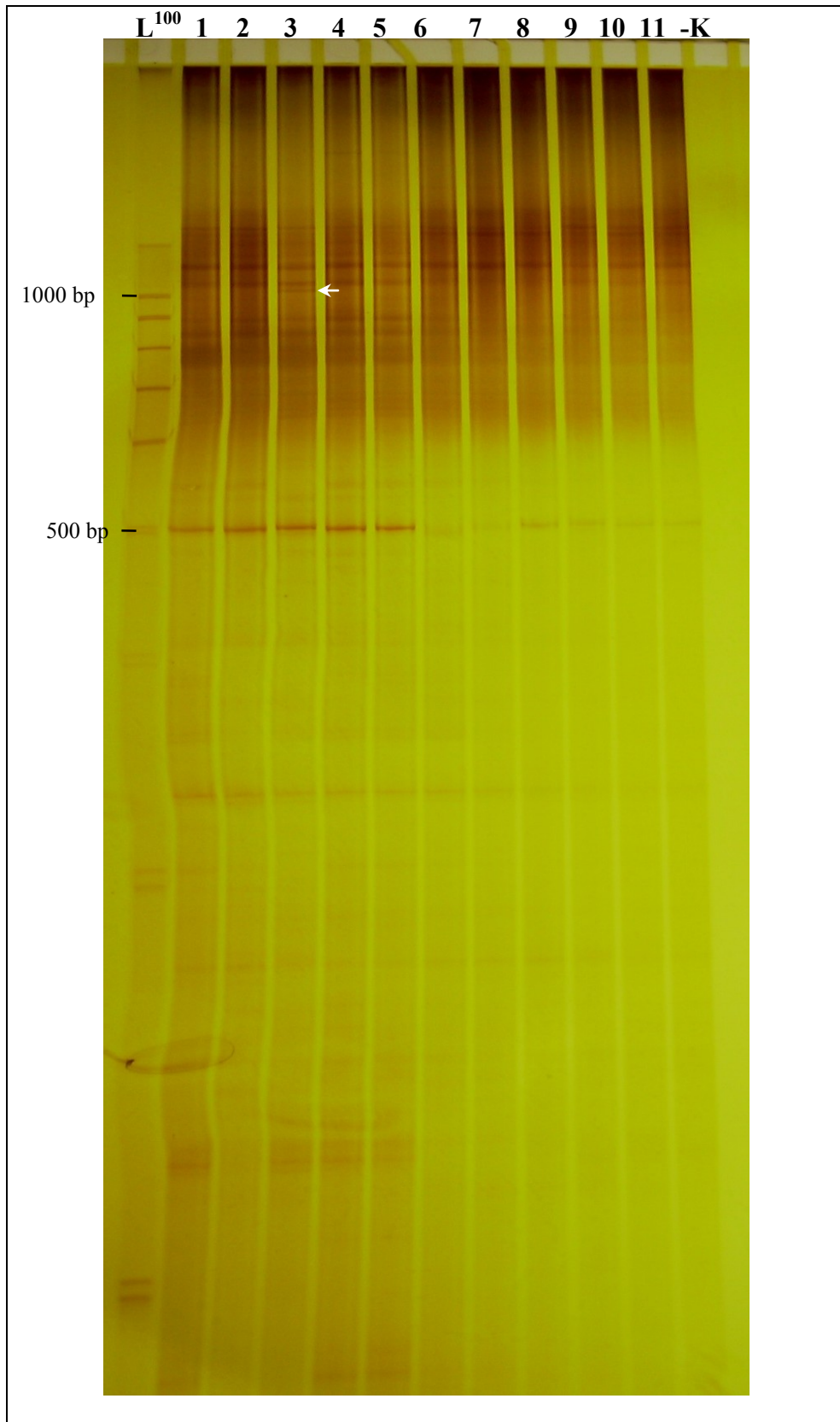
Figuur 4.33. Pto kin 2 en RLRR rev. Nommers 12 tot 16 = vatbare plante en nummers 17 tot 21 = bestande plante uit die F₁ 06M84 (= CS/03M119//W84-17); Bestande (B1, B2, B3, B4) en vatbare (V1, V2, V3, V4) plante van die TK₁F₁: 03M119-71A/2*Thatcher populasie -K = Kontrolle (geen DNS).



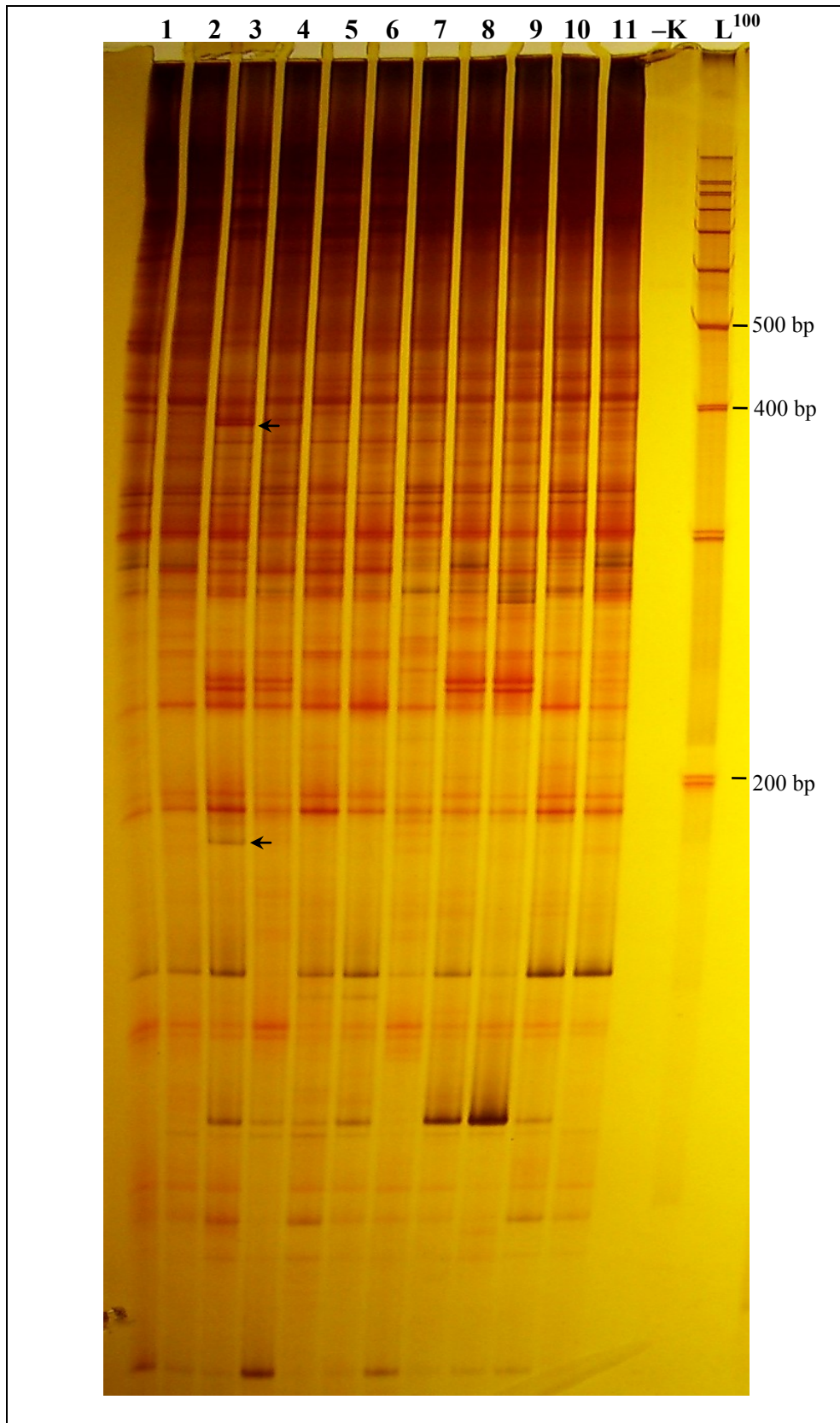
Figuur 4.34. Pto kin 2 en RLRR for



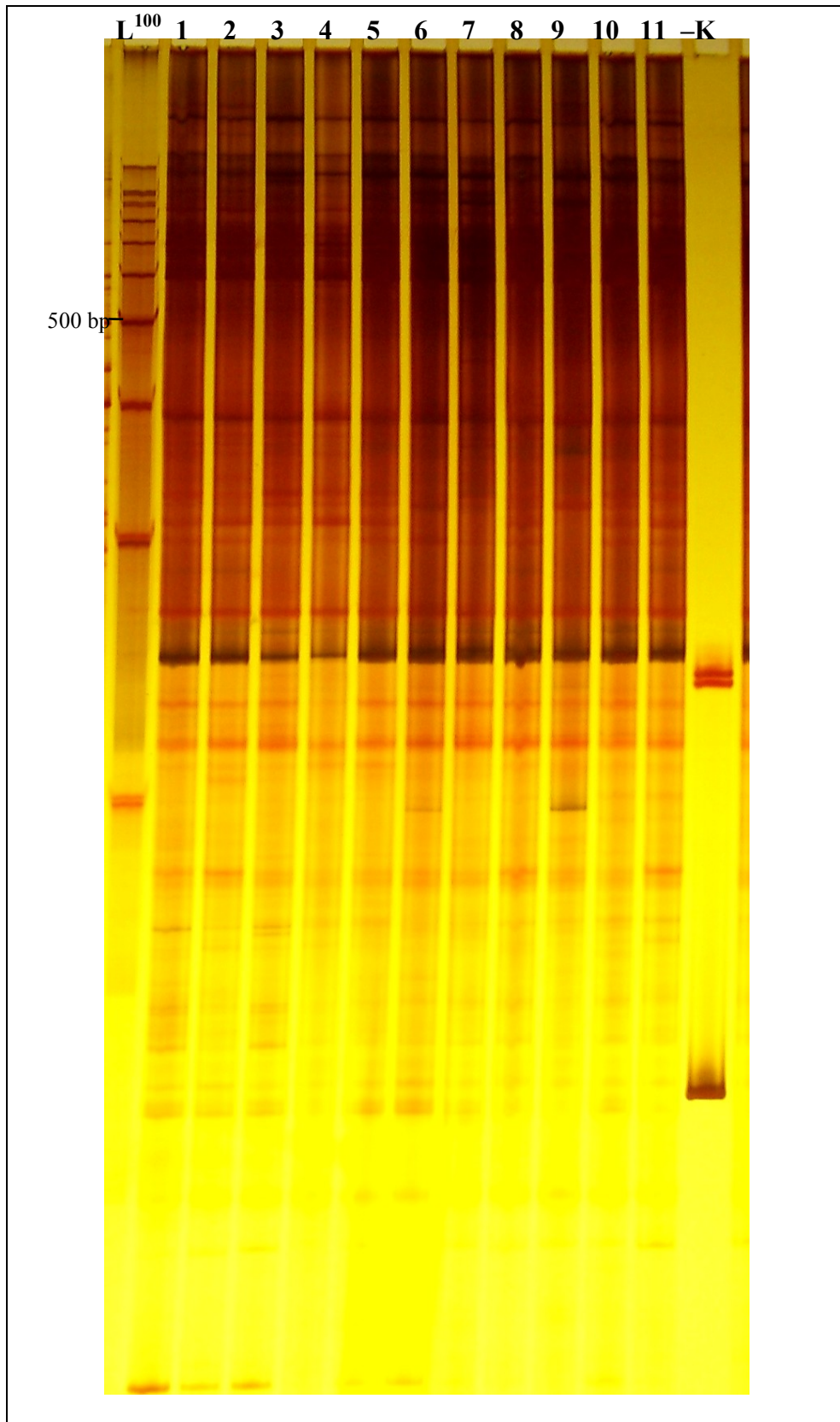
Figuur 4.35. Pto kin 2 en AS 3



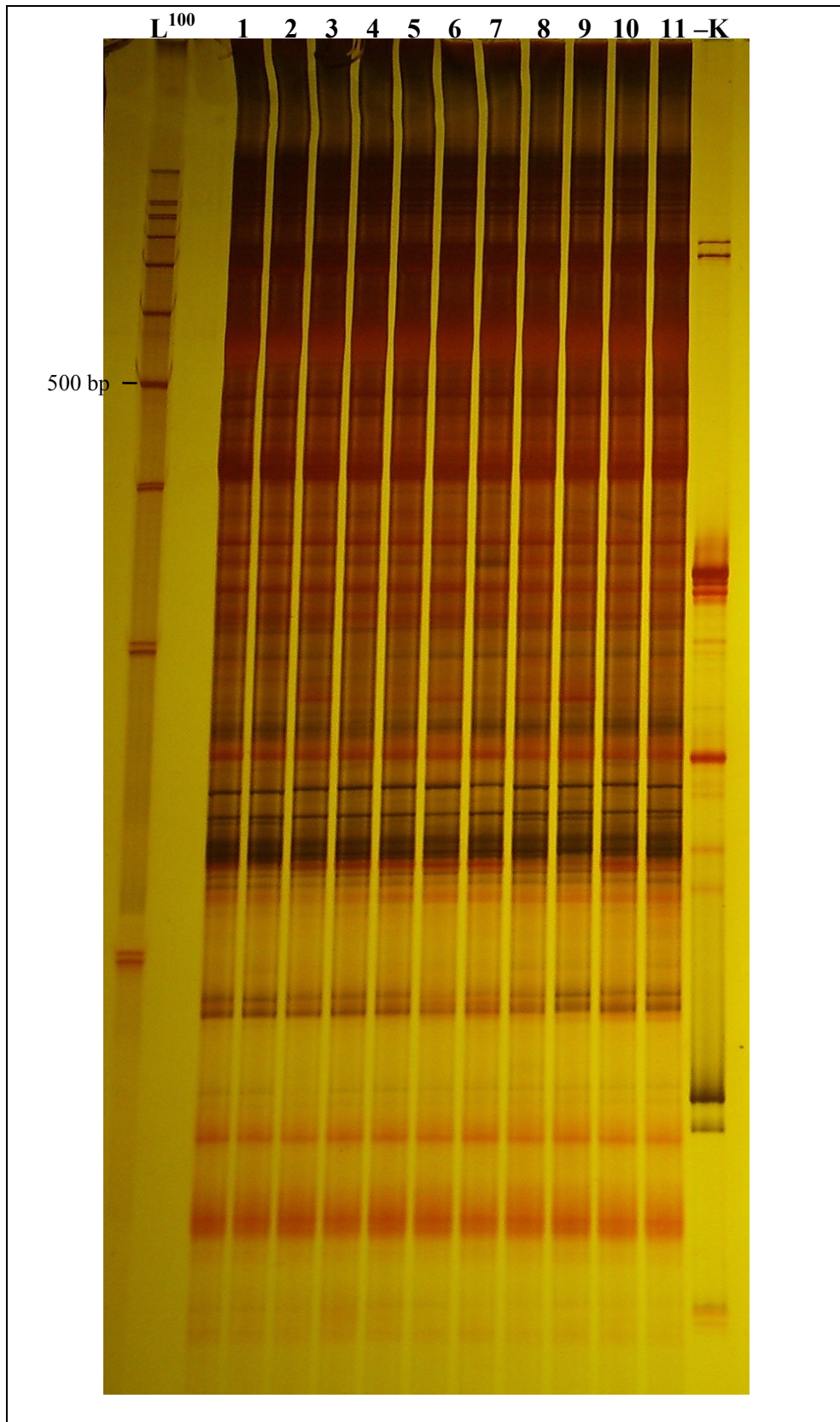
Figuur 4.36. Pto kin 2 en S2



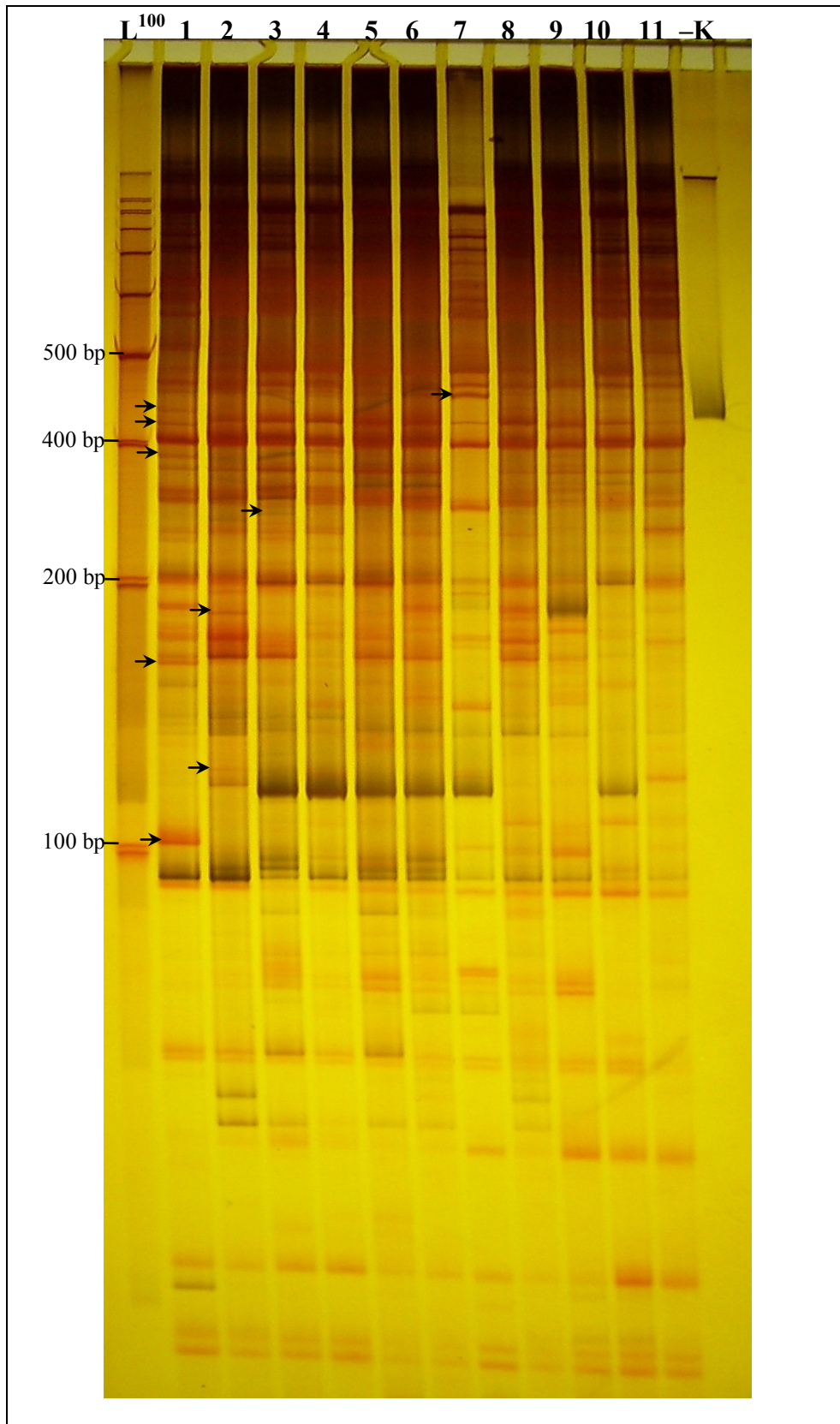
Figuur 4.37. Pto kin 2 en Pto kin 4



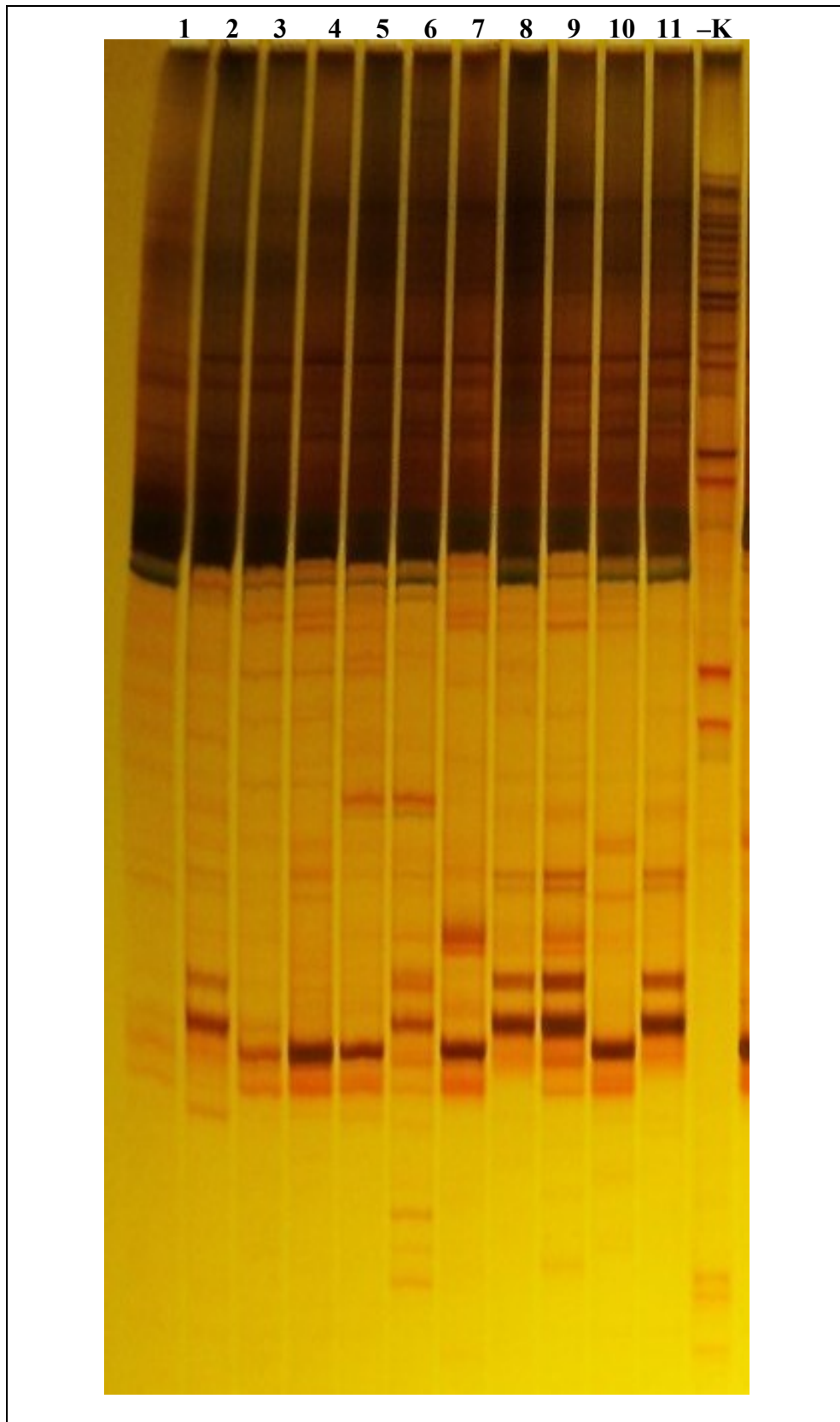
Figuur 4.38. RLRR rev en RLRR for



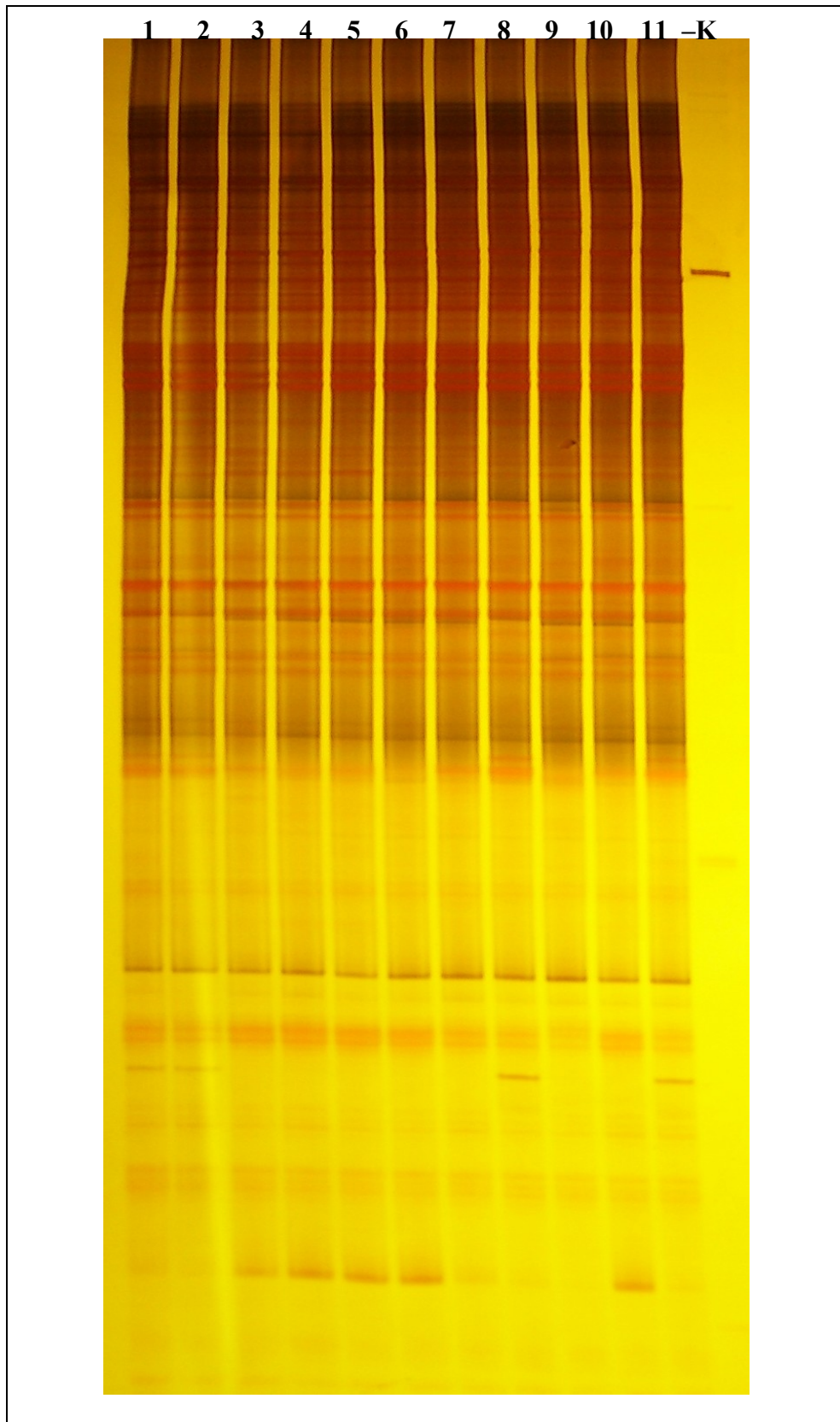
Figuur 4.39. RLRR rev en AS 3



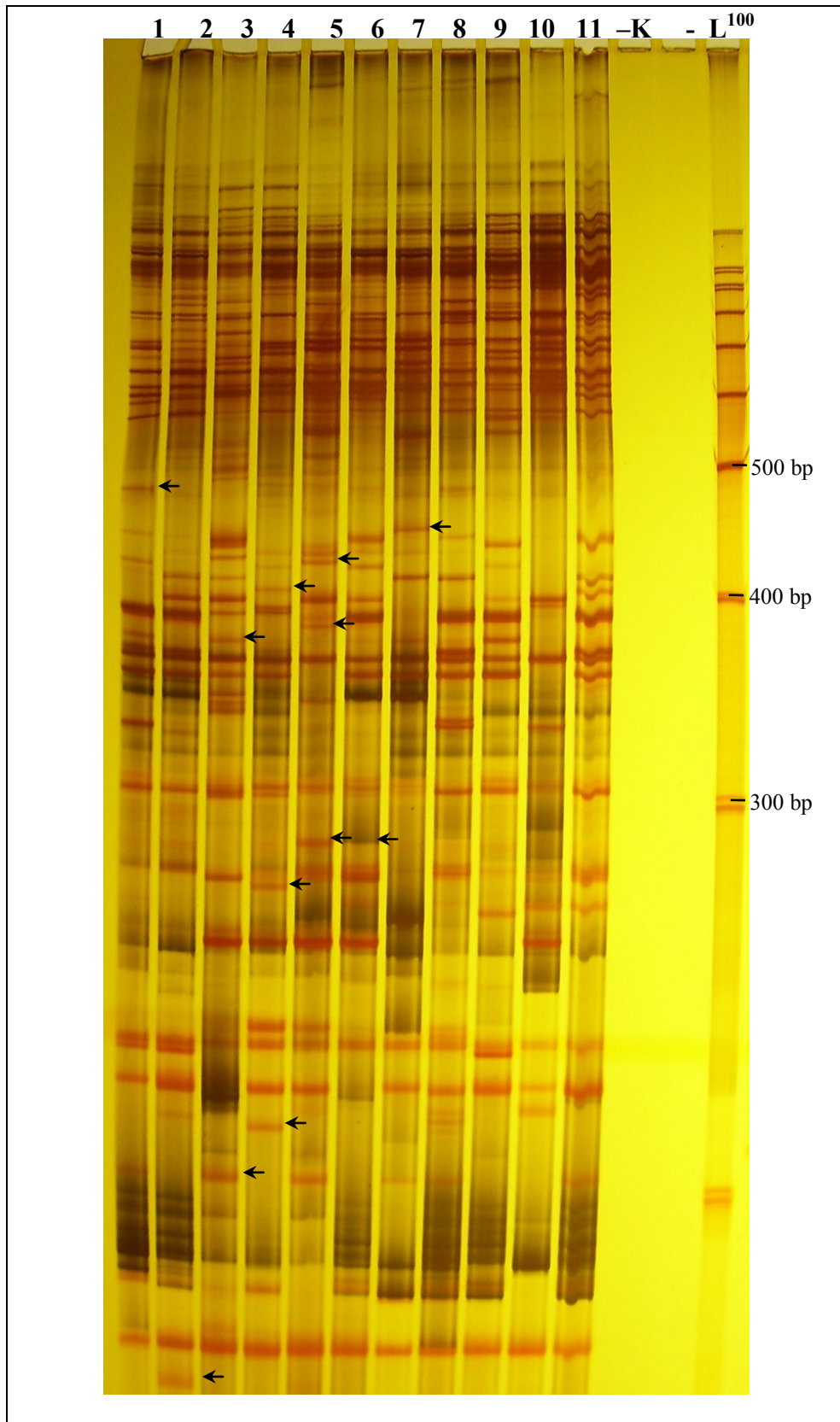
Figuur 4.40. RLRR rev en S2



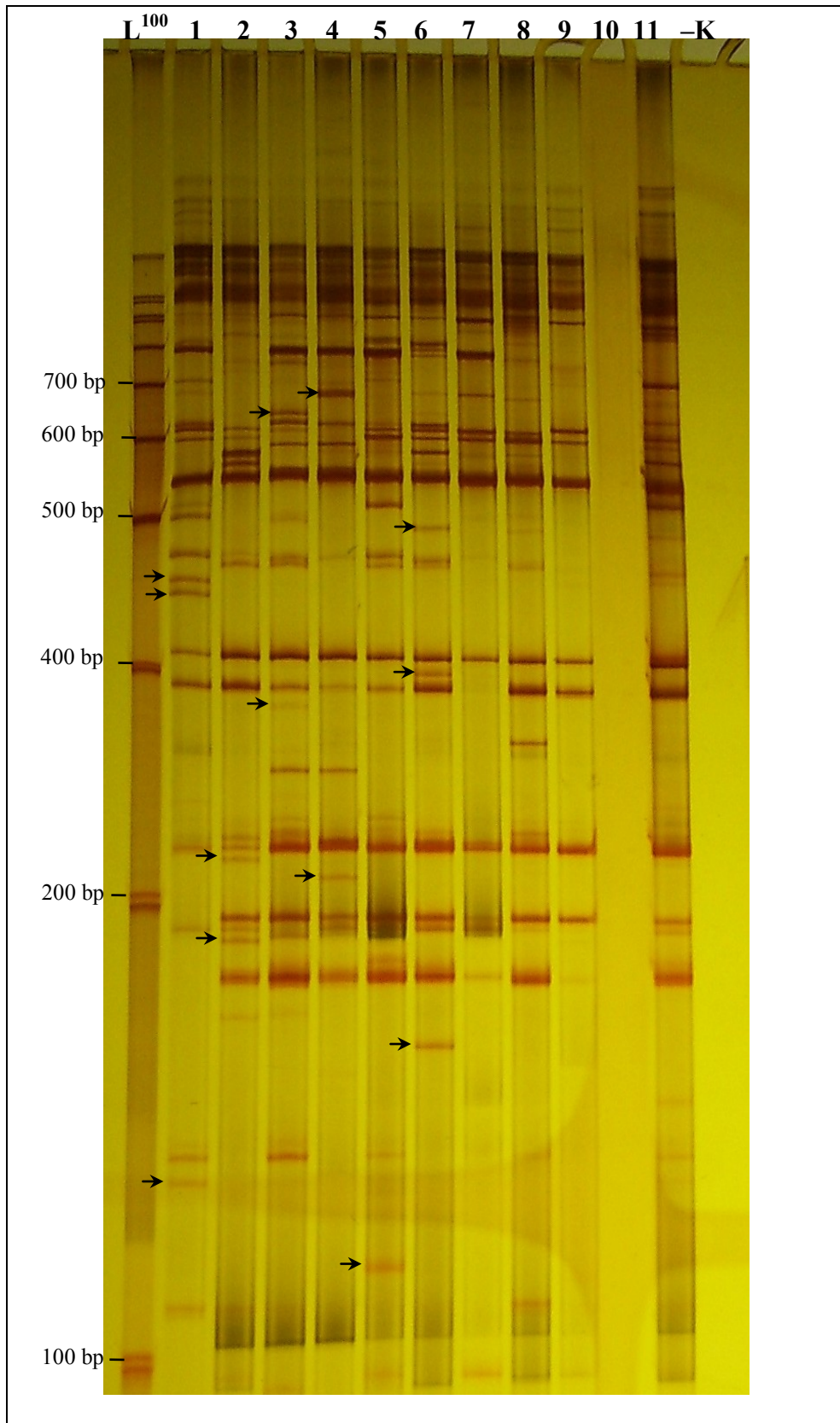
Figuur 4.41. RLRR rev en Pto kin 4



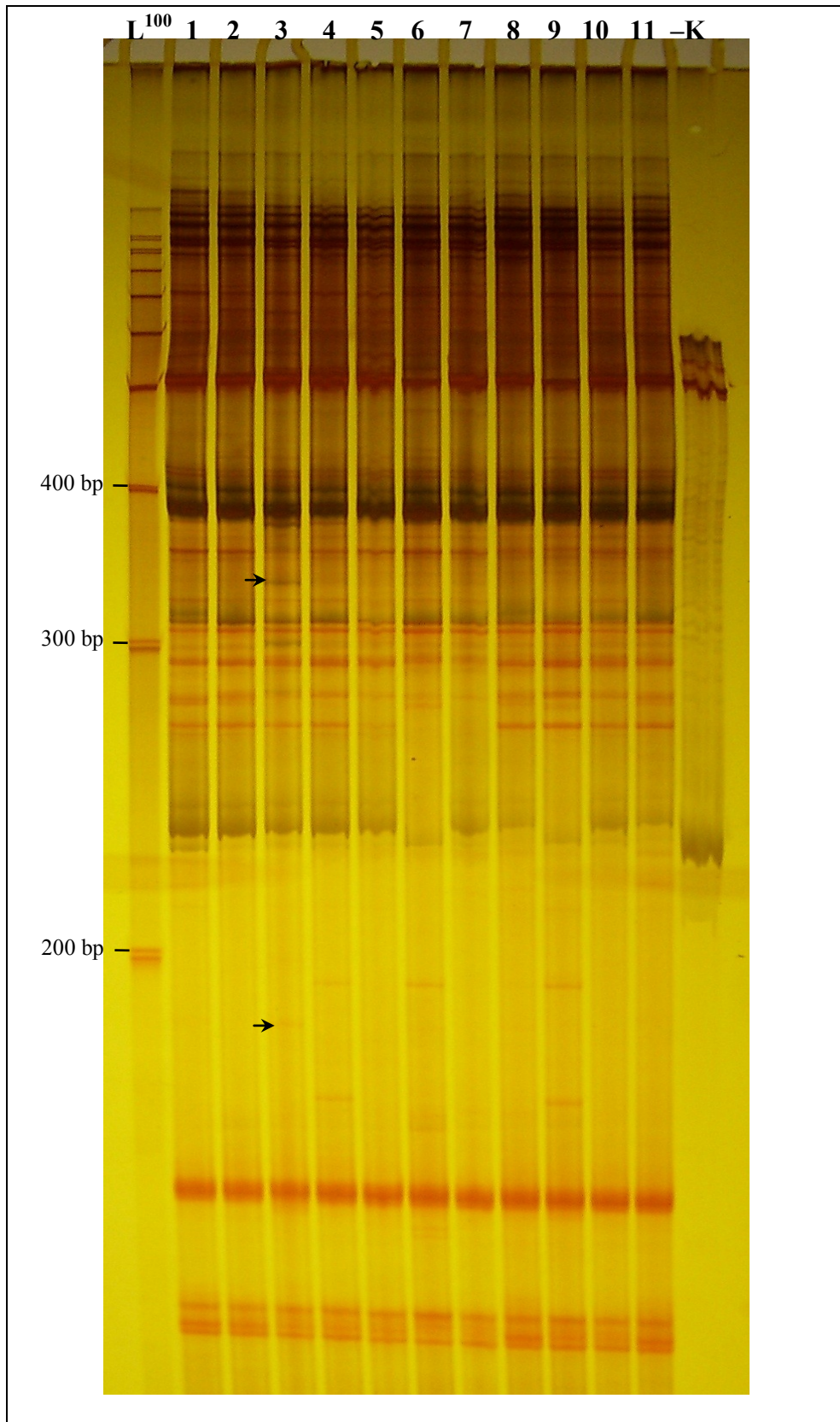
Figuur 4.42. RLRR for en AS 3



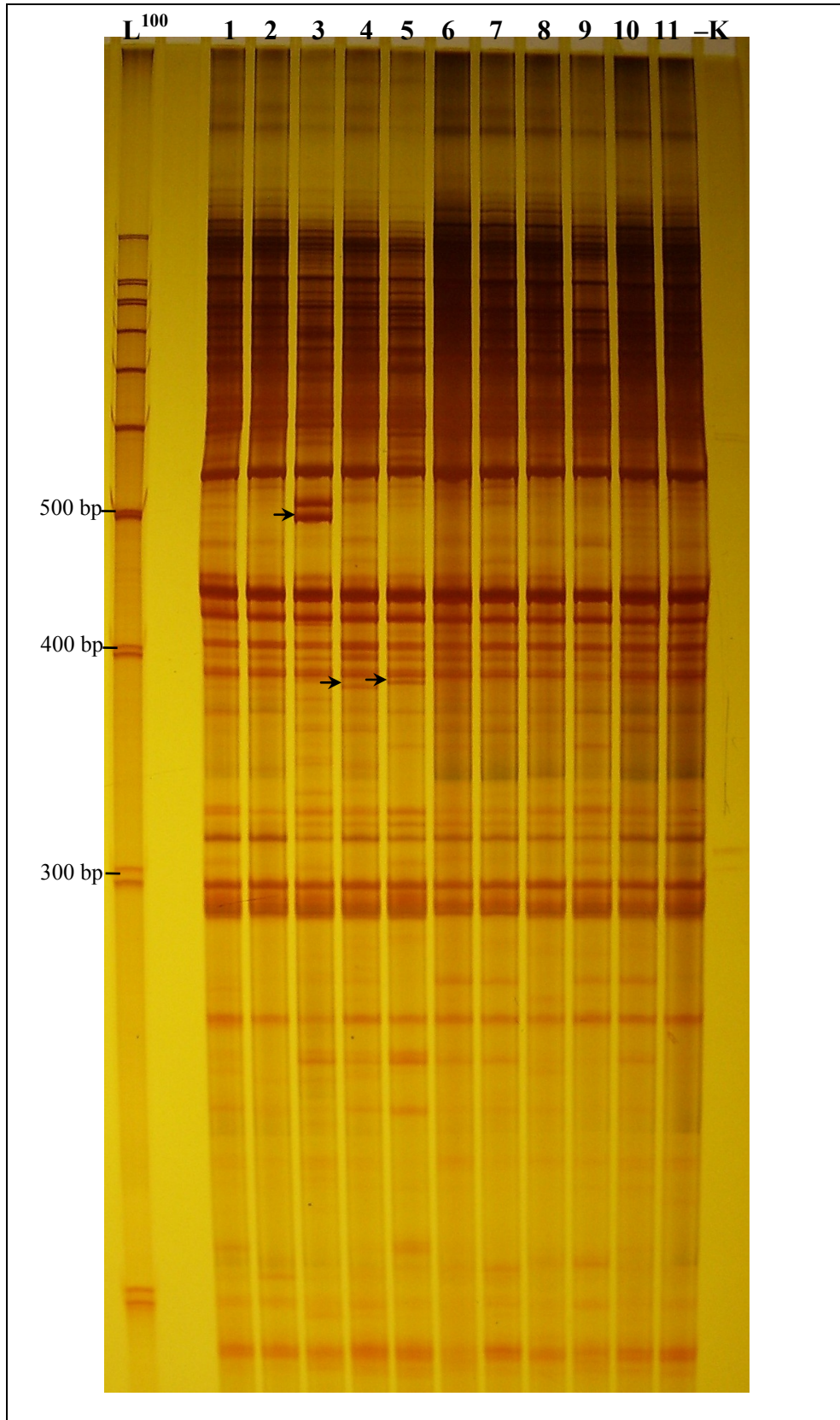
Figuur 4.43. RLRR for en S2



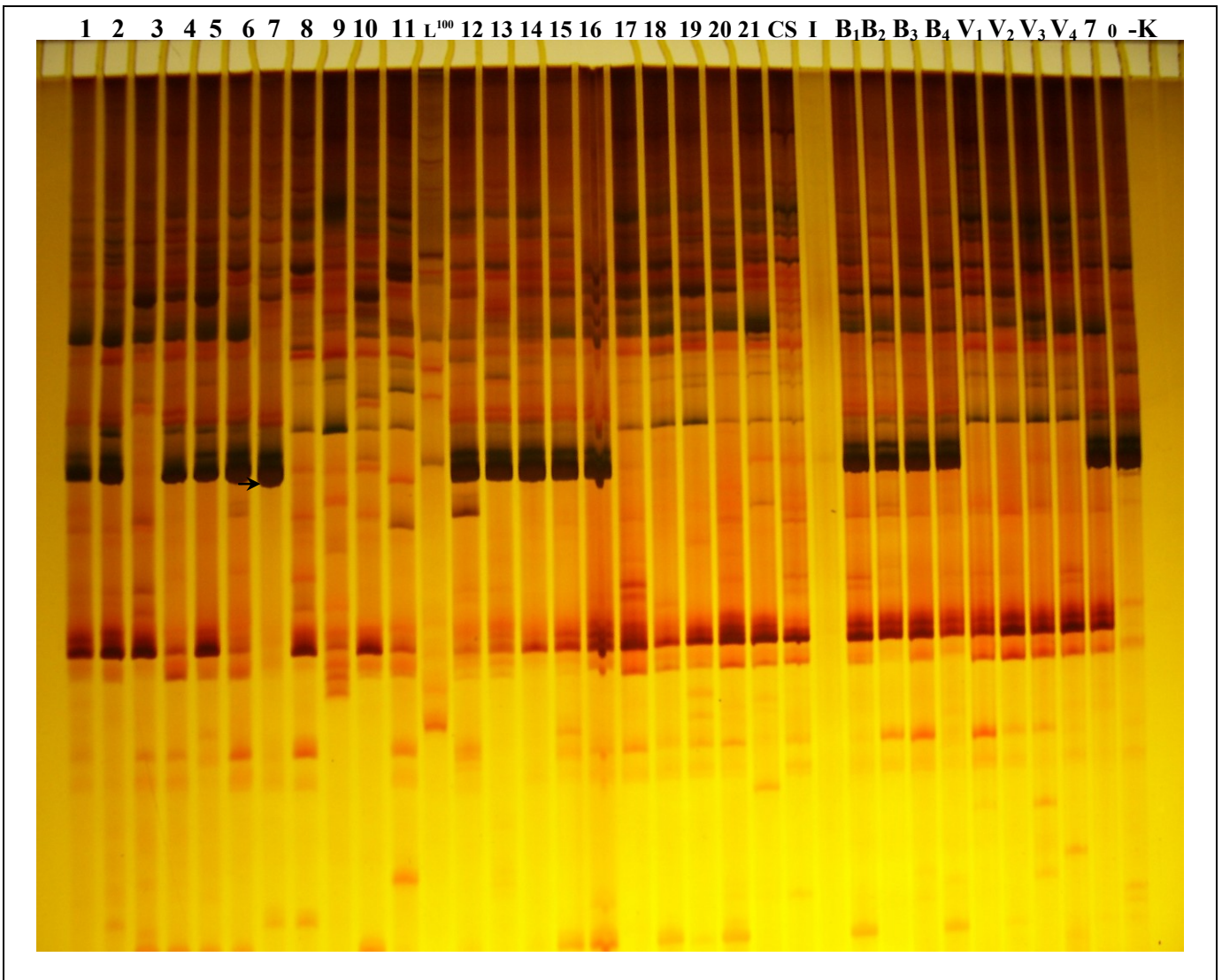
Figuur 4.44. RLRR for en Pto kin 4



Figuur 4.45. AS 3 en S2



Figuur 4.46. AS 3 en Pto kin 4



Figuur 4.47. S2 en Pto kin 4. Bestande (B1, B2, B3, B4) en vatbare (V1, V2, V3, V4) plante van die TK₁F₁: 03M119-71A/2*Thatcher populasie. Nommers 12 tot 16 = vatbare plante en nommers 17 tot 21 = bestande plante uit die F₁: 06M84 (= CS/03M119//W84-17); I = Inia 66, -K = Kontrole (geen DNS).

HOOFSTUK 5. VERWYSINGS

- Anderson JA (2003) Plant genomics and its impact on wheat breeding. In: Newbury HJ (red.) Plant molecular breeding. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 185-215
- Anderson JR en Lübberstedt T (2003) Functional markers in plants. Trends Plant Sci 8(11): 554-560
- Antonov AI en Marais GF (1996) Identification of leaf rust resistance genes in *Triticum* species for transfer to common wheat. S.Afr. Tydskr. Plant en Grond 13(2): 55-61
- Ashraf M, Shabaz M, McNeilly T (2005) Phylogenetic relationship of salt tolerance in early Green Revolution CIMMYT wheats. Environ Exp Bot 53: 173-184
- Belzile FJ (2002) Transgenic, transplastomic and other genetically modified plants: a Canadian perspective. Biochemie 84: 1111-1118
- Bonjean AP en Lacaze P (2001) Molecular Marker Systems and Bread Wheat. In: Bonjean AP en Angus WJ (red.) The World Wheat Book, A history of wheat breeding, pp. 1049-1060
- Boshoff WHP, Pretorius ZA, Van Niekerk BD (2002-A) The impact of leaf rust on spring wheat in the winter rainfall region of South Africa. S.Afr. Tydskr. Plant en Grond 19(2): 84-87
- Boshoff WHP, Pretorius ZA, Van Niekerk BD (2002-B) Establishment, Distribution, and Pathogenicity of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in South Africa. Plant Dis 86: 485-482
- Brown J en Caligari DS (2008) An introduction to plant breeding. Blackwell Publishing, Oxford
- Caetano-Annollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991) High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio Technol 9: 553-557

-
- Chen XM, Line RF, Leung H (1998) Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor Appl Genet* 97: 345-355
 - Chen X, Soria MA, Guiping Y, Sun J, Dubcovsky J (2003) Development of sequence tagged site and cleaved amplified polymorphic sequence markers for wheat stripe rust resistance gene *YR5*. *Crop Sci* 43: 2058-2064
 - Chrispeels MJ en Sadava DE (1994) *Plants, Genes and Agriculture*. Jones & Bartlett Publishers International, London
 - Cortese MR, Fanelli E, De Giorgi C (2003) Characterization of nematode resistance gene analogs in tetraploid wheat. *Plant Sci* 164: 71-75
 - Cutler RW, Chundet R, Handa T, Anuntalabhochai S (2005) Development of sequence characterized DNA markers linked to temperature dependence for flower induction in lychee (*Litchi chinensis Sonn*) cultivars. *J Agron Crop Sci* 193(1): 74-78
 - Dagert M and Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 12: 23-38
 - Dedryver F, Jubier M-F, Thouvenin J, Goyeau H (1996) Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr 24* in different wheat cultivars. *Genome* 39: 830-835
 - Devos KM en Gale MD (1992) The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet* 84: 567-572
 - Doyle JJ en Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
 - Durable Rust Resistance in Wheat project (2008). Cornell Universiteit, VSA http://www.wheatrust.cornell.edu/about/documents/executive_summary.pdf. Aanlyn: 30 Oktober 2008
 - Duvick DN (2002) Crop Breeding in the Twenty-First Century. In: Kang MS (red.) *Crop Improvement, Challenges in the Twenty-First Century*. Food Products Press, Binghamton, NY, pp. 3-14

-
- Dvorak J (1998) Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance. In: Slinkard AE (red.) Proc 9th Int Wheat Genet Symp, University of Saskatchewan Extension Press, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, pp. 8-11
 - Ellis J en Jones D (1998) Structure and function of proteins controlling strain specific pathogen resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 288-293
 - Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 3: 278-284
 - Erlich HA (red.) (1989) PCR Technology Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press N.Y, USA, pp. 17-22
 - Farooq S en Azam F (2007) A new allopolyploid wheat for stressed lands and poverty alleviation. *Field Crops Res* 100: 369-373
 - Feuillet C, Langrige P, Waugh R (2007) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet* 24(1): 24-32
 - Gale KR (2005) Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat. *J Cereal Sci* 41: 181-192
 - Gebhardt C (1997) Plant genes for pathogen resistance-variation on a theme. *Trends Plant Sci* 2(7): 243-244
 - Gelfand DH (1989) *Taq* DNA Polymerase. In: Erlich HA (red.) PCR technology principles and applications for DNA amplification. Stockton Press NY, USA, pp. 17-22
 - Golovnina KA, Glushkov SA, Blinov AG, Mayorov VI, Adkinson LR, Goncharov NP (2007) Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L. *Plant Syst Evol* 264: 195-216
 - Graybosch RA (2001) Uneasy Unions: Quality Effects of Rye Chromatin Transfers to Wheat. *J Cereal Sci* 33: 3-16

-
- Gupta PK en Varshney RK (red.) (2004) Cereal genomics. Cluver Academic Publishers, Nederland.
 - Hall TA (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 41: 95-98
 - Hart GE (2001) Molecular-marker maps of the cultivated wheats and other *Triticum* species. In: Phillips RL en Vasil IK (red.) DNA-Based Markers in Plants. Kluwer Academic Publishers, Nederland, pp. 421-441
 - Heath MC (1997) Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. Annals of Botany 80: 713-720
 - Hospital F (2003) Marker-assisted breeding. In: Newbury HJ (red.) Plant molecular breeding. Blackwell, Oxford, pp. 31-57
 - Jauhar PP en Chibbar RN (1999) Chromosome-mediated and direct gene transfer in wheat. Genome 43: 570-583
 - Jiang J, Friebe B, Gill BS (1994) Recent advances in alien gene transfer. Euphytica 73: 199-212
 - Khan MA, Meyers GO, Stewart JM (2002) Molecular markers, genomics, and cotton improvement. In: Kang MS (red.) Crop Improvement, Challenges in the Twenty-First Century. Food Products Press, Binghamton, NY, pp. 253-271
 - Kilian W en Burger E (2008) Handleiding vir die produksie van kleingrane in die winterreënvalgebied 2008. Landbounavorsingsraad, SA
 - Knott DR (1989) The wheat rust pathogens. In: Knott DR (red.), The wheat rusts; breeding for resistance, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 1-37
 - Koebner RMD en Summers (2003) 21st Century wheat breeding: plot selection or plate detection? Trends Biotechnol 21(2): 59-63

-
- Kolmer JA (2005) Tracking wheat rust on a continental scale. *Curr Opin Plant Biol* 8: 441-449
 - Komen JS en Pretorius ZA (2007) Fungicide efficacy for wheat stem rust control. 45th Congress of the Southern African Society for Plant Pathology, Kopanong, Benoni.
 - Lagudah ES, Dubcovsky J, Powell W (2001) Wheat genomics. *Plant Physiol Bioch* 39: 335-344
 - Landjeva S, Korzun V, Börner A (2007) Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization. *Euphytica* 156: 271-296
 - Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhart C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat Genet* 14: 421-429
 - Lui ZJ en Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37
 - Maleki L, Faris JD, Bowden RL, Gill BS, Fellers JP (2003) Physical and genetic mapping of wheat kinase analogs and NBS-LRR resistance gene analogs. *Crop Sci* 43: 660-670
 - Marais GF en Pretorius ZA (1996) Gametocidal effects and resistance to wheat leaf rust and stem rust in derivatives of a *Triticum turgidum* spp. *durum/Aegilops speltoides* hybrid. *Euphytica* 88: 117-124
 - Marais GF, Pretorius ZA, Marais AS, Wellings CR (2003) Transfer of rust resistance genes from *Triticum* species to common wheat. *S.Afr. Tydskr. Plant en Grond* 20(4): 193-198
 - Marais GF, Pretorius ZA, Wellings CR, McCallum B, Marais AS (2005-A). Leaf rust and stripe rust resistance genes transferred to common wheat from *Triticum dicoccoides*. *Euphytica* 143: 115-123

-
- Marais GF, McCallum B, Snyman JE, Pretorius ZA, Marais AS (2005-B). Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotchyi*. *Plant Breeding* 124: 538-541
 - Marais GF, McCallum B, Marais AS (2006) Leaf rust and stripe rust resistance genes derived from *Aegilops sharonensis*. *Euphytica* 149: 373-380
 - Marais GF, McCallum B, Marais AS (2008-A) Wheat leaf rust resistance gene *Lr59* derived from *Aegilops peregrina*. *Plant Breeding* 127: 340-345
 - Marais GF, Marais A, McCallum B, Pretorius ZA (2008-B) Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr62* and *Yr42* transferred to common wheat from *Aegilops neglecta* Req. ex Bertol. (latere publikasie)
 - Martin GB (1999) Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr Opin Plant Biol* 2: 273-279
 - McIntosh RA (1998) Breeding wheat for resistance to biotic stresses. *Euphytica* 100: 19-34
 - McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) *Wheat Rusts An Atlas of Resistance Genes*. CSIRO Australia, Kluwer Academic Publishers, Nederland
 - Merezko AF (1998) Impact of plant genetic resources on wheat breeding. *Euphytica* 100: 295-303
 - Merker A (1992) The Triticeae in cereal breeding. *Hereditas* 116: 277-280
 - Mullis KB en Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335–350
 - Murray DR (red.) (1993) *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. *Biotechnology in Agriculture* no. 4. CAB International

-
- Murray TD, Parry DW, Cattlin ND (1998) A colour handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops, pp. 49-54. Manson Publikasies Bpk, London
 - Nelson RR (1973) Breeding plants for disease resistance: Concepts and Applications. The Pennsylvania State University Press, University Park, VSA
 - Newbury HJ en Paterson H (2003) Genomic colinearity and its application in crop plant improvement. In: Plant Molecular Breeding, Blackwell Publishing, VSA pp. 60-75
 - Paran I en Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor Appl Genet 85: 985-993
 - Pretorius ZA, Pakendorf KW, Marais GF, Prins R, Komen JS (2007) Challenges for sustainable cereal rust control in South Africa. Aust J Agr Res 58: 593-601
 - Prins R, Groenewald JZ, Marais GF, Snape JW, Koebner RMD (2001) AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theor Appl Genet 103: 618-624
 - Ranade SA, Farooqui N, Bhattacharya E, Verma A (2001) Gene tagging with Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for Molecular Breeding in Plants. Crit Rev Plant Sci 20 (3): 251-275
 - Reiter R (2001) PCR-based marker systems In: Phillips RL en Vasil IK (red.) DNA-Based markers in plants (2^e uitgawe). Kluwer Academic Publishers. pp. 9-25
 - Richter TE en Ronald C (2000) The evolution of disease resistance genes. Plant Molecular Biology 42:195-204
 - Roelfs AP en Groth JV (1980) A comparison of virulence phenotypes in wheat stem rust populations reproducing sexually and asexually. Phytopathology 70: 855-862
 - Russel GE (1978) Studies in the agricultural and food sciences. Plant Breeding for Pest and Disease resistance. Butterworths, London

-
- Saiki RK (1989) The design and optimization of the PCR. In: Erlich HA (red.) PCR technology principles and applications for DNA amplification. Stockton Press NY, VSA, pp. 7-16
 - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^e uitgawe). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
 - Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? Nat Rev Genet 5: 63-69
 - Schneider A, Molnár I, Molnár-Láng M (2008) Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. Euphytica 163(1): 1-19
 - Sears ER (1976) Genetic control of chromosome pairing in wheat. Annu Rev Genet 10: 31-51
 - Shan X, Blake TK, Talbert LE (1999) Conversion of AFLP markers to sequence specific PCR-markers in barley and wheat. Theor Appl Genet 98: 1072-1078
 - Shi ZX, Chen XM, Line RF, Leung H, Wellings CR (2001) Development of resistance gene analog polymorphism markers for *YR9* gene resistance to wheat stripe rust. Genome 44: 509-516
 - Singh DP (1986) Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests. Springer-Verlag, Berlyn
 - Somers DJ (2004) Molecular marker systems and their evaluation for cereal genetics. In: Gupta PK en Varshney PK (red.) Cereal genomics. Cluver Academic Publishers, Nederland, pp. 19-34
 - Sperisen C en Büchler U (1998) Cloning of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to generate codominant genetic markers. In: Karp A, Isaac PG en Ingram DS, (red.) Molecular tools for screening biodiversity. Chapman & Hall, London, pp. 217-221
 - Staples RC (2003) A novel gene for rust resistance. Trends Plant Sci 8: 149-151

-
- Van Slageren MW (1994) Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agricultural University, Nederland, pp. 512
 - Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414
 - Vosman B (1998) Variations on a theme. In: Karp A, Isaac PG en Ingram DS (red.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp. 262-263
 - Wallwork H (red.) (1992) Wheat Rust, Stem Rust, Leaf Rust. In: *Cereal Leaf and Stem Diseases*. Grains Research and Development Corporation, Barton Act, Australië, pp. 8-13
 - Walsh B (2008) Using molecular markers for detecting domestication, improvement, and adaptation genes. *Euphytica* 161(1): 1-17
 - Weder JKP (2002) Influence of Experimental Conditions on the reproducibility of RAPD-PCR Identification of Legumes and Cereals. *Lebensm.-Wis. u. -Technol.* 35(3): 233-238
 - Weising K, Nyboom H, Wolff K, Kahl G (2005) *DNA fingerprinting in plants* (2^e uitgawe). Taylor & Francis Group, VSA.
 - Welsh J en McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218
 - Whalen MC (1993) Advances in breeding for resistance to bacterial pathogens. In: Murray DR (red.) (1993) *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. *Biotechnology in Agriculture* no. 4. CAB International, pp. 299-305
 - Wiese MV (1987) *Compendium of Wheat Disease* (2^e uitgawe). The American Phytopathological Society, Minnesota, VSA

- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6231-6235
- Worland T en Snape JW (2001) Genetic basis of worldwide adaptability of wheat varietal improvement. In: Bonjean AP en Angus WJ (red.) *The World Wheat Book, A history of wheat breeding*. Lavoisier Publishing, Parys, pp. 59-100
- Yan GP, Chen XM, Line RF, Welings CR (2003) Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust. *Theor Appl Genet* 106: 636-643
- Young ND (2000) The genetic architecture of resistance. *Curr Opin Plant Biol* 3: 285–290
- Zhang Z, Xu J, Xu Q, Larkin P, Xin Z (2004) Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 109: 433-139
- Zyskind JW en Bernstein SI (1992) *Recombinant DNA Laboratory Manual*. Academic Press, San Diego, VSA