

**Molekulêre merking van *Thinopyrum distichum* chromosome betrokke by
soutverdraagsaamheid en die karakterisering van trigeneriese (*Triticum/ Secale/*
Thinopyrum) sekondêre hibriede**

deur

Hendrik Johannes Visser

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



Studieleier: Prof. G. F. Marais

Desember 2008

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.

Date: 27 November 2008

Kopiereg © 2008 Universiteit van Stellenbosch

Alle regte voorbehou

OPSOMMING

Thinopyrum distichum ($2n = 4x = 28$; $J_1^d J_1^d J_2^d J_2^d$) is 'n geharde, soutverdraagsame strandkoringgras. Ten einde hierdie soutverdraagsaamheid te benut in verboude grane, moet chromosome wat by die bepaling van die kenmerk betrokke is, molekulêr gekarakteriseer word. Daar is reeds bepaal dat *Th. distichum* chromosome $2J_1^d$, $3J_1^d$, $4J_1^d$ en $5J_1^d$ primêr betrokke is by die soutverdraagsaamheidsinteraksie.

'n Genotipe paneel bestaande uit twee triticale/*Th. distichum* allopoliploïede, twee *Th. distichum*/2*triticale dubbel-haploïede, agt triticale addisielyne (vir chromosome $2J_1^d$; $2J_1^d\beta$; $3J_1^d$; $3J_1^dL$; $4J_1^d$; $4J_2^d$; $5J_1^d$ en $7J_2^d$ onderskeidelik) en twee triticale translokasielyne (betrek onderskeidelik chromosoomarms $3J_1^dS$ en $3J_1^dL$) is gebruik vir fluoressensie-gebaseerde semi-geoutomatiseerde AFLP-merker-ontwikkeling en tot 'n mindere mate vir EST-SSR mikrosatelliet-merker-opsporing, om molekulêre merkers spesifiek vir die kritiese *Th. distichum* chromosome te vind. Mikrosatelliet-analise met 13 EST-SSR inleierpare het vier *Th. distichum* -spesifieke EST-SSR merkers opgelewer, waarvan een spesifiek vir chromosoom $5J_1^d$ was. AFLP-analise met 60 selektiewe *EcoRI/MseI* en 18 *Sse8387I/MseI* inleier-kombinasies, het 159 *Th. distichum*-spesifieke AFLP-fragmente geïdentifiseer. Hieronder was daar sewe merkers vir chromosoom $2J_1^d$, 15 merkers vir $3J_1^d$, een merker vir $4J_1^d$, en twee merkers vir $5J_1^d$.

'n Souttoets is uitgevoer om vas te stel binne watter streke op chromosome $2J_1^d$ en $3J_1^d$ die gene vir soutverdraagsaamheid geleë is. Hiervoor is plante gebruik wat 'n monosomiese addisie van een van twee chromosoom $2J_1^d$ variante (die volledige chromosoom of 'n gemodifiseerde chromosoom = $2J_1^d\beta$), asook een van vier variante vorms van $3J_1^d$ ('n volledige $3J_1^d$ -chromosoom, 'n $3J_1^dL$ -telosoom, 'n $3J_1^dS$ -translokasie, of 'n $3J_1^dL$ -translokasie) besit het. Hieruit is afgelei dat *Th. distichum* chromosoomarms $2J_1^dL$ en $3J_1^dS$ waarskynlik betrokke is by die soutverdraagsaamheidsinteraksie.

'n Groep van 93 trigeneriese (*Triticum/Secale/Thinopyrum*) F_2 sekondêre hibriede is vervolgens ondersoek ten einde: (i) 'n Aantal (tien) van die nuut ontwikkelde AFLP-merkers te evalueer; en (ii) te poog om translokasies, telosome of substitusies wat kritiese *Thinopyrum*

chromosome betrek, op te spoor. Vyf van die tien (50 %) potensiële AFLP-merkers kon heramplifiseer word, en hiervan het vier fragmente geblyk om *Th. distichum* chromosoomspesifieke merkers te wees. Hierdie vier merkers kon ook aan chromosoomarms toegewys word, naamlik E32M49.118 ($2J_1^dS$); E41M49.103 ($2J_1^dS$); E35M49.137 ($3J_1^d$) en E41M49.188 ($3J_1^dL$). Die selektiewe inleier-kombinasie wat merker E41M49.103 ($2J_1^dS$) opgelewer het, het ook 'n fragment van dieselfde grootte in $4J_1^d$ geamplifiseer. Hierdie molekulêre merkers kan handig gebruik word vir die verdere kartering en seleksie van soutverdraagsaamheid.

Die feit dat slegs vier van die tien ge-evalueerde AFLP-merkers geblyk het om werklik spesifieke merkers te wees, beteken egter dat die ongetoetsde merkers ook eers teen 'n groter genotipe paneel bevestig sal moet word alvorens hul gebruik kan word. Moontlike redes vir die relatief lae frekwensie merkers wat konsekwent nuttig blyk te wees, word bespreek. Dit het uit die merker-assosiasie geblyk dat dit ook noodsaaklik is om alle elektroferogramme, wat geskep word deur AFLP-fragment analise, visueel te ondersoek ten einde alle AFLP-fragmente suksesvol te identifiseer.

Gebruik van die STS-/SCAR-merkers het daarop gedui dat 18 van die groep van 93 sekondêre hibriede 'n waarskynlike $3J_1^dL$ -translokasie dra. Verskeie F_2 sekondêre hibriede het geblyk om potensiële translokasies te besit wat chromosome $4J_1^d$ en $5J_1^d$ betrek, maar dit kon nie bevestig word nie. 'n Aantal hibriede wat moontlik kritiese *Th. distichum* substitusies besit is geïdentifiseer, maar moet nog bevestig word. Hierdie materiaal kan nuttig aangewend word vir die verdere karakterisering van soutverdraagsaamheid in *Thinopyrum*, met die uiteindelijke doel om dit te benut in verboude grane.

ABSTRACT

Thinopyrum distichum ($2n = 4x = 28$; $J_1^d J_1^d J_2^d J_2^d$) is a hardy, salt-tolerant maritime wheatgrass indigenous to southern Africa. In order to transfer its salt-tolerance to cultivated cereals, the *Thinopyrum* chromosomes involved must first be characterized with molecular markers. *Thinopyrum distichum* chromosomes $2J_1^d$, $3J_1^d$, $4J_1^d$ and $5J_1^d$ have previously been found to be major determinants of salt-tolerance.

A genotype panel consisting of two triticale/*Th. distichum* allopolyploids, two *Th. distichum*/2*triticale doubled-haploids, eight triticale addition-lines (for chromosomes $2J_1^d$; $2J_1^d\beta$; $3J_1^d$; $3J_1^dL$; $4J_1^d$; $4J_2^d$; $5J_1^d$ and $7J_2^d$, respectively) and two triticale translocation-lines (involving chromosome arms $3J_1^dS$ and $3J_1^dL$, respectively) were used for fluorescence-based, semi-automated AFLP-analyses and to a lesser extent for EST-SSR microsatellite marker-development, to identify molecular markers specific to the critical *Th. distichum* chromosomes. Thirteen EST-SSR primer pairs produced four putative *Th. distichum*-specific microsatellite-markers, one of which was specific for critical chromosome $5J_1^d$. AFLP-analysis with 60 selective *EcoRI/MseI* and 18 *Sse8387I/MseI* primer combinations produced 159 AFLP-fragments specific for *Th. distichum*. These included seven putative markers for chromosome $2J_1^d$, 15 for $3J_1^d$, one marker for $4J_1^d$ and two for $5J_1^d$.

A salt-tolerance experiment was done to determine which chromosome $2J_1^d$ and $3J_1^d$ regions may carry genes for salt-tolerance. Plants were selected that had a monosomic addition of a chromosome $2J_1^d$ variant (either the complete chromosome or a modified version referred to as $2J_1^d\beta$) in addition to one of four chromosome $3J_1^d$ variants (the complete $3J_1^d$ chromosome; a $3J_1^dL$ -telosome; a $3J_1^dS$ -translocation or a $3J_1^dL$ -translocation). The results suggested that *Th. distichum* chromosome-arms $2J_1^dL$ and $3J_1^dS$ are probably involved in salt-tolerance.

A group of 93 trigeneric (*Triticum/Secale/Thinopyrum*) F_2 secondary hybrids were then analyzed in order to: (i) Evaluate some (ten) of the newly developed putative AFLP-markers; and (ii) attempt to find translocations, telosomes or substitutions involving the critical *Thinopyrum* chromosomes. Five (50 %) of the ten putative AFLP-markers could be reproduced, but only four proved to be chromosome-specific. It was also possible to assign

these four markers to chromosome arms: E32M49.118 (2J₁^dS); E41M49.103 (2J₁^dS); E35M49.137 (3J₁^d); and E41M49.188 (3J₁^dL). The selective primer combination that produced marker E41M49.103 (2J₁^dS), also amplified a fragment of the same size on chromosome 4J₁^d. These markers will be useful for further mapping and selection of the salt-tolerance genes.

The fact that only four of the ten putative AFLP-markers evaluated proved to be repeatable implies that the remaining untested markers need to be confirmed against larger genotype panels as well. Probable reasons for the relatively low frequency of markers that turned out to be reliable are discussed. The marker-association study also revealed that visual examination of all electropherograms produced by AFLP-fragment analysis is necessary to correctly identify all AFLP-fragments.

Use of the AFLP- and STS-/SCAR-markers in conjunction with the group of 93 F₂ secondary hybrids showed that 18 of these probably carried a 3J₁^dL-translocation. Several hybrids possibly had translocations involving the 4J₁^d and 5J₁^d chromosomes. However, these results need to be confirmed. Various hybrids also appeared to have critical *Th. distichum* substitutions, although this still requires further confirmation. The identified plant material could prove useful for further characterization of salt-tolerance in *Thinopyrum*, and its eventual utilization in cereal crops.

LYS VAN AFKORTINGS

A	Adenien
AFLP	‘Amplified Fragment Length Polymorphism’
ATP	Adenosien Trifosfaat
<i>Bgl</i> III	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Bacillus globigii</i>
bp	Basispare
BSA	‘Bovine Serum Albumin’
°C	Grade Celsius
C	Sitosien
CaMV	‘Cauliflower Mosaic Virus’
cDNS	Komplimentêre DNS
cfe	Pierre Sourdille mikrosatelliet-inleier
CIMMYT	‘Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo’
cM	Sentimorgan
cm	Sentimeter
CTAB	‘N-Cetyl-N, N, N-trimethyl Ammonium Bromide’
dH ₂ O	Gedistilleerde water
DNS	Deoksiribonukleïensuur
dNTPs	Deoksinukleosied trifosfate
dS.m ⁻¹	Decisiemens per meter
<i>Eco</i> RI	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Escherichia coli</i> ras R
EK	Elektriese Konduktiwiteit
EST-SSR	‘Expressed Tequence Tag derived Simple Sequence Repeat’
6-FAM	6-carboxy-fluorescein
F	‘Forward’
F ₂	Tweede Filiaal
FISH	Fluoresserende <i>In Situ</i> Hibridisasie
µg	Mikrogram
G	Guanien
g	Gram
gDNS	Genomiese DNS

GISH	Genomiese <i>In Situ</i> Hibridisasie
ha	Hektar
<i>HindIII</i>	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Haemophilus influenzae</i> ras d
JOE	2', 7'-dimethoxy-4', 5'-dichloro-6-carboxyrhodamine
μL	Mikroliter
L	Liter
μM	Mikromolaar
M	Molaar
m	Meter
MAS	'Marker Assisted Selection'
mg	Milligram
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolaar
mm	Millimeter
<i>MseI</i>	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Micrococcus</i> sp.
2n	Diploïed
n	Haploïed
Na ₂ EDTA	'Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid di-sodium salt'
NED	2, 1', 8'-benzo-5'-fluoro-2', 4, 7-trichloro-5-carboxyfluorescein
ng	Nanogram
pH	Persentasie Waterstof
PKR	Polimerase Ketting Reaksie
<i>PstI</i>	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Providencia stuartii</i>
R	'Reverse'
RAPD	'Random Amplified Polymorphic DNA'
RFLP	'Restriction Fragment Length Polymorphism'
RGA	'Resistance Gene Analogs'
RO dH ₂ O	Gedistilleerde tru-osmose water
ROX	'6-carboxy-X-rhodamin'
RNS	Ribonukleïensuur
RSA	Republiek van Suid Afrika
SCAR	'Sequence Characterized Amplified Region'
sp	Spesie(s)

<i>Sse</i> 8387I	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Streptomyces</i> sp. ras 8387
ssp	Subspesie(s)
SSR	‘Simple Sequence Repeat’
STS	‘Sequence Tagged Site’
T	Timien
<i>Taq</i>	DNS Polimerase ensiem geïsoleer uit <i>Thermus aquaticus</i>
<i>Taq</i> I	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	‘Tris/Borate/EDTA’
TE	‘Tris/EDTA’
TEMED	‘N, N, N, N- Tetramethyleendiamine
Tris	‘2-amino-2-hydroxymethylpropane-1, 3-diol’
U	‘Units’
US	Universiteit van Stellenbosch
UV	Ultra Violet
V	Volt
v/v	Volume per volume
VK	Verenigde Koningryk
VSA	Verenigde State van Amerika
W	Watt
w/v	gewig per volume
<i>Xba</i> I	Restriksie ensiem geïsoleer uit <i>Xanthomonas badrii</i>

BEDANKINGS

- Prof. Frans Marais, sonder wie se kennis, hulp en insette, hierdie studie nie moontlik sou gewees het nie. Dit was 'n absolute voorreg om u as studieleier te hê.
- Die Wintergraantrust, vir befondsing.
- My ouers, vir hul ondersteuning.
- Suné van der Vyver, vir haar liefde.
- God, vir die vermoë en die geleentheid om hierdie studie aan te pak.

INHOUD

Verklaring	ii
Opsomming	iii
Abstract	v
Lys van Afkortings	vii
Bedankings	x
Inhoud	xi
1. Inleiding en Literatuurstudie	1
1.1 Noodsaaklikheid van ‘n soutverdraagsame graangewas	1
1.2 Negatiewe effekte van soutgronde en genetiese meganismes wat dit kan oorbrug	2
1.3 Intra-spesifieke variasie vir soutverdraagsaamheid	6
1.4 Gebruik van wilde grasspesies as bronne van soutverdraagsaamheidsgene	7
1.5 Hibridisasie van <i>Thinopyrum distichum</i> en triticale	14
1.6 Ontwikkeling van soutverdraagsame <i>Th. distichum</i> /tritcale amfiploïede	16
1.7 Merkers en Merker-bemiddelde-seleksie (MAS)	19
1.8 Uitgedrukte-volgorde-etiket Eenvoudige-volgorde-herhalings (EST-SSR’s)	20
1.9 Geamplifiseerde-fragmentlengte-polimorfismes (AFLP’s)	22
1.10 Studie doelwitte	25
2. Materiaal en Metodes	27
2.1 Plantmateriaal en DNS-ekstraksies	27
2.2 Merker-gebaseerde seleksie van plantmateriaal	28
2.3 Opsporing van <i>Thinopyrum</i> -spesifieke EST-SSR-merkers	29
2.4 Ontwikkeling van AFLP-merkers	31
2.5 Evaluasie van soutverdraagsaamheid daargestel deur chromosome 2J ₁ ^d en 3J ₁ ^d	35
2.6 Merker-assosiasies in ‘n groep sekondêre hibriede	37
3. Resultate en Bespreking	43
3.1 gDNS-ekstraksies vir merker-ontwikkeling	43
3.2 Merker-gebaseerde seleksie van plantmateriaal vir merker-ontwikkeling	44
3.3 <i>Th. distichum</i> -spesifieke EST-SSR merkers	45
3.4 AFLP-merker ontwikkeling	50

3.5 Teenwoordigheid van <i>Th. distichum</i> chromatien in spilgenotipe 79S15A	62
3.6 Soutverdraagsaamheidsevaluasie	64
3.7 Merker-assosiasie studie	71
4. Algemene Bespreking	80
5. Literatuurlys	82

1. Inleiding en Literatuurstudie

1.1 Noodsaaklikheid van 'n soutverdraagsame graangewas

Voortgesette groei van die globale menslike bevolking noodsaak volgehoue en selfs verhoogde voedselproduksie. Die menslike bevolking sal na raming teen 2050, 9.2 biljoen haal (<http://esa.un.org/unpp/p2k0data.asp>). 'n Bevolking van hierdie orde sal 'n groot toename in voedselproduksie noodsaak. Ongeveer vyftig persent van die wêreld se landoppervlakte is droë, woestynagtige gebiede (<http://www.fao.org/ag/agl/agll/terrastat/>) wat slegs vir landboudoeleindes gebruik kan word indien besproeiing moontlik is. Slegs 16 % van die wêreld se landbougrond is tans onder besproeiing, en hierop word ongeveer 40 % van die wêreld se voedsel geproduseer (Brown *et al.*, 1995). Tussen 1979 en 2003 het die totale landarea onder besproeiing van 2.1×10^8 ha tot 2.8×10^8 ha gestyg (<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html>).

Omvangryke besproeiing sal egter moeilik volhoubaar wees in 'n era waar varswaterbronne al hoe skaarser word. Onvoorspelbare klimaatsverandering is 'n baie werklike bedreiging, en varswaterbronne gaan voortdurend verlore as gevolg van besoedeling en versouting (Ghassemi *et al.*, 1995). Besproeiing bespoedig boonop die proses van grondversouting wanneer water op landerye toegedien word en verdamp om soute agter te laat wat met tyd in die grond ophoop. Na raming het soveel as 9×10^8 ha landarea 'n hoë sout-inhoud (Szabolcs, 1994), wat die opbrengste van verskeie voedselgewasse beperk (Flowers en Yeo, 1995; Munns, 2002). Dit is dus logies dat die verbetering van soutverdraagsaamheid van voedselgewasse 'n groot rol in toekomstige voedselproduksie sal speel.

Koring (*Triticum* spp.) is een van die wêreld se mees verboude graan-gewasse, en die jaarlikse koringproduksie is meer as 6×10^8 metrieke ton (<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#anchor>). Koring opbrengste word deur hoë soutinhoud van die grond of besproeiingswater verlaag, selfs al is dit bekend as 'n matig-soutverdraagsame gewas (Maas en Hoffman, 1977). Koring sal byvoorbeeld steeds groei in grond waar die sout-konsentrasie 100 mM NaCl (elektriese konduktiwiteit [EK] van ongeveer $10 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) bereik, maar sal minder opbrengs lewer. Langdurige blootstelling aan sout-konsentrasies hoër as 100 mM lei uiteindelik tot dood van die plante.

1.2 Negatiewe effekte van soutgronde en genetiese meganismes wat dit kan oorbrug

Hoë konsentrasies sout in grondwater lei op twee maniere tot verlaagde groeikrag van plante. Eerstens verminder sout die vermoë van plante om water uit die grond op te neem. Hierdie osmotiese beperking vertraag dan die plant se groei. Tweedens word groot hoeveelhede sout in die plant se transpirasie-sisteem opgeneem, wat dan selle in die blaarweefsels skaad. Hierdie sout-spesifieke effek lei tot verdere vertraging van die plant se groei (Munns, 1993). Saam veroorsaak hierdie twee effekte dan twee identifiseerbare groeifases in plante wat blootgestel word aan hoë sout-konsentrasies. Die eerste fase van groei word gekenmerk deur vertraagde blaar- en stingelgroei weens 'n watertekort. Die tweede fase word gekenmerk deur afsterwe van selle as gevolg van sout-toksisiteit. Selle kan nie meer soutione kompartementaliseer in die vakuole nie en sterf as gevolg van ionvergiftiging (Munns *et al.*, 2006).

'n Kommersieël suksesvolle sout-verdraagsame gewas sal die volgende kritiese eienskappe moet hê:

- (i) Die vermoë om opname van Na^+ en Cl^- te beperk (Tester en Davenport, 2003)
- (ii) Volgehoue K^+ opname ten spyte van 'n baie hoë Na^+/K^+ verhouding (Gorham, 1993)
- (iii) Die vermoë om ione te kompartementeer in vakuole, en dus osmolariteit te kan beheer (Wyn Jones *et al.*, 1977)
- (iv) Weefsels besit wat verdraagsaam is ten opsigte van baie hoë Na^+ en Cl^- vlakke (Greenway en Munns, 1980)
- (v) 'n Vermoë om Na^+ en Cl^- te akkumuleer in ouer, eerder as jonger, blare (Wolf *et al.*, 1991)
- (vi) Retensie van Na^+ en Cl^- ione in die bundelskede (Ashraf en O'Leary, 1997)
- (vii) Goeie groeikrag
- (viii) 'n Hoë transpirasie-effektiwiteit (Colmer *et al.*, 2005)
- (ix) Vroeë blom en saadset (Hollington *et al.*, 2002).

Hierdie soutverdraagsaamheidseienskappe word deur verskeie genetiese meganismes beheer. In reaksie op blootstelling aan hoë konsentrasies sout, modifiseer sodanige meganismes geen-

uitdrukkingspatrone in die plant. Stroom-af metaboliese paaie word beïnvloed terwyl die plant poog om ion-homeostase te handhaaf. Die spesifieke funksionering van die onderliggende genetiese meganismes en hoe hulle met die tersaaklike biochemiese paaie wisselwerk, is nog grootliks onbekend, maar hulle is hoofsaaklik gerig op die beheer van membraan ion-vervoer, Na^+/K^+ diskriminasie, ion-kompartementering en osmoliet biosintese (Hasegawa *et al.*, 2000). Verskeie genetiese en funksionele studies het egter waardevolle inligting opgelewer rakende soutverdraagsaamheidsmeganismes (Flowers, 2004).

In soutverdraagsame plante word membraan ion-vervoer gebruik om sitosoliese Na^+ konsentrasies by 'n optimale vlak te hou. Die vernaamste meganisme waardeur dit geskied is sekondêre aktiewe vervoer. Sogenaamde plasmamembraan proton-pompe (H^+ -ATPase) word ingespan om 'n elektrochemiese gradiënt oor die plasmamembraan te skep. Hulle verplaas voortdurig H^+ van binne die sel na buite deur dit te koppel aan die hidrolise van adenosien trifosfaat (ATP). Die proton motoriese krag wat so ontstaan, word dan ingespan om Na^+ met behulp van spesifieke membraanproteïene (Na^+/H^+ teenvervoerders = 'antiporters') uit die sel te verwyder (Yu *et al.*, 2007).

Die membraanvervoer van K^+ onder hoë Na^+ konsentrasies is van kardinale belang vir soutverdraagsame plante. Kalium is 'n noodsaaklike ko-faktor vir baie ensieme en kompeteer met nie-essensiële Na^+ , aangesien hulle deur dieselfde membraanproteïene vervoer word (Niu *et al.*, 1995; Amtmann en Sanders, 1999). Die vermoë om te diskrimineer tussen Na^+ - en K^+ -opname is dus essensieël vir 'n soutverdraagsame plant. Kalium vervoer word bemiddel deur twee tipes membraanproteïene. Die eerste tipe het 'n hoër affiniteit vir K^+ -opname as Na^+ -opname. Voorbeelde hiervan is die membraan-proteïene wat deur die gene *Hkt1* en *Hak1* gekodeer word (Niu *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 1995). Die tweede tipe membraanproteïen verantwoordelik vir die vervoer van katione het 'n baie laer Na^+/K^+ selektiwiteit byvoorbeeld die *Akt1* en *Akt2* geenprodukte (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). Ten opsigte van gene betrokke by K^+/Na^+ diskriminasie in koring, was die *Kna1* lokus een van die eerstes wat geïdentifiseer kon word (Dubcovsky *et al.*, 1996; Gorham *et al.*, 1997). 'n Latere studie het getoon dat durumkoring ook twee hoof Na^+ -uitsluitingsgene, naamlik *Nax1* en *Nax2*, besit, wat soortgelyk aan die *Kna1* lokus funksioneer (Lindsay *et al.*, 2004). Daar is ook gevind dat membraanvervoer van K^+ indirek beheer word deur 'n enkele lokus, *SOS3*, wat kodeer vir 'n produk wat inskakel by 'n seintransduksie weg, en sodoende hoë- en laë-affiniteits K^+ opname beheer (Maathuis *et al.*, 1997).

Kompartementering van ione in vakuole en sitoplasmiese sakkies ('vesicles') is nog 'n manier waarop soutverdraagsame plante die negatiewe effekte van hoë soutkonsentrasies oorbrug. Net soos in die geval van Na^+ -vervoer oor die plasmamembraan, speel protonpompe hier 'n groot rol. Die aktiwiteit van die protonpompe word transkripsioneel beheer (Binzel en Ratajczak, 2000). Tonoplas-geassosieerde H^+ -ATPase en H^+ -pirofosfatase protonpompe verplaas H^+ uit die sitosol na binne die vakuool om sodoende 'n proton elektrochemiese potensiaal oor die tonoplas te skep (Lüttge en Ratajczak, 1997; Zhien *et al.*, 1997). Hierdie proton motoriese krag word dan deur H^+/Na^+ teenvervoerders aangewend om Na^+ na die binnekant van die vakuool te verplaas. Voorbeelde hiervan is die produkte van *NHX1* (Apse *et al.*, 1999) en *TaNHX2* gene (Yu *et al.*, 2007). Chloried-ione word ook in die vakuool gekompartementeer. Daar word bespiegel dat dit moontlik plaasvind met behulp van 'n draer-molekule, anioon-kanaal of 'n H^+ /anioon teenvervoerder (Hechenberger *et al.*, 1996; Sze *et al.*, 1999).

Osmotiese aanpassing deur middel van osmoliet biosintese is 'n nog 'n voorbeeld van die unieke strategieë wat halofiete gebruik om in omgewings met hoë soutkonsentrasies te oorleef. Osmotikums kan gedefinieer word as metaboliete wat in die sitosol opgehoop word om sodoende die osmotiese potensiaal te verander sonder om normale metaboliese reaksies te inhibeer. In die geval van halofiete wysig die osmotikums die osmotiese potensiaal op so 'n manier dat osmose wel na plantselle toe plaasvind, ten spyte daarvan dat die plant in 'n hiper-osmotiese omgewing voorkom. Osmoliet biosintese is nou gekoppel aan basiese metaboliese paaie (McCue en Hanson, 1990). In reaksie op osmotiese stremming word uitdrukking van die ensieme wat benodig word vir osmoliet biosintese, geïnduseer. Voorbeelde van sulke osmotikums wat algemeen in plante gevind word is prolien (Delauney en Verma, 1993), glisien-betaïen (McCue en Hanson, 1990), D-pinitol (Vernon en Bohnert, 1992) en ektoïen (Galinski, 1995).

Die graad van soutverdraagsaamheid in 'n plant word deur die volgende bepaal: i) Gene wat kodeer vir proteïene betrokke by die vervoer van ione oor membrane; ii) Ensieme wat verantwoordelik is vir osmoliet biosintese; iii) Proteïene wat plantselle beskerm teen ion-skade; en iv) Komponente van seintransduksieweë wat met osmotiese stremmingsreaksies wisselwerk (Hasegawa *et al.*, 2000). Met die ontdekking van al die tersaaklike loci sou dit logies wees om in opvolgstudies te fokus op die direkte oordrag en ooruitdrukking van hierdie

gene in teikenplante. Verskeie plantspesies is reeds getransformeer met gene wat kodeer vir membraan ionvervoerders en ensieme wat osmoliete sintetiseer, en aanspraak is gemaak op verbeterde soutverdraagsaamheid (Flowers, 2004). Die meeste studies het wel op ander plantsoorte as koring gefokus, maar die meganismes bly ewe toepaslik.

Kasuga *et al.* (1999) het 'n geen, *DREB1A*, wat kodeer vir 'n transkripsiefaktor met behulp van 'n konstitutiewe blomkoolmosaïekvirus ('cauliflower mosaic virus' = CaMV) 35S-promotor ooruitgedruk in *Arabidopsis thaliana* plante. Die *DREB1A* transkripsiefaktor wisselwerk met 'n *cis*-werkende element (DRE) wat uitdrukking van soutverdraagsaamheidsgene aktiveer. Hulle het gevind dat ooruitdrukking van *DREB1A* wel gelei het tot verbeterde soutverdraagsaamheid, maar dat dit groei baie negatief beïnvloed het.

Rus *et al.* (2001) het tamatieplante (*Lycopersicon esculentum*) getransformeer (*Agrobacterium tumefaciens* sisteem) met die gis (*Saccharomyces cerevisiae*) *HAL1*-geen. Die *HAL1*-geenprodukt lei tot verbeterde K^+/Na^+ diskriminasie. Transgeniese tamatieplante wat aan hoë soutkonsentrasies blootgestel is het verbeterde vrugset en opbrengs getoon, en blare het verbeterde K^+ - en waterinhoud gehad in vergelyking met ongetransformeerde plante.

In grasspesies is daar ook vordering gemaak. Xue *et al.* (2004) het getoon dat soutverdraagsaamheid van koring (*Triticum aestivum*) verbeter kan word deur direkte geen-oordrag. Hulle groep het die *AtNHX1*-geen deur *Agrobacterium*-transformasie vanaf *A. thaliana* na koringlyne oorgedra. Die *AtNHX1*-geen kodeer vir 'n vakuolêre Na^+/H^+ teenvervoerder. Transformante het laer vlakke van Na^+ in die plantweefsel getoon, en het agonomies beter presteer in soutgrond ekstrakte (EK van 10.6 en 13.7 dS.m⁻¹) as ongetransformeerde plante. 'n Jaar later het Wu *et al.* (2005) soutverdraagsaamheid van 'n voergewas (die roggras-spesie *Lolium perenne*) verbeter toe hulle met behulp van *Agrobacterium*-bemiddelde transformasie die *OsNHX1*-geen vanaf rys (*Oryza sativa*) oorgedra het. Die *OsNHX1*-geen kodeer vir 'n vakuolêre Na^+/H^+ teenvervoerder.

Karaba *et al.* (2007) het die *A. thaliana* *HARDY* (*HRD*) geen suksesvol ooruitgedruk in rysplante. Die *HARDY* geen is 'n AP2/ERF-volgorde-verwante transkripsiefaktor en besit 'n mutasie wat ooruitdrukking veroorsaak, maar sy rol in daarstelling van soutverdraagsaamheid is nog onbekend. Die getransformeerde rysplante het beter waterverbruik getoon en het oor

die algemeen beter geprester in terme van biomassa-produksie en saadopbrengs. Die transformante was ook meer soutverdraagsaam.

Meeste van hierdie studies het egter tot klein inkrementele verbeterings in soutverdraagsaamheid gelei. Aangesien dit 'n poligeniese eienskap is, kan daar verwag word dat die oordrag van 'n enkele geen nie 'n noemenswaardige verbetering in soutverdraagsaamheid sal lewer nie. Feitlik al die studies tot op hede het egter gebreke en skep twyfel omtrent die ware mate van soutverdraagsaamheid van die transformante as gevolg van swak eksperimentele ontwerpe, die uiteenlopende parameters wat gemeet word, en onvolledige datastelle (Flowers, 2004).

1.3 Intra-spesifieke variasie vir soutverdraagsaamheid

Verskeie benaderings, anders as direkte geen-oordrag, is reeds voorgestel vir die ontwikkeling van meer soutverdraagsame landbougewasse: (i) Ontwikkeling en gebruik van halofiete plante as alternatiewe landbougewasse; (ii) Gebruik van interspesie hibridisasie om soutverdraagsaamheidsgene na bestaande landbougewasse oor te dra; (iii) Soek en gebruik van nuwe variasie vir soutverdraagsaamheid wat alreeds in landbougewasse voorkom; (iv) Skep van nuwe geenkombinasies en variasie met behulp van herhalende seleksie en mutasieteling (Flowers en Yeo, 1995).

Die eenvoudigste benadering in die soektog na soutverdraagsaamheidsgene, is om ondersoek in te stel na variasie wat alreeds in koring-kultivars en landrasse voorkom. Die materiaal is geredelik beskikbaar, goed gekarakteriseer en gaan nie gebuk onder die genomiese onstabieliteit wat geassosieer word met hibriede tussen intergeneriese spesies (allopoliploïede), nie (sien afdeling 1.4).

Kingsbury en Epstein (1984) het meer as 5000 heksaploïede broodkoringlyne (*T. aestivum* ssp. *aestivum*) ondersoek vir hul vermoë om in 80 % seewater te ontkiem. Saailinge wat oorleef het is vervolgens toegelaat om in 50 % seewater te groei. Slegs plante wat oorleef en sade geset het, is toegelaat om verder te groei in soutoplossings met 'n EK van 28 dS.m⁻¹ en is uiteindelik geëvalueer in terme van biomassa. Die resultate was egter onvolledig en 'n gevolgtrekking omtrent die opbrengs van die plante kon nie gemaak word nie. 'n Studie van

Srivastava en Jana (1984) het ongeveer 3000 broodkoring- en tetraploïede durumkoringlyne (*T. turgidum* ssp. *durum*) gesif vir eienskappe soos ontkiemingsvermoë, groeikrag en saadset onder soutstremming. Twee verdere studies het ondersoek ingestel na variasie in soutverdraagsaamheid tussen *Triticum* lyne (Sayed, 1985) en Europese en Egiptiese broodkoring landrasse (Martin *et al.*, 1994). Hierdie studies het gewys dat daar wel aansienlike variasie vir soutverdraagsaamheid binne die koringspesies/-lyne voorkom, maar nie een van die studies het hul bevindings opgevolg deur belowende lyne te evalueer in terme van agronomiese prestasie nie. Die studies het ook almal bevind dat saailing-oorlewing in soutoplossings nie noodwendig ook 'n aanduiding van gesonde groei is nie. Dit het ook bewys dat indien 'n saailing soutverdraagsaam is, dit nie outomaties ook as volwasse plant soutverdraagsaam sou wees nie (Colmer *et al.*, 2005).

Nog 'n bron van variasie vir soutverdraagsaamheid is die voorsate van koring. Broodkoring (AABBDD) is 'n natuurlike alloheksaploïed wat evolusionêr ontstaan het na die hibridisasie van diploïede *Aegilops tauschii* (DD) en tetraploïede emmerkoring (*T. dicoccum* = AABB). Emmerkoring is op sy beurt weer 'n allotetraploïed wat gevorm het na hibridisasie van die diploïede *T. urartu* (AA) en diploïede *Ae. speltoides* (BB). Deur te soek vir soutverdraagsaamheidsvariasie onder hierdie voorouers en dit deur wye hibridisasie en terugkruising te inkorporeer in koringlyne, kan nuwe variasie bekom word en gebruik word om uiteindelik soutverdraagsame koring-kultivars daar te stel. Schachtman *et al.* (1991) het 460 *Ae. tauschii* lyne ondersoek en gevind dat daar aansienlike variasie is in blaar Na⁺-vlakke nadat die plante in 150 mM NaCl-oplossing gekweek is. *Aegilops tauschii* lyne met lae Na⁺-vlakke is met tetraploïede durumkoring gehibridiseer. Na verdubbeling van die F₁ chromosoomgetalle is sintetiese heksaploïede koringlyne daargestel (Schachtman *et al.*, 1992). Onder souttoestande het hierdie lyne tot 50 % beter opbrengs gehad as kultivars soos "Kharchia" ('n Indiese landras wat bekend is vir soutverdraagsaamheid). Daar is ook gevind dat *T. urartu* beter Na⁺-uitsluiting en K⁺/Na⁺-diskriminasie toon in vergelyking met durumkoring (Gorham *et al.*, 1990).

1.4 Gebruik van wilde grasspesies as bronne van soutverdraagsaamheidsgene

Poliploïedie is 'n natuurlike verskynsel onder plante, en tussen 50 % en 70 % van alle angiosperme het ontstaan uit een of ander vorm van poliploïedie (Masterson, 1994).

Poliploëdie kan opgedeel word in twee tipes: i) outoploëdie, waar 'n enkele genoom vermenigvuldig (bv. verdubbel); en ii) allopoliploëdie, waar twee diverse genome kombineer. Allopoliploëde staan ook bekend as amfiploëde, en kan op drie verskillende wyses ontstaan: a) deur chromosoomverdubbeling na interspesifieke hibridisasie; b) deur versmelting van ongereduseerde gamete; c) deur versmelting van gereduseerde gamete van twee verskillende outotetraploëde spesies (Chen en Ni, 2006). Die eerste wyse (chromosoomverdubbeling na hibridisasie) staan ook bekend as wye hibridisasie en kan gebruik word om nuwe sintetiese landbougewasse te skep, soos in die geval van triticales (*Triticum* × *Secale*).

Wye hibridisasie is 'n bekende konsep onder planttelers. Dit behels die intergeneriese kruising van twee verskillende, maar ver langs verwante spesies, en lei tot die produksie van sogenaamde amfiploëde. Chromosoomverdubbeling word bewerkstellig deur behandeling met kolgisien, en embrioredding is gewoonlik nodig. Die koördinerings van geenuitdrukking in 'n groot komplekse genoom soos in die geval van 'n amfiploëde is 'n reuse taak, en word nog nie volledig verstaan nie. Wat wel al bewys is, is dat allopoliploëde genome geneig is om gemodifiseer te word deur die aktivering van transposons, nukleotiedvolgorde verwydering, sitosien-metilerings, inter-chromosomale uitruilings, geenuitdwinging en veranderings in geenuitdrukking (McClintock, 1984; Song *et al.*, 1995; Comai, 2000).

Een van die belowendste benaderings tot die ontwikkeling van soutverdraagsame koringkultivars, behels die gebruik van wilde grasspesies wat selfs minder verwant is aan koring as die *Triticum* spesies (Colmer *et al.*, 2006). Hieronder resorteer halofiete soos *Aegilops* ssp., *Thinopyrum* ssp., *Hordeum* ssp. en *Elytrigia elongata* (sinoniem *Lophopyrum elongatum*), wat die vermoë besit om die opname van Na⁺-ione te beperk. Verskeie van hierdie wilde grasspesies, onder andere die *Thinopyrum* subspecies kan met durumkoring en broodkoring gehibridiseer word.

Een van die eerste pogings om so 'n nuwe soutverdraagsame graangewas te skep was dié van Gorham *et al.* (1986) en Forster *et al.* (1987). Hul studies het aanvanklik gefokus op die soutverdraagsaamheid van amfiploëde en disomiese addisielyne afkomstig uit kruisings van onderskeidelik *Th. bessarabicum* ($2n = 2x = 14$; $E^bE^b = JJ$) en *Agropyron junceum* ($2n = 2x = 14$; E^bE^b) met heksaploëde broodkoring (Forster *et al.*, 1988). Die amfiploëde het 'n diploëde chromosoomgetal van 56 gehad (21 pare koring-chromosome en 7 *Thinopyrum* chromosoompare). Die standaard koring-kultivar "Chinese Spring" het doodgegaan by 'n

sout-konsentrasie van 250 mM, terwyl die amfiploïede oorleef het en selfs sade geproduseer het. Amfiploïede wat terug-gekruis is na “Chinese Spring” het 42 koring-chromosome en 7 enkel *Thinopyrum* chromosome besit. Laasgenoemde F₁ was steeds meer soutverdraagsaam as koring maar swakker as die primêre amfiploïed. Dit dui daarop dat volle uitdrukking van soutweerstand in *Thinopyrum* afhanklik is van ‘n dubbele geendosis (Forster *et al.*, 1987). Die volgende stap was om te bepaal watter *Thinopyrum* chromosome die soutverdraagsaamheidsgene dra, en vir hierdie doel is addisielyne vir chromosome 2E^b en 5E^b geskep (Forster *et al.*, 1988). Twee groepe tetrasomiese koringlyne (een groep tetrasomies vir groep 2 homoeoloë chromosome, en die ander groep tetrasomies vir groep 5 homoeoloë) is in die toetsing ingesluit om vergelykings tussen die groep 2 en 5 chromosome van *Thinopyrum* en koring te tref. Daar is gevind dat enige addisie van ‘n groep 2 chromosoom (2A, 2B, 2D, of 2E^b) plante minder soutverdraagsaam maak het. Dit het geïmpliseer dat daar soutgevoeligheidsgene op die groep 2 homoeoloë chromosome voorkom. Met die toetsing van die groep 5 chromosome is gevind dat slegs 5E^b addisielyne, asook die oorspronklike amfiploïede, kon groei en oorleef by ‘n soutkonsentrasie van 200 mM. Opbrengs in terme van droë massa en saadset van die amfiploïed was aansienlik hoër as dié van die addisielyne. Hieruit is afgelei dat *Thinopyrum* chromosoom 5E^b óf ‘n enkele óf veelvoudige hoofgene besit wat soutverdraagsaamheid verleen.

Nadat vasgestel is dat daar ten minste een hoof soutweerstandsgen op chromosoom 5E^b van *Th. bessarabicum* voorkom (Forster *et al.*, 1988), het die groep aandag geskenk aan die verbetering van die lewenskragtigheid van hul hibriede lyne (King *et al.*, 1993a). Al die addisielyne het verlaagde groeikrag getoon, waarskynlik as gevolg van geenduplikasie. Om die probleem te oorkom het hulle hibriede substitusielyne ontwikkel, waar groep 5 homoeoloë chromosome 5A, 5B, en 5D beurtelings vervang is met *Th. bessarabicum* chromosoom 5E^b (King *et al.*, 1993a). Substitusielyne kon verkry word deur 5E^b disomiese addisielyne as stuifmeel-ouer te kruis met plante wat monosomies vir chromosome 5A, 5B, of 5D was. F₁-plante is selfbestuif, en genetiese merkers asook genomiese *in situ* hibridisasie (GISH) is ingespan om monosomiese en disomiese substitusielyne onder die F₂- en F₃-plante te identifiseer (King *et al.*, 1993a). Die 5E^b addisie- en substitusielyne asook die koringkultivar “Chinese Spring” is onderwerp aan souttoetsing (King *et al.*, 1996). Die resultate was merkwaardig: Eerstens het die 5E^b addisielyne ‘n hoër oorlewingspersentasie as “Chinese Spring” getoon; tweedens was die oorlewingspersentasies van beide die 5E^b (5A) en die 5E^b (5D) substitusielyne aansienlik beter as dié van “Chinese Spring”; derdens was die

oorlewingspersentasies van die substitusieelne selfs hoër as dié van die addisieelne. Hieruit is afgelei dat die soutverdraagsaamheidsgene op chromosoom 5E^b 'n groter effek het indien die 5E^b chromosoom teenwoordig is in die plek van 'n ander groep 5 homoeoloog, pleks van as 'n addisionele chromosoom. 'n Moontlike rede hiervoor is dat die 5E^b addisie vanweë geenduplikasie die algehele fiksheid van die plant verlaag.

'n Reeks studies wat gefokus het op die molekulêre en sitogenetiese karakterisering van *Th. bessarabicum*/*T. aestivum* amfiploïede (King *et al.*, 1993a; 1993b; 1994; 1996) het uiteindelik gelei tot die ontwikkeling van sogenaamde tritipyurms deur King *et al.* (1997). 'n Versameling van tetraploïede *T. turgidum* ssp. *durum* kultivars is deur King *et al.* (1997) met *Th. bessarabicum* en *Th. junceiforme* gekruis. Die konsep was analoog aan die ontwikkeling van triticale as 'n landbougewas (Gregory, 1987). Kultivars soos "Azizah", "Creso", "Karim", "Langdon", "Mexicale 75", "Macoun", "Neodor" en "Stewart" is as vroulike ouers gebruik en is bestuif met *Th. bessarabicum* en *Th. junceiforme*. Die nageslag (sogenaamde tritipyurms) is ondersoek vir morfologie, meiotiese stabiliteit, vrugbaarheid en soutverdraagsaamheid.

King *et al.* (1997) het gevind dat die tritipyurms morfologies nader verwant is aan koring as aan *Thinopyrum*. Die tritipyurms het ook heelwat diversiteit getoon in terme van planthoogte, en hulle was feitlik almal laat rypwordend. Hierdie eienskappe kon egter almal verander word deur volgehoue teling en seleksie gerig op die A- en B-genome van die koringouer. Die tritipyurms het ongelukkig almal relatiewe lae vrugbaarheid getoon en was meioties onstabiel. Drie van die tritipyurms het beter soutverdraagsaamheid as hul ouers getoon, en ongeveer 90 % van al die koringkultivars wat in die evaluasie ingesluit was het doodgegaan toe soutbehandelings 'n konsentrasie van 150 mM bereik het. Daarenteen het 60 % van die tritipyurms oorleef. Slegs drie van die tritipyurms het saad geproduseer tydens soutbehandeling.

Ten spyte van ongewenste morfologiese eienskappe, meiotiese onstabieliteit en lae vrugbaarheid, is bewys dat hierdie tipe benadering tot die ontwikkeling van soutverdraagsame gewasse haalbaar is. Soortgelyke probleme met lae vrugbaarheid is ook ondervind tydens die ontwikkeling van triticale as gewas (Gupta en Priyadarshan, 1982). Die probleem is opgelos deur intensiewe seleksie na kruising van heksaploïede en oktaploïede triticale, en 'n soortgelyke benadering tot die verbetering van tritipyurms mag lonend wees. Deur noukeurige

te teel en te selekteer, hoofsaaklik met klem op die koringouer-komponent in sulke kruisings, kan 'n nuwe soutverdraagsame gewas ontwikkel word.

Dvořák *et al.* (1988) het soutverdraagsaamheidstudies onderneem met *Th. elongatum* (sinonieme *Agropyron elongatum*, *Lophopyrum elongatum*). *Thinopyrum elongatum* is nabyverwant aan *Th. bessarabicum*. Hulle data het geïmpliseer dat *Th. elongatum* chromosome 3E, 4E en 7E additief bydra tot soutverdraagsaamheid en dat *Th. elongatum* nie 'n hoof sout-verdraagsaamheidsgeen op een van sy groep 5 homoeoloë chromosome besit nie. Hierdie bevinding het gesuggereer dat die chromosomale posisies van soutverdraagsaamheidsgene moontlik wissel tussen *Thinopyrum* spesies.

Omielan *et al.* (1991) het die bestudering van *Th. elongatum* voortgesit deur soutverdraagsaamheid veld-proewe uit te voer met 'n reeks koringlyne (kultivar "Chinese Spring") met disomiese *Th. elongatum* substitusies. Hul bevindings het weereens aangedui dat chromosome 3E, 4E en 7E betrokke is by die soutverdraagsaamheidsinteraksie, maar het hierdie keer ook chromosoom 2E betrek. Volgens hul studie het chromosoom 3E die grootste soutverdraagsaamheidseffek getoon. Chromosome 2E, 4E en 7E het in 'n mindere mate bygedra tot soutverdraagsaamheid.

Zhong en Dvořák (1995) het hierna 'n omvattende studie uitgevoer waartydens hulle die chromosomale beheer van soutverdraagsaamheid in *Th. elongatum* en koring ondersoek het. 'n Reeks disomiese addisielyne, ditelosomiese addisielyne vir 13 van die 14 *Th. elongatum* chromosoomarms, disomiese substitusie-lyne (koring kultivar "Chinese Spring") vir elk van die *Th. elongatum* chromosome, asook verskeie tetrasomiese koringlyne is as materiaal in die studie gebruik. Die soutverdraagsaamheid van die materiaal in reaksie op skielike en geleidelike sout stremming is ondersoek en met mekaar vergelyk. Daar is gevind dat soutverdraagsaamheid in reaksie op skielike blootstelling aan sout hoofsaaklik deur *Th. elongatum* chromosome 3E en 5E, en tot 'n mindere mate 1E, 2E, 6E en 7E, beheer word. Verdraagsaamheid ten opsigte van geleidelike sout stremming word hoofsaaklik deur *Th. elongatum* chromosome 3E, 4E, 5E, en tot 'n mindere mate deur 1E en 7E, bemiddel. Evaluering van die groep ditelosomiese addisie-plantte het aangedui dat *Th. elongatum* chromosoomarms 1EL, 5ES, 5EL, 6EL, 7ES en 7EL soutverdraagsaamheid verleen in die geval van skielike sout blootstelling, terwyl chromosoomarms 1ES, 1EL, 5ES, 5EL, 6EL, 7ES en 7EL verdraagsaamheid verskaf tydens geleidelike sout blootstelling. Die chromosoomarms

1EL, 5EL, 6EL en 7EL bevat gesamentlik 14 van die 16 *Esi* ('Early salt-induced') -gene in die *Th. elongatum* genoom (Dubcovsky *et al.*, 1994), en verklaar moontlik waarom hulle betrokke is by die soutverdraagsaamheidsinteraksie. Die groep tetrasomiese koringlyne het aangedui dat groep 1, 3 en 7 homoeoloë bydrae tot verdraagsaamheid tydens skielike sout blootstelling, en dat homoeoloë groepe 1, 4 en 6 betrokke is by die verdraagsaamheidsinteraksie tydens geleidelike sout stremming. Die studie het ook bevind dat *Th. elongatum* chromosoom 2E (meer spesifiek 2EL) en koringchromosome 2B en 2D soutverdraagsaamheid verlaag het, wat ooreenstem met bevindinge deur Forster *et al.* (1998).

Verskeie studies het gefokus op die introgressie van relatiewe klein vreemde chromosoom-segmente, wat soutverdraagsaamheidsgene bevat, in koringlyne. Hibriede addisie- en substitusielyne met heel *Thinopyrum* chromosome toon ongewenste agronomiese eienskappe te wyte aan die teenwoordigheid van talle nadelige spesiegene op die vreemde chromosome. Homoeoloë paringsinduksie tussen die kritiese *Thinopyrum* chromosoom en 'n koring-homoeoloog bied 'n wyse om kleiner spesiesegmente na die koringgenoom oor te dra (Sears, 1977).

Die *Ph1*-geen kom op die lang arm van chromosoom 5B voor en onderdruk meiotiese rekombinasie tussen homoeoloë chromosome. Sogenaamde *Ph*-inhibeerder lyne (*Ph¹*) bestaan, en indien die inhibeerdergeen van so 'n lyn in 'n hibried voorkom, laat dit toe dat homoeoloë rekombinasie vrylik plaasvind tydens meiose (Chen *et al.*, 1994). Kruising tussen 'n *Ph¹*-koringlyn en 'n disomiese addisie- of substitusielyn sou dan heel moontlik kon lei tot nageslag wat 'n volle komplement koring-chromosome besit, tesame met geïntegreerde, vreemde chromatien wat soutverdraagsaamheidsgene bevat. Hierdie benadering is vir die eerste maal deur Wang *et al.* (2003) gebruik om chromosoomsegmente met soutverdraagsaamheidsgene vanaf *Th. bessarabicum* na koringchromosome oor te dra en koringlyne met verhoogde soutverdraagsaamheid daar te stel.

In die studie van Wang *et al.* (2003) is soutverdraagsame koringlyne ontwikkel deur middel van rekombinasie met 'n disomiese addisielyn, wat 'n E^b chromosoom vanaf *Th. junceum* (genoomsamestelling: $E^bE^bE^bE^bE^cE^c$) besit. Drie gedeeltelike amfidiploïede en 11 disomiese addisielyne is uit 'n *T. aestivum* × *Th. junceum* kruising ontwikkel. Die 14 lyne is onderwerp aan souttoetsing, en die soutverdraagsaamheid van een hiervan was vergelykbaar met dié van die amfidiploïede. Die lyn het 'n ongeïdentifiseerde *Th. junceum* E^b chromosoomaddisie

gehad, en is gekruis met 'n koringlyn wat die Ph^I -alleel besit (afkomstig van *Ae. speltoides*) om homoeoloë paring te indueer in die hoop om die soutverdraagsaamheidsgeen/-gene na die koring-genoom oor te dra. Die verkrygte nageslag is onderwerp aan souttoetsing en uiteindelik is vier soutverdraagsame F_3 -translokasielyne geïdentifiseer. Een van die vier translokasielyne was steriel. Die oorblywende drie lyne is onderwerp aan verdere souttoetsing by 'n EK van 42 dS.m^{-1} en is molekulêr gekarakteriseer.

Fluoresensie *in situ* hibridisasie- (FISH) en GISH-studies tesame met die gebruik van verskeie toevallig-geamplifiseerde-polimorfiese-DNS ('Randomly Amplified Polymorphic DNA' = RAPD) merkers het bevestig dat die translokasielyne struktureel-gemodifiseerde koringchromosome, met *Th. junceum* E^b (óf $1E^b$ óf $4E^b$ óf $6E^b$) chromosoomsegmente, bevat. Verskeie AFLP-merkers (*EcoRI* en *MseI* inleierkombinasies) is met behulp van die addisielyne ontwikkel om die teenwoordigheid van *Th. junceum* chromatien binne die koringchromosome te bevestig. Die AFLP-merkers en GISH-resultate is gebruik om te toon dat baie klein gedeeltes van die *Th. junceum* chromatien teenwoordig was in die drie translokasielyne. Die studie het ook getoon dat baie min (4 % van alle AFLP-fragmente wat ge-amplifiseer was) nuttige, dominante AFLP-merkers vir die *Th. junceum* E^b -chromosome was, en dat dit nie moontlik was om potensieël nuttige merkers vir merker-bemiddelde seleksie van soutverdraagsaamheid te identifiseer nie. Wat die studie wel bewys het, is dat introgressie van vreemde chromatien met soutverdraagsaamheidsgene na koringchromosome moontlik is met gebruik van 'n Ph^I -koringlyn. Die soutverdraagsame translokasielyne wat verkry is kan in die toekoms nuttig aangewend word in teelprogramme wat fokus op die stapeling van soutverdraagsaamheidsgene (Wang *et al.*, 2003).

In 'n onlangse studie het Islam *et al.* (2007) die benutting van soutverdraagsaamheidsgene uit *Hordeum marinum* ondersoek. 'n Reeks amfiploïede uit 'n *H. marinum* × *T. aestivum* (kultivar "Chinese Spring") kruising is saam met die ouers getoets vir soutverdraagsaamheid en agronomiese prestasie. Soos verwag is gevind dat die amfiploïed wel soutverdraagsaamheidsgene afkomstig van *H. marinum* uitgedruk het. Soutverdraagsaamheid van die amfiploïede was egter intermediêr ten opsigte van die ouers. Amfiploïede het ook intermediêr presteer in terme van groei en graanproduksie. Die *H. marinum/T. aestivum* amfiploïed is voorts vergelyk met 'n *Th. bessarabicum/T. aestivum* (ook kultivar "Chinese Spring") amfiploïed uit 'n vorige studie (Gorham *et al.*, 1986), en daar is gevind dat laasgenoemde beter presteer het by vergelykbare soutkonsentrasies. Jong weefsels van die

amfiploïede is chemies ontleed, en dit het geblyk dat die *Th. bessarabicum*/*T. aestivum* amfiploïede 'n merkwaardig hoë konsentrasie van glisienbetaïen bevat het, wat bekend is vir sy funksie om die osmotiese potensiaal in selle te balanseer.

Elkeen van hierdie studies wat die soutverdraagsaamheid van amfiploïede uit kruisings tussen koring en wilde grasspesies ondersoek het, het getoon dat die konsep van wye hibridisasie tussen koring en sy nabyverwante, wilde grasspesies waarskynlik die beter benadering is tot die ontwikkeling van 'n soutverdraagsame graangewas.

1.5 Hibridisasie van *Thinopyrum distichum* en *triticale*

Grasspesies wat tot die genus *Thinopyrum* behoort, kom algemeen in kus-omgewings voor. Een spesifieke lid van hierdie genus, *Thinopyrum distichum*, is inheems aan Suid-Afrika (Pienaar, 1990) en besit 'n diploïede chromosoomgetal van 28, bestaande uit twee genome, die sogenaamde J_1^d - en J_2^d -genome ($2n = 28; J_1^d J_1^d J_2^d J_2^d$). Hierdie spesie toon merkwaardige soutverdraagsaamheid en is aangepas by relatief ongunstige omstandighede. Die aanpasbaarheid van lede van die genus *Thinopyrum* by hoë-sout omgewings het gelei tot verskeie pogings om die genetiese basis vir soutverdraagsaamheid te ontrafel en om hierdie gene na kommersieël verboude graangewasse oor te dra (Forster *et al.*, 1987; Pienaar, 1990; King *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003; Colmer *et al.*, 2006). Soutverdraagsaamheid in *Thinopyrum* spesies is 'n poligeniese eienskap (Littlejohn, 1988; Omielan *et al.*, 1991; Gregorio en Senadhira, 1993; Ashraf, 1994; Colmer *et al.*, 2006), en word bepaal deur 'n reeks gene op verskeie chromosome. Die oordrag van hierdie gene sal dus heelwat meer kompleks wees as byvoorbeeld die oordrag van 'n eienskap soos roesweerstand, wat gewoonlik deur 'n enkele hoofgeen beheer word.

Triticale is 'n ideale gewas vir hibridisasie met *Th. distichum* om 'n soutverdraagsame graangewas te ontwikkel. Primêre hibriede van heksaploïede triticale met *Th. distichum* toon hoë vlakke van soutverdraagsaamheid (Marais en Marais, 1998). Triticale is boonop goed aangepas om onder ongunstige groeitoestande te oorleef, en is 'n relatiewe geharde gewas in vergelyking met durum- en broodkoring (Mergoum *et al.*, 1998). Hierdie basis van gehardheid skep dus groter potensiaal om dit as 'n soutverdraagsame gewas te vestig.

Triticale is ook nie onderworpe aan die streng industriële kwaliteitsvereistes wat vir durum- en broodkoring geld nie, aangesien dit hoofsaaklik as 'n voergewas gebruik word.

Marais en Marais (2003) het die chromosome geïdentifiseer wat soutverdraagsaamheid in *Th. distichum* bemiddel. Hulle het 'n *Th. distichum*/4**Secale cereale* hibried ($J_1^d J_2^d RR$) bestuif met diploïede rog, en gevind dat die nageslag feitlik altyd 21 chromosome ($2n = 21$; $J_1^d/J_2^d RR$) besit het. Dit het daarop gesinspeel dat die homoeoloë chromosome van die J_1^d en J_2^d genome gereeld bivalente gevorm het in die primêre amfiploïed. F_1 -nageslag is vervolgens onderwerp aan sout-toetsing. Vyftien van die mees soutverdraagsame F_1 is daarna geselekteer. Die 15 soutverdraagsame F_1 -plante is onderwerp aan C-band tipering om te bepaal watter *Th. distichum* chromosome in elk teenwoordig was. Deur segregasie-patrone te ontleed kon Marais en Marais (2003) die 14 *Th. distichum* chromosome in sewe homoeoloë pare groepeer. Enkele chromosome ($2J_1^d$, $3J_1^d$, $4J_1^d$ en $5J_1^d$) het teen 'n hoër-as-verwagte frekwensie voorgekom onder die 15 soutverdraagsame F_1 -plante, wat geïmpliseer het dat hulle betrokke is by soutverdraagsaamheid. Hierna is 'n poging aangewend om Restriksie Fragment Lengte Polimorfisme ('Restriction Fragment Length Polymorphism' = RFLP) -merkers vir die kritiese *Th. distichum* chromosome te ontwikkel, en RFLP-merkers vir chromosome $2J_1^d$, $3J_1^d$, $4J_1^d$ en $5J_1^d$ is gevind. Die interaksie van die kritiese *Th. distichum* chromosome is bevestig deur die twee mees soutverdraagsame F_1 -plante terug te kruis na diploïede rog. Die 1640 sade afkomstig uit die terugkruising is onderwerp aan sout-toetsing en 49 saailinge wat oorleef het is as volwasse plante onderwerp aan 'n soutverdraagsaamheidsevaluasie. Ses van die mees soutverdraagsame plante is geselekteer en onderwerp aan RFLP-analise en C-band identifikasie om vas te stel watter *Th. distichum* chromosome hul besit. Die resultate het bevestig dat chromosome $3J_1^d$, $4J_1^d$, $5J_1^d$, en moontlik ook $2J_1^d$ en $7J_1^d$ verantwoordelik is vir *Th. distichum* se soutverdraagsaamheid, en stem dus ooreen met die bevindings van Dvořák *et al.* (1988) en Zhong en Dvořák (1995).

In verdere pogings om soutverdraagsaamheid in *Th. distichum* te karakteriseer, het Jacobs *et al.* (2004) en Marais *et al.* (2007) addisionele volgorde-gemerkte-setel- ('sequence tagged site' = STS) en volgorde-gekenmerkte-geamplifiseerde-streek ('Sequence Characterized Amplified Region' = SCAR) -merkers ontwikkel vir die kritiese *Th. distichum* chromosome. Jacobs *et al.* (2004) het twee SCAR-merkers ontwikkel, naamlik UST1- $2J_1^d$ spesifiek vir die kort arm van chromosome $2J_1^d$ (Marais 2008, persoonlike mededeling) en UST2- $2J_1^d$ wat spesifiek is vir $2J_1^dL$.

Marais *et al.* (2007) het 'n verdere 13 STS- en SCAR-merkers ontwikkel wat *Th. distichum* chromosome 2J₁^d, 3J₁^d, 4J₁^d, 5J₁^d en 7J₂^d dek. Hulle het gebruik gemaak van RAPD-polimorfismes asook gekarteerde koring cDNS-loci om inleiers te ontwerp vir polimerase ketting reaksie ('Polymerase Chain Reaction' = PCR) -amplifikasie van ooreenstemmende *Thinopyrum* homoeoloci. Tydens hierdie studie is sekondêre *Th. distichum*/triticale hibriede met verskillende kombinasies van die kritiese chromosome en triticalesyne met *Th. distichum* disomiese addisies ontwikkel. Hierdie lyne is in 'n sout-evaluasie gebruik om weereens die kritiese chromosome en hul interaksies te bevestig. Die resultate het weer getoon dat chromosome 3J₁^d, 4J₁^d en 5J₁^d primêr by soutverdraagsaamheid betrokke is, en dat 2J₁^d dalk 'n groter rol speel in soutverdraagsaamheid as wat voorheen gedink is. Hierdie bevindinge stem ooreen met dié van Omielan *et al.* (1991) en Zhong en Dvořák (1995). Verder is gevind dat wanneer elk van die kritiese chromosome op hul eie tot die genome van triticales plante toegevoeg word, die disomiese (2n = 44) addisieplante min tot geen soutverdraagsaamheid toon nie. Addisie van twee chromosome op 'n keer het meesal geen effek op soutverdraagsaamheid gehad nie, maar toe chromosome 2J₁^d en 3J₁^d egter albei by die triticales-genoom gevoeg is, is 'n noemenswaardige toename in soutverdraagsaamheid waargeneem. Daar is ook gevind dat indien chromosoom-kombinasies 2J₁^d, 3J₁^d en 5J₁^d of 3J₁^d, 4J₁^d en 5J₁^d by die triticales-genoom gevoeg word, 'n selfs groter toename in soutverdraagsaamheid waargeneem word wat vergelykbaar is met dié van die primêre hibried (Marais *et al.*, 2007). Hieruit kan afgelei word dat indien soutverdraagsaamheid van *Th. distichum* benut wil word, daar gefokus moet word op chromosome 2J₁^d, 3J₁^d, 4J₁^d en 5J₁^d of gepaste kombinasies daarvan.

1.6 Ontwikkeling van soutverdraagsame *Th. distichum*/triticale amfiploïede

Een moontlike benadering om die soutverdraagsaamheidsgene van *Thinopyrum* te benut is om op sistematiese wyse translokasies van elk van die kritiese teiken *Th. distichum* chromosome na die triticales-genoom te bewerkstellig. Dit is bekend dat monosomie gebruik kan word om segmente van die betrokke monosomiese chromosoom te translokeer na ander monosomiese chromosome (hoofsaaklik ander homoeoloë) sonder om van bestraling gebruik te maak (Sears, 1973). Sears (1972) het gewys dat misdeling (sentromeriese breking) van univalente tydens meiose en gepaardgaande versmelting van die telosentriese chromosome om 'n

sogenaamde Robertsoniese translokasie te vorm, gebruik kan word om translokasies tussen koring en vreemde chromatien te bemiddel. Verskeie studies het sedertdien getoon dat die gebruik van misdeling as gevolg van monosomie 'n bevredigende frekwensie van Robertsoniese translokasies lewer: 4 % (Davies *et al.*, 1985); 4.23-14.67 % (Ren *et al.*, 1990); 7.2 % (Marais en Marais, 1994). Aangesien vier *Th. distichum* chromosome betrokke is by soutverdraagsaamheid sal hierdie prosedure egter tydrowend en arbeids-intensief wees.

'n Alternatief kon wees om "nuwe" amfiploïede met herrangskikte genome te ontwikkel. Indien laasgenoemde benadering suksesvol is, kan die ontwikkelde amfiploïede gebruik word as geharde, soutverdraagsame voergewasse, of as hulpmiddel vir die grootskaalse ontwikkeling van *Th. distichum*/triticale chromosoom-translokasies. 'n Poging om sodanige "nuwe" amfiploïede te ontwikkel is op twee verskillende wyses aangepak (Marais *et al.*, 2007; 2008, persoonlike mededeling):

- (i) Die eerste tipe amfiploïed is 'n trigeneriese (*Triticum/Thinopyrum/Secale*) hibried met 'n gedeeltelike triticale agtergrond en 'n diploïede chromosoomgetal van 42. Hierdie planttipe besit beide die A- en B-genome van durumkoring (*T. turgidum* ssp. *durum*) asook 'n gebalanseerde R/J-genoom vanaf rog en *Th. distichum* ($2n = 42$; AABBR/J₁₂^dR/J₁₂^d). Die R/J₁₂^d-genoom beteken dus enige gebalanseerde (bevat een chromosoom uit elke homoeoloë groep) sub-stel van 7 van die 14 *Th. distichum* en 7 rog chromosoompare, waaronder 2-4 van die kritiese J₁^d chromosome (Marais *et al.*, 2007). Hierdie hibriede sou dus vergelykbaar, maar nie identies, wees met die tritipyums ontwikkel deur King *et al.* (1997) en sou dus in die toekoms in kruisings met die kiemplasma van King *et al.* (op cit.) gebruik kon word ten einde groter diversiteit daar te stel vir seleksie en verbetering. Daar is gepoog (Marais 2008, persoonlike mededeling) om die tipe amfiploïed te produseer by wyse van 'n reeks merker-bemiddelde terugkruisings na 'n sogenaamde spilgenotipe. Die spilgenotipe wat gebruik sou word om die $2n = 42$; AABBJ₁₂^dJ₁₂^d amfiploïed saam te stel, is 79S15A. Hierdie plant is volgens die stamboom 'n seleksie uit die kruising *T. turgidum* ssp. *durum* × *Th. distichum* ($2n = 56$; AABBJ₁^dJ₁^dJ₂^dJ₂^d [Pienaar, 1990]) en het 42 chromosome in plaas van 56 gehad. Daar is vermoed dat dit die gevolg was van oopbestuiwing met *T. durum* en dat dit die genomiese samestelling AABBJ₁₂^dJ₁₂^d gehad het. Een

van die doelwitte van die huidige studie was dan ook om hierdie aanname te bevestig. Onlangse data het egter daarop gedui dat 79S15A waarskynlik nie twee volledig-gebalanseerde *Th. distichum* chromosoom-substelle besit nie maar eerder 'n derde genoom wat 'n mengsel is van (hoofsaaklik) rog- en *Thinopyrum*-chromosome. Die *Thinopyrum* chromosome in 79S15A sluit ongelukkig geeneen van die kritiese chromosome in nie. 79S15A is dus genotipies presies een van die talle moontlike tipes trigeneriese hibriede wat beoog word. Ongelukkig beperk dit egter die waarde van 79S15A as 'n spilgenotipe.

- (ii) Die tweede tipe amfiploïed wat in vooruitsig gestel is, is ook 'n trigeneriese (*Triticum/Thinopyrum/Secale*) hibried met 'n volledige triticale agtergrond en 'n diploïede chromosoomgetal van 56 en besit die *T. durum* A- en B-genome, die *Secale cereale* R-genoom, en 'n gebalanseerde *Th. distichum* J-genoom ($2n = 56$; AABBRRJ₁₂^dJ₁₂^d). Die benadering wat gevolg is om die AABBRRJ₁₂^dJ₁₂^d amfiploïed te probeer skep, is gebaseer op onderlinge kruisings van sekondêre *Th. distichum*/2*triticales amfiploïede met gepaardgaande seleksie vir die kritiese chromosome en 'n chromosoomgetal wat neig na $2n = 56$. Dit het egter geblyk om baie moeilik haalbaar te wees aangesien aneuploïede chromosome teen baie lae frekwensie deur die manlike ouer oorgedra word (Marais 2008, persoonlike mededeling).

In lig hiervan blyk dit raadsaam te wees om te konsentreer op die oordrag van soutverdraagsaamheidsgene deur sistematies translokasies (en substitusies) van die kritiese *Th. distichum* teiken-chromosoomsegmente na die triticale genoom te bewerkstellig, eerder as om soutverdraagsame amfiploïede te ontwikkel.

Huidig is daar slegs een tot drie STS/SCAR-merkers beskikbaar vir elk van die vier kritiese *Th. distichum* chromosome (Marais *et al.*, 2007). Dit is bekend dat die J₁^d- en J₂^d- genome van *Th. distichum* nabyverwant is, en dat homoeoloë bivalente mag vorm tydens meiose (Marais *et al.*, 1998; Marais en Marais, 2003). Dus is daar 'n kans dat 'n PKR-merker tydens oordrag mag verskuif vanweë rekombinasie tussen kritiese en nie-kritiese homoeoloë chromosome. Dit sal dan lei tot die verkeerdelike interpretasie van die aan- of afwesigheid van kritiese *Th. distichum* chromosome in geselekteerde hibriede. Dit sal dus nodig wees om 'n groter aantal

merker-loci te identifiseer wat elk van die kritiese chromosome behoorlik dek. Tydens die ontwikkeling van die amfiploïede, sal hierdie addisionele merker-loci dan gebruik moet word om, parallel met die souttoetse, ook te toets vir rekombinasie. Indien 'n groot getal unieke merkers vir elke kritiese *Th. distichum* chromosoom opgespoor kan word, kan haplotipe analise onder geselekteerde nageslag ingespan word om chromosoomstreke te identifiseer wat betrokke is by soutverdraagsaamheid, mits van die merkers relatief naby aan soutverdraagsaamheidsloci geleë is. Dit sal genetiese-, en uiteindelik ook fisiese, kartering van soutverdraagsaamheidsgene moontlik maak.

1.7 Merkers en Merker-bemiddelde-seleksie (MAS)

'n Genetiese merker kan gedefinieër word as enige polimorfiese Mendeliese eienskap, wat uniek in samestelling is, en gebruik kan word vir die identifikasie van 'n chromosomale segment, of om die oorerwing daarvan te volg. Meeste merkers berus op 'n polimorfisme in nukleotiedvolgorde en behels die gebruik van 'n spesifieke molekulêre tegniek om dit uit te lig, soos byvoorbeeld RFLP's, Geamplifiseerde-fragmentlengte-polimorfismes ('Amplified Fragment Length Polymorphisms' = AFLP's), RAPD's, Weerstandsgene-analoë ('Resistance Gene Analogs' = RGA's), mikrosatelliete oftewel Eenvoudige-volgorde-herhalings ('Simple Sequence Repeats' = SSR's) en SCAR's. Sodanige merkers vind wye toepassing vir merker-bemiddelde-seleksie in planteteelt.

Merker-bemiddelde-seleksie ('Marker-assisted-selection' = MAS) is 'n kragtige hulpmiddel vir enige plantteler. Dit laat die seleksie van plante met 'n sekere fenotipe (of gewenste eienskap) toe, op grond van die teenwoordigheid of afwesigheid van molekulêre merkers. Voor die koms van merkers en moderne molekulêre tegnieke moes planttelers seleksies uitvoer op grond van fenotipiese uitdrukking. Dit het beteken dat 'n populasie waarbinne daar sou geselekteer word, eers die betrokke eienskap moes uitdruk (die plant moes meesal eers volwassenheid bereik) voordat seleksie uitgevoer kon word. In teenstelling hiermee kan daar op enige stadium in 'n plant se groeifase getoets word vir die teenwoordigheid van 'n molekulêre merker. Dit beteken dat planttelers binne 'n relatiewe kort tydperk opeenvolgende filiale generasies kan karakteriseer en selekteer. Gebruik van merkers kan dus die ontwikkeling van telingsmateriaal en die bekendstelling van kultivars geweldig versnel.

Ten einde MAS effektief te benut in enige teelprogram, moet daar aan drie belangrike vereistes voldoen word (Mohan *et al.*, 1997): 1) Die merkers wat gebruik word moet kosegregeer met die betrokke kenmerk, en moet nou daaraan gekoppel wees (1 cM of minder); 2) Die tegniek wat gebruik word om vir die merker te toets moet van so aard wees dat baie groot populasies met relatiewe gemak gesif kan word. Dit sal beteken dat die tegniek relatief vinnig en maklik uitvoerbaar sal moet wees, soos in die geval van PKR; 3) Die tegniek wat gebruik word om vir die merker te toets moet ook akkuraat, hoogs herhaalbaar, gebruikersvriendelik en koste-effektief wees.

Die poligeniese aard van soutverdraagsaamheid en die lae oorerflikheid van die kenmerk maak MAS die mees haalbare benadering om amfiploïede plante te selekteer vir die gelyktydige teenwoordigheid van meer as een *Th. distichum* chromosoom/chromosoomsegment. Suksesvolle toepassing van MAS in hierdie geval sal vereis dat merkers hoë akkuraatheid en herhaalbaarheid moet hê (Mohan *et al.*, 1997). PKR-gebaseerde merkersisteme is sonder twyfel die beste opsie aangesien dit sensitief en akkuraat is. Die spesifisiteit van PKR's kan ook gemaksimiseer word deur die reaksie-samestelling en amplifikasiesiklusse te optimiseer.

Twee PKR-gebaseerde merker-sisteme is in hierdie studie ondersoek in 'n poging om verdere *Thinopyrum* chromosoom-spesifieke merkers te vind, te wete AFLP's en uitgedrukte-volgorde-etiket ('Expressed sequence tag' = EST) -SSR's. Daar is min bekend omtrent die *Th. distichum* genoom, en daar is nog weinig nukleotiedvolgorde-inligting beskikbaar. Analise met behulp van AFLP's vereis geen vooraf-kennis van die genoom nie (Vos *et al.*, 1995), en maak dit dus 'n ideale benadering. Eenvoudige-volgorde-herhalings kom eweneens gereeld voor in genome, hulle is eweredig verspreid, erf ko-dominant oor en is hoogs herhaalbaar (Morgante en Olivieri, 1993).

1.8 Uitgedrukte-volgorde-etiket Eenvoudige-volgorde-herhalings (EST-SSR's)

Mikrosatelliete oftewel SSR's is kort-tandem-herhalings van di-, tri-, tetra-, penta-, en heksanukleotied-motiewe. Polimorfismes word waargeneem as gevolg van 'n verskil in die aantal herhalings, wat hoofsaaklik ontwikkel as gevolg van replikasie-glyding. Die SSR polimorfismes word maklik gekarakteriseer deur PKR-amplifikasie en word waargeneem na

gel-elektroforese as 'n verskil in fragmentgrootte van die amplifikasie-produk. Genomiese SSR's was die eerste tipe mikrosatelliete wat ontwikkel was, en mikrosatelliete is alreeds gebruik vir kartering van die koring-genoom (Röder *et al.*, 1998).

Om genomiese SSR's te verkry moet 'n verrykte genomiese DNS-biblioteek eers geskep en dan gesif word. Dit vereis ook dat die nukleotiedvolgorde van 'n groot aantal klone bepaal moet word. Daarna moet inleiers ontwikkel en getoets word totdat 'n nuttige SSR-merker gevind word. Dus is die ontwikkeling van genomiese SSR's baie duur en arbeidsintensief. Genomiese SSR's toon boonop swak oordraagbaarheid na verwante spesies, is betreklik genoom-spesifiek (Sourdille *et al.*, 2001) en toon gewoonlik onvolledige koppeling met teiken-kenmerke.

Volgordebepaling van genome het oor die afgelope paar jaar uitgebrei, en as gevolg hiervan is 'n nuwe bron van SSR's ontwikkel. Nukleotiedvolgorde-inligting van EST's het soortgelyk vermeerder en is vrylik beskikbaar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>). Die *in silico* analise van nukleotiedvolgordes van EST's in databasisse, het gelei tot koste-effektiewe ontwikkeling van EST-SSR's. Die potensiaal van EST's as 'n bron van SSR's in koring is reeds aangetoon (Eujayl *et al.*, 2002) en ontwikkel (Varshney *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Nicot *et al.*, 2004). Die oordraagbaarheid van EST-SSR's na ander grane (Zhang *et al.*, 2005) en verwante wilde grasspesies (Zhang *et al.*, 2007) is baie goed, en aansienlik beter as dié van genomiese SSR's. Die EST-SSR's is minder polimorfies as genomiese SSR's, maar dit produseer duideliker bande op 'n gel (Eujayl *et al.*, 2002).

Aangesien *Th. distichum* 'n wilde grasspesie is wat verwant is aan koring, bied EST-SSR's 'n ideale geleentheid om merkers te vind wat oordraagbaar na *Thinopyrum* sal wees. Die hoë mate van sintenie tussen *Thinopyrum* teikenchromosome en hul koring/triticale homoeoloë beteken dat koring/triticale EST-SSR's wat in *Thinopyrum* amplifiseer ook 'n aanduiding van chromosoom en chromosoomarm homologieë kan verskaf. Omdat EST-SSR merkers koderende streke verteenwoordig kan hulle dus as posisionele "anker"-merkers (merkers waarvan die chromosomale posisie bekend is vanweë hul hoë graad van homologie en gekonserveerdheid tussen verskillende spesies) dien.

1.9 Geamplifiseerde-fragmentlengte-polimorfismes (AFLP's)

Die AFLP-tegniek is deur Vos *et al.* (1995) ontwikkel om DNS-vingerafdrukke te produseer. Hierdie tegniek is gebaseer op die selektiewe amplifisering van fragmente geproduseer na totale restriksie-vertering van genomiese DNS. AFLP-analise behels drie hoofstappe: (i) Restriksie-ensiem vertering van genomiese DNS en ligasie van oligonukleotied entstukke ('adaptors'); (ii) selektiewe PCR-amplifikasie van die geteikende restriksie-fragmente; (iii) gel-analise van die ge-amplifiseerde fragmente.

Vir die restriksie-vertering van die genomiese DNS word twee restriksie-ensieme gebruik waarvan een 'n gereelde-snyer (4 bp snyers bv. *MseI* of *TaqI*) en die ander 'n raar-snyer is (6 bp of 8 bp snyers bv. *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglII*, *XbaI*, en *Sse8387I*). Na totale vertering word oligonukleotied entstukke met behulp van T4 DNS-ligase aan die restriksie-fragmente geligeeer. Die entstukke vir elke restriksie-ensiem snypunt word ontwerp met 'n kern-volgorde en 'n ensiem-spesifieke-volgorde aan die kant, wat toelaat dat die entstuk bind aan die "taai"-ente (geproduseer deur die restriksie-ensieme) van die fragmente. Die entstukke dien dan ook as die teikensetel vir inleierbinding in die opeenvolgende amplifikasie-stappe. Die restriksie-ligasie produkte word verder verdun om templaats DNS met die regte konsentrasie te verskaf voordat selektiewe amplifikasie uitgevoer word.

Selektiewe PCR-amplifikasie van die fragmente word uitgevoer deur die entstukke en die restriksie-ensiem-setel se nukleotiedvolgordes te gebruik as teiken vir inleierbinding. Die voorwaartse inleier se volgorde stem byvoorbeeld ooreen met die *EcoRI*-geproduseerde ent, terwyl die terugwaartse inleier ooreenstem met die *MseI*-geproduseerde ent. Die selektiewe amplifikasie vind dan plaas deur inleiers te gebruik met twee of drie addisionele nukleotiede (sogenaamde 2+ of 3+ selektiewe inleiers) aan die 3' ent, wat dan binne die restriksie-fragment bind. Dus sal slegs fragmente wat die ooreenstemmende nukleotiede langs die restriksie-ensiem-setel besit ge-amplifiseer word. Een van die inleiers (gewoonlik die raar snyer) word gemerk om fragmente tydens gel-analise te visualiseer. Aanvanklik is die selektiewe inleier met behulp van radioaktiwiteit (^{33}P) gemerk, maar huidiglik word fluoresserende kleurstowwe gebruik om die uitvoering asook visualisering te vergemaklik.

Na selektiewe amplifikasie word fragmente deur elektroforese op 'n poli-akriëlamied volgordebepalingsgel geskei. Die gel word gefikseer en fragmente word as bande gevisualiseer deur ontwikkeling van 'n foto van die gel met behulp van outo-radiografie. Tans word visualisering egter met behulp van fluoressensiedeteksie deur semi-outomatiese volgordebepalers uitgevoer. Die gebruik van volgordebepalingsgels is ook verouderd, en huidiglik word daar gefokus op die gebruik van elektroforese van die AFLP-produkte binne kapillêre buisies gevul met 'n polimeer (sogenaamde kapillêre elektroforese).

AFLP-analise van komplekse genome (soos dië van koring) vereis gewoonlik twee aparte amplifikasiestappe. Die eerste stap word die pre-amplifikasie stap genoem, en word uitgevoer om die kompleksiteit van AFLP-profiële te verminder. Pre-amplifikasie word uitgevoer met twee ongemerkte AFLP-inleiers wat slegs 'n enkele selektiewe nukleotied aan die 3'-ent besit. Die PCR-produk van die pre-amplifikasie word dan verdun en as templaats gebruik in 'n tweede rondte van amplifikasie (sogenaamde selektiewe amplifikasie). Selektiewe amplifikasie word net soos pre-amplifikasie uitgevoer maar met twee selektiewe AFLP-inleiers, waarvan een met ^{33}P of fluorofore gemerk is. Die gebruik van verskillende fluorofore om verskeie selektiewe inleiers te merk kan die tegniek verder vereenvoudig. Dit is dan moontlik om verskillende kombinasies van selektiewe inleiers gelyktydig in 'n multipleks PCR-amplifikasie te gebruik (Schwarz *et al.*, 2000). Die beginsel berus daarop dat semi-outomatiese volgordebepalers kan onderskei tussen fragmente wat met verskillende fluoresserende kleurstowwe soos 6-FAMTM, JOETM, NEDTM en ROXTM gemerk is. Drie verskillende voorwaartse selektiewe inleiers (wat elk met die raar-snyer en sy betrokke entstuk se nukleotiedvolgorde ooreenstem maar met 'n ander fluorofore gemerk is), word saam met 'n enkele ongemerkte terugwaartse inleier (gebaseer op die gereelde-snyer se restriksie-setel en sy ooreenstemmende entstuk) in 'n selektiewe multipleks PCR-amplifikasie gebruik. Al drie gemerkte voorwaartse inleiers deel die enkele ongemerkte terugwaartse inleier, om elkeen 'n unieke profiel van AFLP-bande te genereer. Die volgordebepaler kan tussen die drie AFLP-profiële onderskei op grond van die fluoresserende kleurstowwe, selfs al word al drie PCR-produkte saam in dieselfde laan of kapillêr ge-elektroforeer.

AFLP-analise is 'n uitstekende DNS-vingerafdruk-tegniek. Dit berus op die identifikasie van genomiese restriksie-fragmente soortgelyk aan RFLP-analise, behalwe dat deteksie van die fragmente by wyse van PCR-amplifikasie eerder as Southern-hibridisasie geskied. AFLP-analise kan op genome van enige grootte en kompleksiteit uitgevoer word, en geen vooraf-

kennis van die genoom se nukleotiedvolgorde word vereis nie. Die meeste AFLP-fragmente verteenwoordig unieke posisies in die genoom wat bestudeer word, en kan daarom as merkers gebruik word in genetiese en fisiese kartering. Elke merker word gekarakteriseer deur sy fragmentgrootte en die onderskeie selektiewe inleiers wat nodig is om dit te amplifiseer. Fragment-polimorfismes (AFLP-merkers) kan gebruik word om genetiese kaarte met 'n hoë digtheid te skep. Die AFLP-tegniek is duidelik 'n baie kragtige hulpmiddel om merkers op te spoor vir gebruik in planteteelt. Dit kan gebruik word om 'n groot aantal anonieme merkers te ontwikkel wat reëlmatig oor die genoom versprei is. AFLP's toon 'n hoë vlak van polimorfisme. Dit het ook hoë herhaalbaarheid aangesien streng PKR-kondisies gebruik word (Jones *et al.*, 1997). Met die gebruik van fluorofore in plaas van radioaktiwiteit vir identifisering van fragmente, asook ge-outomiseerde grootte-bepaling van fragmente in 'n volgordebepaler, kan allele ondubbelsinnig getipeer word (Schwarz *et al.*, 2000).

Semi-geoutomatiseerde, fluoressensie-gebaseerde AFLP-analise is om hierdie redes reeds in vergelykbare studies gebruik. Zhang *et al.* (2002) het daarvan gebruik gemaak om die E^b-genoom van *Th. bessarabicum* molekulêr te karakteriseer. Verskeie disomiese addisielyne is uit kruisings tussen *Th. bessarabicum* en broodkoring ontwikkel by die 'Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo' (CIMMYT). 'n GISH-studie is eers gedoen om te bevestig dat alle lyne ware disomiese addisies was. Na sitologiese karakterisering, is AFLP-merker ontwikkeling en analise gedoen. Selektiewe AFLP-amplifikasie is met 32 selektiewe inleierpare gedoen, en daar is slegs van *EcoRI* en *MseI* kombinasies gebruik gemaak. Volledigheidshalwe is daar ook gepoog om RAPD-merkers vir die E^b-chromosome te ontwikkel. Die studie het 'n totaal van 389 AFLP-fragmente aan chromosome van die *Th. bessarabicum* E^b-genoom toegeken. In totaal is daar 48 AFLP-merkers vir chromosoom 1E^b, 67 vir 2E^b, 39 vir 4 E^b, 59 vir 5 E^b, en 54 vir 7 E^b geïdentifiseer. Saam met hierdie AFLP-merkers is twee RAPD-merkers vir 1E^b, twee vir 2E^b, ses vir 4E^b, een vir 5E^b, en drie vir 7E^b gevind. Die uiteindelige doel van die studie was dus om molekulêre merkers te identifiseer wat tesame met GISH gebruik kan word om die oordrag van E^b-chromosoomsegmente met soutverdraagsaamheidsgene na koring te monitor.

Wat belangrik was in die studie van Zhang *et al.* (2002) was dat 50 van die AFLP-merkers deur vyf verskillende E^b-chromosome gedeel word. Dit beteken dus dat slegs 'n paar van die AFLP-merkers suksesvol gebruik kan word om vir die gelyktydige teenwoordigheid van meer as een E^b-chromosoomsegment, betrokke by soutverdraagsaamheid, te toets. Dit is

problematies aangesien soutverdraagsaamheid 'n poligeniese eienskap is, en sal vereis dat meer as een chromosoomsegment, afkomstig vanaf verskillende E^b-chromosome, in die koring-genoom teenwoordig sal wees.

1.10 Studie doelwitte

Die Universiteit Stellenbosch (US) bedryf 'n deurlopende navorsingsprogram gemik op die genetiese karakterisering van soutverdraagsaamheid in die strandkoringgras, *Th. distichum*, en ondersoek moontlike wyses om die gene wat betrokke is, kommersieël te benut. Hierdie studie het ten doel om sekere fasette van die US program verder te voer.

'n Eerste doelwit is om addisionele (chromosoom-spesifieke) molekulêre merkers te vind vir die kritiese *Thinopyrum* chromosome 2J₁^d, 3J₁^d, 4J₁^d en 5J₁^d. Verdere merkers is essensieel vir enige poging om die betrokke chromosome te karteer en om substreke te identifiseer vir oordrag na verboude grane. In dié verband is die AFLP-tegniek aanvanklik vir die opsporing van verdere anonieme loci gebruik. Om te verseker dat genoeg merkers gevind word het hierdie studie nie slegs van *EcoRI* en *MseI* inleier-kombinasies gebruik te maak nie, maar ook van *Sse8387I* en *MseI* kombinasies. Die *Sse8387I* en *MseI* selektiewe inleiers lewer heelwat meer polimorfiese AFLP-bande in koring as die *EcoRI/MseI* kombinasies (Groenewald *et al.*, 2005). Daar is ook kortliks gekyk na bekende koring EST-SSR-merkers en hul vermoë om ooreenstemmende mikrosatellietloci in *Thinopyrum* te identifiseer.

Tweedens moes die genomiese samestelling van spilgenotipe 79S15A ondersoek word. Hierdie plant sou 'n kritiese rol kon speel in die ontwikkeling van soutverdraagsame sekondêre amfiploïede. Die data wat ge-generer is tydens AFLP-merker ontwikkeling sou saam met beskikbare, voorlopige C-band inligting en rog-spesifieke merker-data (Marais 2008, persoonlike mededeling) rofweg 'n aanduiding gee omtrent die aantal *Th. distichum* chromosome wat 79S15A besit.

'n Derde studie-doelwit was om die komplementerende effek van *Th. distichum* chromosome 2J₁^d en 3J₁^d in die daarstelling van soutverdraagsaamheid verder te ondersoek. In die verband is daar gebruik gemaak van twee variante van chromosoom 2J₁^d, naamlik die normale chromosoom 2J₁^d en 'n skynbaar gerekombineerde vorm (2J₁^dβ) waarvan die lang arm

geaffekteer is (Marais *et al.*, 2007). Die lang arm in $2J_1^d\beta$ het waarskynlik vanweë oorkruising met $2J_2^d$ verander (die moontlikheid van 'n delesie of translokasie kan egter nie uitgesluit word nie) en dit besit nie meer die distale UST4-merker nie. Vier verskillende weergawes van chromosoom $3J_1^d$ is gebruik, naamlik die normale volledige chromosoom, twee vermoedelike Robertsoniese translokasies (een vir die kort arm en een vir die lang arm) en 'n $3J_1^d$ -L-telosoom. Alle moontlike kombinasies van die $2J_1^d$ en $3J_1^d$ variante is ondersoek in terme van effek op soutverdraagsaamheid en teenwoordigheid van geïdentifiseerde merkers. Die doel van hierdie gedeelte van die studie was om: (i) Die interaksie van die volledige chromosome te bevestig; en (ii) te bepaal of chromosoomsubstreke geïdentifiseer kan word wat betrokke is by die interaksie.

Die laaste fase van die studie het gefokus op merker-assosiasies in 'n groep sekondêre hibriede wat verhaal is uit 'n poging om trigeneriese hibriede met $2n = 42$ (AABBR/ $J_{12}R/J_{12}$) te ontwikkel (sien afdeling 1.6). Die merkers wat benut is sluit belowende AFLP-merkers, wat in die eerste fase van die studie ontwikkel is, in. Dié gedeelte van die studie het gepoog om: (i) Die herhaalbaarheid en spesifisiteit van die merkers te evalueer; (ii) die nuwe merkers toe te ken aan arms van die kritiese *Thinopyrum* chromosome; en (iii) moontlike nuttige lyne met *Th. distichum* translokasies, substitusies (met kritiese *Thinopyrum* chromosome) en kritiese *Th. distichum* telosome te identifiseer. Om die merker-assosiasie studie af te rond, is alle ander beskikbare PKR-merkers (STS'e/SCAR's) vir die kritiese *Thinopyrum* chromosome ook op die groep sekondêre hibriede getoets. Dit is gedoen om die nuwe AFLP-merkers te verifieer.

2. Materiaal en Metodes

2.1 Plantmateriaal en DNS-ekstraksies

Alle plante wat in die eerste fase van die studie (EST-SSR en AFLP-merkerontwikkeling) gebruik is, is gedurende Januarie tot Maart 2007 in 'n meganies-verkoelde (12 °C/18 °C) glashuis op Welgevallen proefplaas (Stellenbosch) gekweek. Die genotipe-paneel wat benut is word in Tabel 2.1 verskaf. Die plante is daaglik met 'n standaard voedingsoplossing natgemaak, wat bestaan het uit 164 g 'Sol-u-fert T3T' (Kynoch Fertilizers Edms Bpk, Milnerton, RSA), 2 g 'Microplex' (Ocean Agriculture Edms Bpk, Muldersdrift, RSA) en 77 mL kaliumnitraat in 100 L water. Totale genomiese-DNS is uit die plante geïsoleer deur kleinskaalse CTAB ekstrakte te doen volgens Doyle en Doyle (1990) met aanpassings soos beskryf deur Prins *et al.* (1996). Die konsentrasie en kwaliteit van die DNS is met behulp van 'n NanoDrop® ND1000 spektrofotometer (Thermo Scientific, Wirmington, Delaware, VSA) bepaal.

Tabel 2.1 Paneel van genotipes wat gebruik is vir AFLP-merker ontwikkeling

Identifikasie	Beskrywing	Genoom-samestelling
<i>Th. distichum</i>	Strandkoringgras	2n = 28; J ₁ ^d J ₁ ^d J ₂ ^d J ₂ ^d
Rex triticale 96M2	Triticale kultivar Primêre <i>Th. distichum</i> / triticale allopoloïed	2n = 42; AABBRR 2n = 70; AABBRRJ ₁ ^d J ₁ ^d J ₂ ^d J ₂ ^d
DH544-19	Verdubbelde spontane haploïed uit die terugkruising: <i>Th. distichum</i> /2* triticale	2n = 54; AABBRR + 2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d , 5J ₁ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d , 7J ₂ ^d + 2 ongeïdentifiseerde chromosome
DH544-18	Verdubbelde spontane haploïed uit die terugkruising: <i>Th. distichum</i> /2* triticale	2n = 52; AABBRR + 2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 7J ₂ ^d , 7J ₂ ^d + 2 ongeïdentifiseerde chromosome
79S15A	'n Plant (met 2n = 42) geselekteer uit nageslag van 'n allopoloïed (2n = 56 = AABB ₁ ^d J ₁ ^d J ₂ ^d J ₂ ^d) met stamboom: <i>T. turgidum</i> var <i>durum</i> kultivar Nordum/ <i>Th. distichum</i>	2n = 42; AABBRR/JR/J besit blykbaar 'n derde genoom opgemaak uit rog en <i>Thinopyrum</i> chromosome (wat nie die kritiese chromosome insluit nie). Het moontlik ontstaan na bestuiwing van 'n primêre amfiploïede plant met heksaploïede triticale stuifmeel.
W1411	Triticale disomiese addisie	2n = 44; AABBRR + 2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d
W1412	Triticale disomiese addisie	2n = 44; AABBRR + 3J ₁ ^d , 3J ₁ ^d
W1413	Triticale disomiese addisie	2n = 42 + 2t; AABBRR + 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d L
W1414	Triticale disomiese addisie	2n = 44; AABBRR + 4J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
W1415	Triticale disomiese addisie	2n = 44; AABBRR + 4J ₂ ^d , 4J ₂ ^d
W1416	Triticale disomiese addisie	2n = 44; AABBRR + 5J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
W1417	Triticale disomiese addisie	2n = 44; AABBRR + 7J ₂ ^d , 7J ₂ ^d
W1422	Triticale 3J ₁ ^d S-translokasie-heterosigoot	2n = 44; AABBRR
W1421-3	Triticale 3J ₁ ^d L-translokasie-heterosigoot	2n = 44; AABBRR
2β37	Triticale monosomiese addisie vir 'n oënskynlik gerekombineerde 2J ₁ ^d	2n = 43; AABBRR + 2J ₁ ^d β

2.2 Merker-gebaseerde seleksie van plantmateriaal

Die genotipiese bronne W1422, W1421-3, en 2β37 (Tabel 2.1) segregeer vir die onderskeie *Th. distichum* teikensegmente en is daarom met behulp van STS-/SCAR-merkers (Marais *et al.*, 2007) gesif om draer-plante te identifiseer. Alle PKR's is in 'n 'GeneAmp® PCR System 2700' (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, Kalifornië, VSA) uitgevoer. PKR-mengsels is opgemaak met 10× NH₄ PKR-buffer (Bioline Bpk, London NW2 6EW, VK), 50 mM MgCl₂ (Bioline), 2.5 mM dNTP's (Bioline), 10 μM voorwaartse en terugwaartse inleier (Inqaba Biotech Edms. Bpk, Pretoria, RSA), 5 U/μL BIOTAQ polimerase ensiem (Bioline), en PKR-graad H₂O (Bioline). Vyftig nanogram templaats-DNS is per reaksie gebruik. Die individuele reaksie-samestellings, PKR-siklusse, asook die verwagte merkerbandgroottes vir elk van die verskillende inleiers word in Tabel 2.2 opgesom, en die nukleotiedvolgordes van die inleiers word in Tabel 2.3 verskaf.

Tabel 2.2 Inleiers en PKR-kondisies wat gebruik is vir identifisering van *Th. distichum* addisiechromosoom 2J₁^{dβ} en twee translokasiesegmente, 3J₁^{dS} en 3J₁^{dL}

Merker	Teiken-chromosoom/ gedeelte	Segregerende- lyn gesif	PKR-samestelling: finale konsentrasie	PKR-siklusse	Verwagte band- grootte (bp)
UST1-2J ₁ ^d (gebaseer op RAPD inleierstel OPK-6)	2J ₁ ^{dS}	2β37	1× PKR buffer	5 min @ 94 °C	1060
			2.5 mM MgCl ₂	30s @ 94 °C	
			0.2 mM dNTP's	45s @ 58 °C	} ×35
			4 pmol F-inleier	1 min @ 72 °C	
			4 pmol R-inleier		
			0.75 U <i>Taq</i>		
			Tot. Vol. = 15μL	7 min @ 72 °C	
				∞ @ 4 °C	
UST5- 3J ₁ ^{dL} (= J ₁ F ₁ ; gebaseer op RFLP- lokus <i>PSR931</i>)	3J ₁ ^{dL}	W1421-1, W1421-3	1× PKR buffer	5 min @ 94 °C	834
			2.5 mM MgCl ₂	1 min @ 94 °C	
			0.2 mM dNTP's	1 min @ 60 °C	} ×35
			5 pmol F-inleier	2 min @ 72 °C	
			5 pmol R-inleier		
			0.5 U <i>Taq</i>		
			Tot. Vol. = 25μL	5 min @ 72 °C	
				∞ @ 4 °C	
UST8- 3J ₁ ^{dS} (gebaseer op RAPD inleierstel OPM-9)	3J ₁ ^{dS}	W1422	1× PKR buffer	5 min @ 94 °C	1600
			2.5 mM MgCl ₂	1 min @ 94 °C	
			0.2 mM dNTP's	1 min @ 61 °C	} ×35
			5 pmol F-inleier	2 min @ 72 °C	
			5 pmol R-inleier		
			1 U <i>Taq</i>		
			Tot. Vol. = 25μL	5 min @ 72 °C	
				∞ @ 4 °C	

Vyf mikroliter van alle PCR-produkte is saam met 7 μ L 6 \times Ficoll laaibuffer (0.1 % ‘Orange G’, 20 % w/v Ficoll, 10 mM EDTA pH 8.3) op ‘n 2.0 % w/v agarose (Whitehead Scientific, Brackenfell, RSA) gel wat 2 μ L 10 mg/mL ethidium bromied (Sigma-Aldrich Edms Bpk, Johannesburg, RSA) bevat, gelaai. Fragmentgroottes van bande is bepaal deur ‘n pGEM DNS-merker-leer (Promega Korporasie, Madison, Wisconsin, VSA) te laai. Alle agarose gelle is vir 60 minute teen 100 V ge-elektroforeer in 1 \times TBE buffer (10 mM Tris-HCl, 2.75 % w/v boorsuur, 1 mM Na₂EDTA, pH 8.3). Bande is met behulp van ‘n ‘UVIpro Silver Geldoc’ sisteem (UVItec Bpk, Cambridge, VK) gevisualiseer.

Tabel 2.3 Nukleotiedvolgordes van voorwaartse en terugwaartse inleiers van STS’e/SCAR’s UST1-2J₁^d, UST5-3J₁^{dL} en UST8-3J₁^{dS} (Marais *et al.*, 2007)

Merker	Nukleotiedvolgorde	
	Voorwaartse inleier	Terugwaartse inleier
UST1-2J ₁ ^d	5’ CAC CTT TCC CTG TTA GGA TA 3’	5’ CCT GCA TCC TAC TCC AAC C 3’
UST5-J ₁ ^{dL}	5’ TTA GGA TTT GTC CAC TTG ATT 3’	5’ GTT GGT GCT TGG TAC CTT AAC 3’
UST8-3J ₁ ^{dS}	5’ GTC TTG CGG AAC GAG TAA AGA G 3’	5’ GTC TTG CGG ATG TGA GGA AGT C 3’

2.3 Opsporing van Thinopyrum-spesifieke EST-SSR-merkers

‘n Versameling van EST-SSR-merkers wat oorspronklik deur Nicot *et al.* (2004) ontwikkel is, is deur Zhang *et al.* (2007) bestudeer. Hulle het gevind dat die betrokke inleierpare nie net genoomspesifieke polimorfismes in koring amplifiseer nie, maar dat die merkers ook oordraagbaar was na ander spesies. Zhang *et al.* (2007) se data is daarom geraadpleeg om EST-SSR-merkers te vind wat spesifiek op koringchromosome 2, 4 en 5 voorkom en goeie oordraagbaarheid na verwante, wilde spesies getoon het. ‘n Totaal van 13 inleierpare is gekies en die betrokke oligonukleotide is deur Inqaba Biotech vervaardig. Daar is gefokus op homoeoloë groepe 2, 4 en 5 omdat daar alreeds chromosoom-arm-spesifieke SCAR-merkers vir chromosoom 3J₁^d ontwikkel kon word (Marais *et al.*, 2007). Die relevante inligting omtrent die mikrosatelliet-inleierpare wat gebruik is word in Tabel 2.4 verskaf.

Tabel 2.4 EST-SSR-merkers wat gebruik is om *Thinopyrum*-spesifieke mikrosatelliet-loci te vind, soos verskaf deur Zhang *et al.* (2007)

Merker	Motief	Aantal herhalings	Fragmentgrootte (bp)	Chromosoomligging (<i>Triticum aestivum</i>)
cfe13	CGG	5	379, 382	2AL, 2D
cfe53	TC	10	120	2AL
cfe67	AG	11	186, 222	2D
cfe169	CGG	4	165	2B, 2D, 6A
cfe22	TTC	4	158, 161	4A
cfe34	TG	8	224, 257	4BL, 5A, 5B
cfe58	TTA	4	222	4A, 4D
cfe197	TAA	4	305, 309	4BL, 4D
cfe234	GTCC	6	251-571	4A, 4D
cfe159	CAG	6	183, 194	5A, 5D
cfe37	TACG	3	161, 165	5A, 5B
cfe208	AGG	4	262	5A
cfe229	ACA	4	315	5B

Die EST-SSR mikrosatelliet PKR's is met dieselfde komponente as voorheen opgemaak. Die hoeveelheid templaats-DNS wat in elke PKR gebruik is, was 100 ng. Die finale konsentrasies van PKR-komponente was soos beskryf deur Tixier *et al.* (1998), amplifikasie is verkry deur PKR-siklusse te volg soos beskryf deur Röder *et al.* (1998).

Vyf mikroliter van die mikrosatelliet PKR-produkte is saam met 6 µL Cresol laaibuffer (0.1 % w/v Cresol, 18 % w/v sukrose) op 'n 1.5 % w/v agarose-toetsgel (met 2 µL 10 mg/mL ethidium bromied) gelaai. Die toetsgel is vir ongeveer 45 min teen 100 V ge-elektroforeer. Visualisering met UV-licht het aangedui of daar amplifikasie-produk is.

Finale skeiding van die mikrosatelliet PKR-produkte is op 'n 6 % poli-akriëlamied volgordebepalingsgel (6 M urea, 1× TBE) uitgevoer. Die 6 % volgordebepalingsgel-mengsel is voorberei deur 37.5 mL 40 % akriëlamied-oplossing (38 % w/v akriëlamied, 2 % w/v bis-akriëlamied), 90.09 g urea (Sigma-Aldrich), en 50 mL 5× TBE te meng en tot 'n finale volume van 250 mL te bring met gedistilleerde, tru-osmose H₂O (RO dH₂O). Polimerisasie is bewerkstellig deur 800 µL 10 % ammoniumpersulfaat en 160 µL TEMED (Sigma-Aldrich) by 160 mL 6 % poli-akriëlamied volgordebepalingsgel-mengsel te voeg en goed te meng. Die gel is daarna tussen twee glasplate met 1.0 mm spasieërders gegiet, en toegelaat om volledig te polimeriseer (ongeveer 90 minute). Die twee glasplate is voor gieting met 'plate-glue' (Sigma-Aldrich) en 'C-THRU' (Wynn Oil SA Edms Bpk, Bellville, RSA) behandel. Die langer glasplaat, wat loskom van die gel, is met 100 % etanol skoongemaak en met 'C-THRU' behandel. Die korter glasplaat, waarop die gel gefikseer word, is met 100 % etanol

skoongemaak en met 1.880 mL 'plate glue' (92.55 % v/v verdunde 'plate glue' [800× verdun met 100 % etanol], 7.45 % v/v 10 % asynsuur) behandel.

Die glasplate met gegiete mikrosatellietgel is in 'n 'Model S2001 Vertical Gel Electrophoresis System' (GibcoBRL Life Technologies Bpk, Paisley, VK) geplaas en die buffer-tenk is met 1× TBE gevul. Die gelputjies is met 'n spuit naald oorgespuite, en die gel-elektroforese apparaat is aan 'n 'Hofer PS 2500 DC' kragbron (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, Kalifornië, VSA) gekoppel. Voordat die gel gelaai is, is die apparaat toegelaat om vir 30 minute teen 45 W te loop.

Voordat die PKR-produkte gelaai is, is 12.5 µL laai-buffer (98 % v/v formamied, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.05 % w/v bromofenolblou, 0.5 % w/v xileen-sianol FF) by elke monster gevoeg. Die monsters asook 'n 100 bp DNS-leer (Promega) is vir 5 minute by 95 °C gedeneer en dadelik op ys geplaas. Twaalf-en-'n-halwe mikroliter van elke monster is in afsonderlike putjies gelaai, en elektroforese is teen 45 W vir ongeveer 5 ure in 'n 4 °C instap-yskas uitgevoer.

Mikrosatellietbande is by wyse van silwernitrat-kleuring gevisualiseer (Beidler *et al.*, 1982). Die mikrosatellietgel is na elektroforese in 'n fotografiese ontwikkelingsbak geplaas en met ys bedek, waarna die spasieërders en die lang glasplaat verwyder is. Die gel is ge-fikseer met fikseringsoplossing (10 % v/v etanol, 0.5 % v/v asynsuur); gekleur met 0.1 % w/v silwernitrat en ontwikkel in 1.5 % w/v NaOH bevattende 0.405 % v/v formaldehid. Potensieel nuttige EST-SSR-merkers is geïdentifiseer indien fragmente teenwoordig was in *Th. distichum*, 96M2, en 'n tersaaklike addisielyn, maar nie in Rex triticales nie.

2.4 Ontwikkeling van AFLP-merkers

Daar is van fluoressensie-gebaseerde, semi-geoutomatiseerde AFLP-analise gebruik gemaak om AFLP-merkers vir kritiese *Th. distichum* chromosome op te spoor. Die protokol van Vos *et al.* (1995), soos gewysig deur Donini *et al.* (1997) en Schwarz *et al.* (2000) is gebruik. Die ontleding is volgens die voorskrifte in die 'AFLP Plant mapping kit' van PE/Applied Biosystems gedoen. Sestig selektiewe *EcoRI* en *MseI* inleier-kombinasies (PE/Applied Biosystems), asook 36 selektiewe *Sse8387I* (PE/Applied Biosystems) en *MseI* inleier-

kombinasies (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Swede) is gebruik. Die selektiewe *MseI*-inleiers is ongemerk gelaat, terwyl die selektiewe *EcoRI*- en *Sse8387I*-inleiers elk met 'n fluoresserende kleurstof gemerk is. Die kleurstowwe (fluorofore) wat gebruik is, was 6-FAMTM; JOETM en NEDTM. Selektiewe inleiers S27 en S30 (gemerk met onderskeidelik 6-FAMTM en NEDTM) is deur Applied Biosystems vervaardig, terwyl inleier S29 (gemerk met JOETM) deur Integrated DNA Technologies (IDT Whitehead Technologies Inc., Coralville, Iowa, VSA) vervaardig is. Die AFLP-entstukke en die pre-selektiewe inleiers met hul nukleotied-volgordes word in Tabel 2.5 gelys. Die verskillende selektiewe inleiers met hul identifiseringskodes, nukleotied-volgordes en fluoresserende kleurstof word in Tabel 2.6 uiteengesit.

Tabel 2.5 Nukleotied-volgordes van AFLP-entstukke en pre-selektiewe inleiers

Entstuk/ Inleier	Nukleotied-volgorde
<i>EcoRI</i> -entstuk	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' 3'-CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5'
<i>Sse8387I</i> -entstuk	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA-3' 3'-CA TCT GAC GCA TGT-5'
<i>MseI</i> -entstuk	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3' 3'-TA CTC AGG ACT CAT-5'
<i>EcoRI</i> pre-selektiewe inleier (E00)	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
<i>Sse8387I</i> pre-selektiewe inleier (S00)	5'-AGA CTG CGT ACA TGC AGG-3'
<i>MseI</i> pre-selektiewe inleier (M00)	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'

Vyftig nanogram DNS van elke monster is met 5 U *MseI* en 5 U *EcoRI/Sse8387I* in 'n restriksie-ligasie reaksie verteer tesame met 6.6 μ L PKR-graad H₂O, 2 μ L 10 \times USB "One-Phor-All-Buffer" (Amersham-Pharmacia Biotech), 2 μ L 10 mM ATP, 5 pmol *EcoRI/Sse8387I* en 50 pmol *MseI* entstukke (PE/Applied Biosystems), 0.2 μ L 10 mg/mL BSA (New England Biolabs Bpk., Hitchin, VK), 0.2 μ L 5 U/ μ L T4-DNS Ligase (PE/Applied Biosystems). Die inhoud van elke buisie is kortstondig gesentrifugeer, en oornag by kamertemperatuur geïnkubeer. Vyf mikroliter van elke restriksie-ligasie-reaksie is 10 maal verdun met 1 \times TE_{0.1} buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 8.0) (Amersham-Pharmacia Biotech).

Van die verdunde restriksie-ligasie-DNS, is 5.2 μ L vir pre-amplifikasie gebruik. Hiervoor is 8.9 μ L PKR-graad H₂O, 2.0 μ L 10 \times NH₄ PKR-buffer, 1.6 μ L 2.5 mM dNTP's, 1.5 μ L

E00/M00 inleermengsel (PE/Applied Biosystems), 0.6 μL 50 mM MgCl_2 , en 1 U BIOTAQ-polimerase in 'n 20 μL PCR gebruik. Vir die *Sse8387I/MseI* kombinasies is die pre-amplifikasie inleiers as volg apart bygevoeg: 1.5 μL 50ng/ μL S00 en 1.5 μL 50ng/ μL M00. Amplifikasie-siklusse was as volg: een denatureringstap van 5 minute by 72 °C; 30 siklusse met een denatureringstap van 30 s by 94 °C gevolg deur 'n aanhegtingstap van 60 s by 56 °C gevolg deur 'n verlengingstap van 60 s by 72 °C; en 'n laaste verlengingstap van 5 minute by 72 °C. Die PCR-produk is daarna 10 \times verdun met 1 \times TE_{0.1} buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 8.0), en by 4°C gestoor.

Tabel 2.6 Selektiewe *MseI*, *EcoRI* en *Sse8387I* inleiers wat vir die opsporing van AFLP-merkers gebruik is

Selektiewe inleier	Nukleotied-volgorde	Kode	Fluorochroom
<i>MseI</i> -AA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAA -3'	M11	
<i>MseI</i> -AC	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAC -3'	M12	
<i>MseI</i> -AG	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAG -3'	M13	
<i>MseI</i> -AT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAT -3'	M14	
<i>MseI</i> -CA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA -3'	M15	
<i>MseI</i> -CC	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACC -3'	M16	
<i>MseI</i> -CG	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACG -3'	M17	
<i>MseI</i> -CT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT -3'	M18	
<i>MseI</i> -GA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AGA -3'	M19	
<i>MseI</i> -GC	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AGC -3'	M20	
<i>MseI</i> -GG	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AGG -3'	M21	
<i>MseI</i> -GT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AGT -3'	M22	
<i>MseI</i> -CAA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA A -3'	M47	
<i>MseI</i> -CAC	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA C -3'	M48	
<i>MseI</i> -CAG	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA G -3'	M49	
<i>MseI</i> -CAT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA T -3'	M50	
<i>MseI</i> -CTA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT A -3'	M59	
<i>MseI</i> -CTC	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT C -3'	M60	
<i>MseI</i> -CTG	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT G -3'	M61	
<i>MseI</i> -CTT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT T -3'	M62	
<i>EcoRI</i> -AAC [NED]	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAA C -3'	E32	NED TM
<i>EcoRI</i> -ACA [FAM]	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAC A -3'	E35	6-FAM TM
<i>EcoRI</i> -AGG [JOE]	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG G -3'	E41	JOE TM
<i>Sse8387I</i> -AGA [FAM]	5'- GAC TGC GTA CAT GCA GGA GA -3'	S27	6-FAM TM
<i>Sse8387I</i> -AGG [JOE]	5'- GAC TGC GTA CAT GCA GGA GG -3'	S29	JOE TM
<i>Sse8387I</i> -AGT [NED]	5'- GAC TGC GTA CAT GCA GGA GT -3'	S30	NED TM

Verdunde pre-amplifikasie-produk (2.5 μL) is as templaats-DNS vir selektiewe amplifikasie gebruik. Hiervoor is 2.85 μL PCR-graad H₂O, 1 μL 10 \times NH₄ PCR-buffer, 0.8 μL 2.5 mM dNTP's, 1 μL 5 μM selektiewe *MseI*-inleier, 0.5 μL 1 μM 6-FAMTM-gemerkte *EcoRI*-ACA/*Sse8387I*-AGA inleier, 0.5 μL 1 μM JOETM-gemerkte *EcoRI*-AGG/*Sse8387I*-AGG inleier, 0.5 μL 1 μM NEDTM-gemerkte *EcoRI*-AAC/*Sse8387I*-AGT inleier, 0.3 μL 50 mM

MgCl₂, en 1 U BIOTAQ-DNS-polimerase in 'n 10 µL multipleks-PKR gebruik. Amplifikasie was as volg: 13 sikkusse bestaande uit 'n denatureringstap van 30 s by 94 °C gevolg deur 'n aanhegtingstap van 30 s (aanvanklik by 65 °C), waarvan die temperatuur met elke siklus inkrementeel met 0.7 °C verlaag is, gevolg deur 'n verlengingstap van 60 s by 72 °C. Dit is opgevolg deur 23 sikkusse bestaande uit 'n denatureringstap van 30 s by 94 °C en 'n aanhegtingstap van 30 s by 56 °C gevolg deur 'n verlengingstap van 60 s by 72 °C.

Die PCR-produkte is daarna by die Sentrale Analitiese Fasiliteit (SAF) van die Universiteit van Stellenbosch onderwerp aan fluoressensie-gebaseerde, semi-geoutomatiseerde AFLP-analise. Vyf mikroliter van elk van die 16 PCR-produkte is gemeng met 0.2 µL 'GeneScan™ - ROX 500 size standard' en individueel in 50 cm kapillêre (gevul met 'POP-7 Polymer' [PE/Applied Biosystems]) van 'n 'Applied Biosystems 3130x1 Genetic Analyzer' volgordebepaler gelaai. Kapillêre ko-elektroforese van die produk en die 'ROX 500' is daarna uitgevoer op bogenoemde volgordebepaler. Die 'GeneScan™ - 500 ROX size standard' is gebruik om die grootte van fragmente tussen 75 bp en 500 bp te bepaal. Die rou data is versamel deur 'Data Collection' programmatuur, en 'GeneMapper® ver.3.0' sagteware (Rinehart, 2004) is gebruik om dit te verwerk.

Verkrygte fragmente is deur die programmatuur in 1 basispaar bundels ('bins') geplaas. Elektroferogram-visualiserings van die fragmente, met basispaargroottes en piek-hoogtes, is met behulp van 'GeneMapper®' verkry. Die fragmente van die verskillende genotipes is deur die programmatuur vergelyk, en fragmente (tussen 100 bp en 500 bp) is as allele in 'n tabel aangeteken. Allele is visueel beoordeel om potensieël-nuttige AFLP-merkers te identifiseer. 'n Arbitrêre minimum piek-hoogte van 100 is in die meeste gevalle gebruik vir die identifikasie van pieke. Oordeel is gebruik om fragmente met 'n lae piekhoogte (<100) as 'n alleel te identifiseer, en uitsonderings is gemaak met inagneming van agtergrond-geraas en piek-spasiëring. Fragmente wat teenwoordig was in *Th. distichum*, 96M2, en 'n tersaaklike addisiel, maar nie teenwoordig in *Rex triticales* nie, is as potensieël nuttige merkers beskou.

Nadat *Thinopyrum*-spesifieke merkers geïdentifiseer is, is teellyn 79S15A ondersoek vir die teenwoordigheid van *Thinopyrum*-spesifieke AFLP-merkers. Daar is aanvanklik vermoed dat 79S15A die genoomsamestelling AABBJ₁₂^d/J₁₂^d het, waar J₁₂^d 'n gebalanseerde genoom is opgemaak uit J₁^d- en J₂^d-chromosome (met ander woorde dat dit 'n *tritipyrum* is). Indien dit

wel die geval was sou 79S15A 'n ideale spilgenotipe wees vir die ontwikkeling, deur terugkruising, van soutverdraagsame sekondêre amfiploïede.

2.5 Evaluasie van soutverdraagsaamheid daargestel deur chromosome $2J_1^d$ en $3J_1^d$

Vorige resultate (Marais *et al.*, 2007) het daarop gedui dat chromosome $2J_1^d$ en $3J_1^d$ die enigste kombinasie van twee kritiese chromosome is wat 'n beduidende vlak van soutverdraagsaamheid (in triticale) daarstel. Dit maak dus sin om hierdie twee chromosome eerste te teiken in 'n poging om gepaste translokasies te ontwikkel. 'n Eksperiment is daarom uitgevoer om die interaksie van die twee chromosome te ondersoek en vas te stel watter chromosoom-arms hierby betrek word. Addisielyne vir $2J_1^d\beta$ en $2J_1^d$ is in alle moontlike kombinasies met addisielyne vir $3J_1^dL$ en $3J_1^d$, asook met translokasielyne $3J_1^dL$ en $3J_1^dS$ gekruis (Marais 2007, persoonlike mededeling), en die agt F_1 -kruisingskombinasies is met letters A tot H gekodifiseer (Sien Tabel 2.7). Die F_1 -sade uit kruisings A tot H is met die PKR-merkers van Tabel 2.2 gesif ten einde plante te identifiseer wat die gewenste kombinasies van $2J_1^d$ en $3J_1^d$ addisiechromosome/-chromosoomfragmente besit het. Vanweë die volume werk en die feit dat sommige kruisings baie lae frekwensies plante van die gesogte tipe ingesluit het, is hierdie karakterisering oor 'n periode van 4 weke uitgevoer. Ten einde plantmateriaal daar te stel wat nagenoeg gesinchroniseerd was in terme van groeistadium, en ook om soveel moontlik herhaalde metings te doen, is die geselekteerde plante op gereelde tye (wanneer in die 2-3 blaar stadium) gekloneer. Klone is onderhou totdat 'n volledige stel van materiaal vir 'n soutverdraagsaamheidstoets beskikbaar was.

Tabel 2.7 Kruisings uitgevoer met addisie- en translokasie-lyne vir *Thinopyrum* chromosome $2J_1^d$ en $3J_1^d$

	$2J_1^d$ addisielyn (W1411) ¹	$2J_1^d\beta$ addisielyn (2 β 37) ²
$3J_1^dS$ translokasielyn (W1422) ³	A	E
$3J_1^dL$ translokasielyn (W1421) ³	B	F
$3J_1^dL$ addisielyn (W1413) ⁴	C	G
$3J_1^d$ addisielyn (W1412) ¹	D	H

¹ Ouerplant was 'n disomiese addisie met $2n = 44$

² Ouerplant was 'n monosomiese addisie met $2n = 43$

³ Ouerplant was heterosigoties vir 'n translokasiechromosoom, $2n = 42$

⁴ Ouerplant was 'n ditelosomiese addisie met $2n = 42 + 2t$

Die souttoetse is tussen Oktober en Desember 2007 in ‘n verkoelde (12 °C/18 °C) glashuis op Welgevallen proefplaas gedoen. Die proef is as volg uitgevoer: (i) Plante is in 2 L plastiek potte geplant. In elke pot is daar drie gate geboor (8 mm deursnee; 3 cm bokant die bodem) vir dreineringsdoeleindes. Die potte is ongeveer 80 % gevul met growwe sand; (ii) twee plante is per pot geplant. ‘n Totaal van 94 plante (klone) is in die proef gebruik en is op toevallige wyse aan potte toegewys. Agtien Rex- (heksaploïede triticale) en 15 Henoeh- (verboude, diploïede rog) plante is as kontroles ingesluit; (iii) plante is toegelaat om te vestig (ongeveer 2 weke) en is daaglik met standaard voedingsoplossing (afdeling 2.1) natgemaak totdat alle plante sterk groei getoon het, waarna soutbehandelings begin is; (iv) soutoplossings is voorberei deur gelyke hoeveelhede NaCl en CaCl₂ in die standaard voedingsoplossing op te los. Elke pot is daaglik natgemaak met 250 mL van die soutoplossing. Die hoeveelheid sout wat per liter bygevoeg is, asook die benaderde elektriese-konduktiwiteit (EK) van die oplossings word in Tabel 2.8 verskaf. Die soutoplossing se EK is elke tweede dag met 4 dS.m⁻¹ verhoog deur sout by te voeg totdat ‘n vlak van 38 dS.m⁻¹ bereik is. By bereiking van die hoogste soutvlak is elke pot daaglik met 250 mL van die 38 dS.m⁻¹ soutoplossing natgemaak totdat ongeveer 70-80 % van die kontrole Rex triticale plante dood was, en die res duidelik besig was om dood te gaan. Alle plante is uit die potte geskud en ‘n visuele beoordelingspunt is aan elke plant toegeken. ‘n Punteskalaal tussen nul (minste soutverdraagsaam) en ses (mees soutverdraagsaam) is gebruik, en word in Tabel 2.9 verduidelik. Die plante van ‘n spesifieke kruising/kontrolegroep is vervolgens saam gegroep en ‘n foto is daarvan geneem.

Tabel 2.8 Soutkonsentrasies van oplossings waarmee plante behandel is (250 mL per dag) tydens souttoetsing

EK ¹ (dS.m ⁻¹)	Hoeveelhede ² NaCl & CaCl ₂ opgelos (g/L)
6	0.75
10	1.86
14	3.0
18	4.37
22	5.75
26	7.25
30	8.87
34	10.37
38	11.87

¹ Elektriese konduktiwiteit

² Van elke sout

Tabel 2.9 Punteskala wat gebruik is vir visuele beoordeling van plante na afloop van die soutproef

Visuele beoordelingspunt	Beskrywing
1	Alle blare en are is dood. Stamme totaal verdroog tot effens groen.
2	Alle blare dood. Ongeveer 50 % van are is nog groen. Stamme is effens groen.
3	Ongeveer 10 % van blare is nog groen. Ongeveer 75 % van are is nog groen. Stamme is groen.
4	Ongeveer 25 % van blare is nog groen. Are is hoofsaaklik groen.
5	Ongeveer 50 % van blare is nog groen. Are is almal nog groen.
6	Ongeveer 75 % en meer van blare is nog groen.

2.6 Merker-assosiasies in 'n groep sekondêre hibriede

In 'n program gemik op die ontwikkeling van plante wat genomies $2n = 6x = 42 = AABBR/J_{12}^dR/J_{12}^d$ is, het Marais (2008, persoonlike mededeling) sekondêre hibriede ontwikkel uit die kruising: 79S15A*2/F₂: 97M1. Die ouers in hierdie kruising het die volgende genotipes: (i) 79S15A is 'n seleksie uit 'n primêre allopoliploïed met stamboom = *T. durum/Th. distichum*. Die lyn het $2n = 42$ chromosome in plaas van $2n = 56$ soos in die primêre allopoloïed. Aanvanklik is vermoed dat die plant genomies $AABBJ_{12}^dJ_{12}^d$ is. C-band analise en toetsing met rog-spesifieke merkers (Marais 2008, persoonlike mededeling) het egter getoon dat die plant eerder ontstaan het na oopbestuiwing met triticale. 79S15A is dus genomies $AABBR/J_{12}^dR/J_{12}^d$ met 'n R/J_{12}^d genoom wat 'n kombinasie van R- en J_{12}^d -chromosome bevat. Die lyn besit egter geeneen van die vier J_1^d -teikenchromosome nie. (ii) F₂-plante uit kruising 97M1 (met stamboom *Th. distichum*/2* triticale) het die genoomsamestelling $AABBJ_1^d/J_2^d$ ($2n = 51-52$) gehad en het wel die vier J_1^d -teikenchromosome besit.

Terugkruisings F₁ van 79S15A*2/F₂: 97M1 met $2n = 44-46$ en wat al vier teikenchromosome besit het (Fig. 2.1), is geselekteer en is onderling met mekaar gekruis. Die F₁ uit laasgenoemde kruising is weer gesif vir plante met $2n = 42-43$ en wat kombinasies van die vier teikenchromosome besit het. Die geselekteerde plante is weereens onderling gekruis. Die F₁ van hierdie kruising is sitologies ondersoek en 'n groep van 95 plante met chromosoomgetalle van 42-43 is geselekteer en uitgeplant (Marais 2008, persoonlike

mededeling). Hierdie plante is in die huidige studie gebruik om merker-assosiasies te bestudeer.

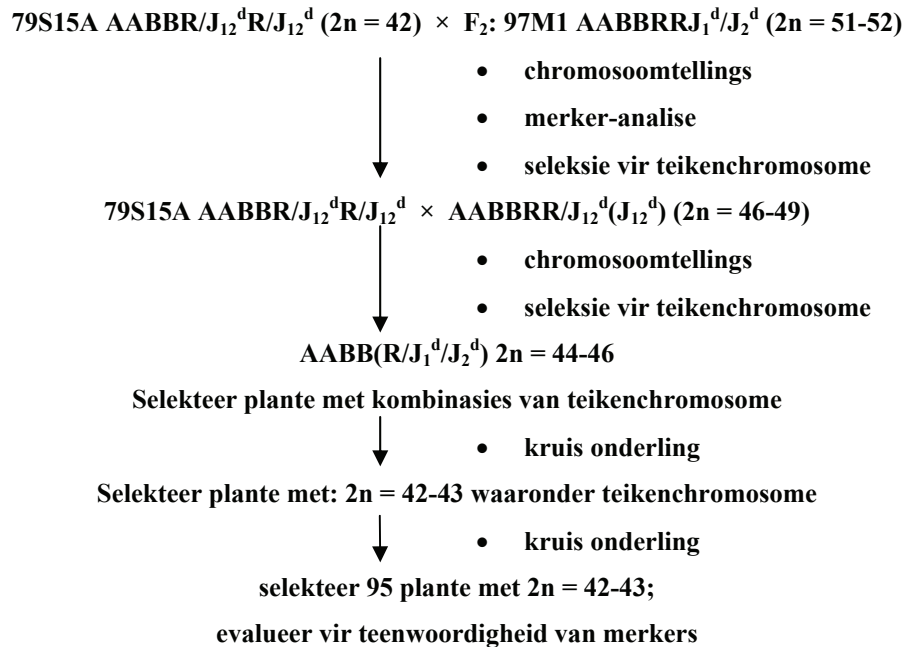


Fig. 2.1 Skematiese voorstelling van die ontwikkeling van 'n groep sekondêre hibriede wat gebruik is vir 'n merker-assosiasie studie (Marais 2008, persoonlike mededeling).

Die groep sekondêre hibriede is in Februarie 2008 in 'n water-verkoelde glashuis op Welgevallen proefplaas geplant. Inligting rakende die oorsprong en chromosoomgetal van elke plant word in Tabel 2.10 verskaf. Totale genomiese-DNS van elk van die 95 sekondêre hibriede is ge-ekstraheer en die konsentrasie en kwaliteit van die DNS is bepaal soos voorheen beskryf (afdeling 2.1).

Tabel 2.10 Die groep van 95 sekondêre hibriede wat gebruik is vir 'n merker-assosiasie studie

Plant no.	Kruising & plant ID.	2n	Ouer-samestelling (in terme van <i>Th. distichum</i> teiken-chromosome)
1	O7M93-542	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
2	O7M93-543	41	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
3	O7M93-544	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
4	O7M93-545	42+t ¹	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
5	O7M93-547	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
6	O7M93-548	41	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
7	O7M93-549	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
8	O7M93-553	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
9	O7M93-558	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
10	O7M93-567	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
11	O7M93-568	41	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
12	O7M93-569	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
13	O7M97-1	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
14	O7M97-2	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
15	O7M97-3	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
16	O7M94-6	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
17	O7M94-7	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
18	O7M97-9	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
19	O7M97-10	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
20	O7M97-11	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
21	O7M97-12	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
22	O7M97-13	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
23	O7M97-14	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
24	O7M97-15	41	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
25	O7M96-16	42	3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d
26	O7M94-18	41+t ¹	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
27	O7M94-19	42	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
28	O7M97-21	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
29	O7M97-22	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
30	O7M97-23	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
31	O7M97-24	41	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
32	O7M96-25	42	3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d
33	O7M94-28	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
34	O7M94-32	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
35	O7M94-33	42+t ¹	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
36	O7M94-34	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
37	O7M94-35	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
38	O7M97-38	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
39	O7M97-39	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
40	O7M97-40	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
41	O7M97-41	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
42	O7M97-43	43	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
43	Onbekend-44	43	?
44	Onbekend-45	42	?
45	Onbekend-46	43	?
46	Onbekend-47	41	?
47	Onbekend-48	43	?
48	Onbekend-50	43	?
49	Onbekend-51	42	?
50	Onbekend-52	42	?
51	Onbekend-53	43	?
52	O7M97-54	42	3J ₁ ^d / 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
53	O7M94-60	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
54	O7M94-63	42	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d

Plant no.	Kruising & plant ID.	2n	Ouer-samestelling (in terme van <i>Th. distichum</i> teiken-chromosome)
55	O7M94-65	41	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
56	O7M94-66	43	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
57	O7M94-67	42	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
58	O7M94-68	42	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d
59	O7M95-71	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
60	O7M95-73	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
61	O7M95-74	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
62	O7M95-75	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
63	O7M95-76	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
64	O7M95-77	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
65	O7M95-78	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
66	O7M95-79	41	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
67	O7M95-81	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
68	O7M95-83	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
69	O7M95-84	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
70	O7M95-85	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
71	O7M95-87	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
72	O7M95-89	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
73	O7M95-91	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
74	O7M95-92	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
75	O7M95-93	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
77	O7M95-95	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
78	O7M95-96	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
79	O7M95-99	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
80 ⁴			
81	O7M95-102	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
82	O7M95-103	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
83	O7M95-105	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
84	O7M95-106	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
85	O7M95-109	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
86	O7M95-116	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
87	O7M95-118	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
88	O7M95-119	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
89	O7M95-122	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
90	O7M95-123	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
91 ⁴			
92	O7M95-138	42	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
93	O7M95-162	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
94	O7M95-165	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
95	O7M95-166	43	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d , 5J ₁ ^d / 3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d
2086 ²	/	?	2J ₁ ^d β
W1422 ³	/	42	3J ₁ ^d S

¹ +t dui die teenwoordigheid van 'n ongeïdentifiseerde telosoom aan

² Plant 2086 is 'n kontrole-genotipe wat voorheen (Marais 2008, persoonlike mededeling) geïdentifiseer is en 'n 2J₁^dL telosoom besit

³ W1422 is 'n kontrole-genotipe en is 'n tritcale 3J₁^dS-translokasie-heterosigoot

⁴ Plante 80 en 91 het nie oorleef nie, en is dus weggelaat

Die DNS van die groep sekondêre hibriede is hierna gebruik vir AFLP-analise soos beskryf in afdeling 2.4. 'n Enkele *MseI*-inleier (*MseI*-CAG) en drie *EcoRI*-inleiers (*EcoRI*-AAC, *EcoRI*-ACA, *EcoRI*-AGG) is gebruik vir die selektiewe amplifikasie-rondte. Die enkele *MseI*-CAG inleier amplifiseer 'n totaal van tien merkers wat *Th. distichum* chromosome 2J₁^d, 3J₁^d, 4J₂^d en 5J₁^d dek. Die relevante inligting omtrent hierdie merkers word in Tabel 2.11 verskaf.

Tabel 2.11 AFLP-merkers waarvoor getoets is in die groep sekondêre hibriede

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosoom spesifisiteit	Fragmentgrootte (bp)	Selektiewe inleiers gebruik vir amplifikasie
E32M49.118	2J ₁ ^d	118	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E32M49.124	4J ₂ ^d	124	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E32M49.125	2J ₁ ^d	125	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E32M49.129	3J ₁ ^d	129	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E32M49.144	5J ₁ ^d	144	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E35M49.137	3J ₁ ^{dS}	137	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAG
E41M49.103	2J ₁ ^d	103	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAG
E41M49.121	5J ₁ ^d	121	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAG
E41M49.131	2J ₁ ^d	131	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAG
E41M49.188	3J ₁ ^{dL}	188	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAG

Hierna is die groep sekondêre hibriede by wyse van PCR gesif met alle beskikbare STS-/SCAR-merkers vir *Th. distichum* chromosome 2J₁^d, 3J₁^d, 4J₁^d en 5J₁^d (Marais *et al.*, 2007). Die PCR's is saamgestel, uitgevoer en gevisualiseer soos beskryf in afdeling 2.2. Die SCAR-merkers wat gebruik is, word in Tabelle 2.2 en 2.12 verskaf, met inligting omtrent hul individuele reaksiesamestellings en amplifikasie-siklusse. Die nukleotiedvolgordes van die inleiers verskyn in Tabelle 2.3 en 2.13.

Tabel 2.12 Bykomstige¹ PCR-gebaseerde SCAR-merkers wat gebruik is vir die merker-assosiasie studie

Merker	Teiken-chromosoom/ gedeelte	PCR-samestelling: finale konsentrasie	PCR-siklusse	Verwagte bandgrootte (bp)	
UST2-2J ₁ ^d (gebaseer op RAPD inleierstel OPK-17)	2J ₁ ^{dL}	1× PCR buffer	5 min @ 94 °C	652	
		2.5 mM MgCl ₂	} ×35		
		0.2 mM dNTP's			30s @ 94 °C
		8 pmol F-inleier			45s @ 58 °C
		4 pmol R-inleier			1 min @ 72 °C
		0.75 U Taq	7 min @ 72 °C		
		Tot. Vol. = 15µL	∞ @ 4 °C		
UST9-4J ₁ ^d (gebaseer op RAPD inleierstel OPX-11)	4J ₁ ^d	1× PCR buffer	5 min @ 94 °C	940	
		2.5 mM MgCl ₂	} ×35		
		0.2 mM dNTP's			1 min @ 94 °C
		5 pmol F-inleier			1 min @ 57.5 °C
		5 pmol R-inleier			2 min @ 72 °C
		1 U Taq	5 min @ 72 °C		
		Tot. Vol. = 25µL	∞ @ 4 °C		
UST13-5J ₁ ^d (gebaseer op RAPD inleierstel OPU-14)	5J ₁ ^d	1× PCR buffer	5 min @ 94 °C	728	
		2.5 mM MgCl ₂	} ×35		
		0.2 mM dNTP's			1 min @ 94 °C
		5 pmol F-inleier			1 min @ 62 °C
		5 pmol R-inleier			2 min @ 72 °C
		1 U Taq	5 min @ 72 °C		
		Tot. Vol. = 25µL	∞ @ 4 °C		

Merker	Teiken-chromosoom/ gedeelte	PKR-samestelling: finale konsentrasie	PKR-siklusse	Verwagte bandgrootte (bp)
UST14-5J ₁ ^d (gebaseer op RAPD inleierstel OPV-7)	5J ₁ ^d	1× PKR buffer 2.5 mM MgCl ₂ 0.2 mM dNTP's 5 pmol F-inleier 5 pmol R-inleier 1 U Taq Tot. Vol. = 25µL	5 min @ 94 °C 1 min @ 94 °C 1 min @ 63 °C 2 min @ 72 °C } ×35 5 min @ 72 °C ∞ @ 4 °C	505
UST15-4J ₁ ^d (gebaseer op RAPD inleierstel OPN-6)	4J ₁ ^d	1× PKR buffer 2.5 mM MgCl ₂ 0.2 mM dNTP's 5 pmol F-inleier 5 pmol R-inleier 1 U Taq Tot. Vol. = 25µL	5 min @ 94°C 1 min @ 94 °C 1 min @ 58 °C 2 min @ 72 °C } ×35 5 min @ 72 °C ∞ @ 4 °C	587

¹ STS-/SCAR-merkers UST1-2J₁^d, UST5-3J₁^dL en UST8-3J₁^dS is ook in die merker assosiasie studie gebruik, maar word nie in die tabel ingesluit nie aangesien hul inligting reeds in Tabel 2.2 verskyn.

Tabel 2.13 Nukleotiedvolgordes¹ van SCAR inleiers wat gebruik is vir die merker-assosiasie-studie

Merker	Nukleotiedvolgorde	
	Voorwaarde inleier (F)	Terugwaartse inleier (R)
UST2-2J ₁ ^d	5' TGC TCA ATG AAA CAG GAG ACT G 3'	5' TTG AAA CTT CCC TCC TGC G 3'
UST9-4J ₁ ^d	5' GGA GCC TCA GGA TCA TCA TGC 3'	5' GGA GCC TCA GCA ATG AAT GGA 3'
UST13-5J ₁ ^d	5' TGG GTC CCT CAA GCT ACG TGT 3'	5' TGG GTC CCT CCA ACC CCC C 3'
UST14-5J ₁ ^d	5' GAA GCC AGC CGA AGA GAT CTC 3'	5' GAA GCC AGC CCT TGG GGG T 3'
UST15-4J ₁ ^d	5' GAG ACG CAC AGG GGA CCG 3'	5' GAG ACG CAC ACA CAC GTA CA 3'

¹ STS-/SCAR-merkers UST1-2J₁^d, UST5-3J₁^dL en UST8-3J₁^dS is ook in die merker assosiasie studie gebruik, maar word nie in die tabel ingesluit nie aangesien hul inligting reeds in Tabel 2.3 verskyn.

3. Resultate en Bespreking

3.1 gDNS-ekstraksies vir merker-ontwikkeling

Genomiese-DNS is suksesvol uit plante geïsoleer, en het geblyk om geskik te wees as templaats-DNS vir SCAR-ontleding, EST-SSR-ontleding en AFLP-merkeropsoring. Ekstraksies is in triplikaat uitgevoer, en ekstrakte wat hoë opbrengs DNS gelewer het is gebruik. Die DNS-konsentrasies van die ekstrakte wat gebruik is asook hul absorpsieverhoudings (260/280 en 260/230) word in Tabel 3.1 verskaf.

Tabel 3.1 Resultate van gDNS ekstraksies

Genotipe	DNS konsentrasie (ng/ μ L)	260/280 Absorpsie	260/230 Absorpsie
Rex	2459.94	2.02	2.22
<i>Th. distichum</i>	1550.39	1.92	2.16
96M2	3402.72	2.05	2.22
79S15A	1104.88	1.92	2.31
DH544-18	1591.68	1.93	2.05
DH544-19	1799.99	2.00	2.24
W1411	1477.13	2.03	2.14
W1412	1248.46	1.97	2.14
W1413	2677.57	2.05	2.22
W1414	1630.56	2.03	2.15
W1415	2369.73	2.06	2.22
W1416	3419.08	1.94	2.00
W1417	468.05	1.90	2.19
W1422 ¹	3233.16	2.04	2.21
W1421-3 ¹	2659.74	1.94	2.24
2 β 37 ¹	3394.43	1.91	2.15

¹ Let wel genotipes W1422, W1421-3 en 2 β 37 het gesegegreer vir onderskeidelik die 3J₁^dS- en 3J₁^dL-translokasies en die 2J₁^d β -chromosoom. Geskikte plante is eers met SCAR-merkers geselekteer binne elke populasie (sien afdeling 3.2).

‘n 260/280 Absorpsie-verhouding hoër as 1.8 is beskou as ‘n aanduiding dat die DNS vry van proteïene kontaminasie is. ‘n 260/280 Absorpsie-verhouding hoër as 2.0 dui soms aan dat daar kontaminante, soos fenol of oormatige hoeveelhede RNS, in die monsters teenwoordig is. Sommige van die DNS-monsters in Tabel 3.1 het wel 260/280 absorpsie-verhoudings hoër as 2.0, maar oorskry die verhouding met ses-honderstes op die meeste. Hierdie data dui nie daarop dat daar oordadige residuele fenol of RNS voorkom nie. Die 260/230 absorpsieverhouding is ‘n tweede meting van DNS-monsters se suiwerheid. Hierdie verhouding is gewoonlik hoër as die 260/280 verhouding en waardes wissel meesal tussen 1.8 en 2.2. Verhoudings laer as 1.8 dui gewoonlik op ‘n hoë vlak van addisionele kontaminante, en dus word dit algemeen aanvaar dat hoe hoër die 260/230 absorpsiewaarde is, hoe suiwerder die

DNS. Elektroforese van die DNS-monsters op agarose toetsgels het getoon dat degradering van die DNS nie plaasgevind het nie, en dus was die genomiese DNS betreklik intakt. Die gDNS van die genotipe paneel (Tabel 3.1) wat as templaats-DNS vir EST-SSR-ontleding en AFLP-merkeropsporing gebruik is, was dus geskik vir genoemde doeleindes.

3.2 Merker-gebaseerde seleksie van plantmateriaal vir merker-ontwikkeling

‘n Aantal F_2 lyne wat vermoedelik segregeer het vir die $2J_1^d\beta$ chromosoom, $3J_1^dS$ - en $3J_1^dL$ translokasies is onderskeidelik gesif (PKR) met inleiers UST1- $2J_1^d$, UST5- $3J_1^dL$ en UST8- $3J_1^dS$. ‘n Enkele plant is vir die addisie chromosoom en vir elke translokasie geïdentifiseer, en is verder gebruik as toetsgenotipes vir EST-SSR- en AFLP-merker opsporing. Die gelfotos van die PKR-identifikasie van die betrokke plante word in Fig. 3.1 verskaf.

Slegs een (plant 133) van veertien $2\beta 37$ plante (7.1 %) het vir die monosomiese addisie $2J_1^d\beta$ chromosoom gesegregeer, en DNS van hierdie plant is gebruik vir EST-SSR-ontleding en AFLP-merkeropsporing. Die lae voorkoms van positiewe plante kon verwag word omdat ‘n ongepaarde vreemde addisiechromosoom ‘n hoë geneigdheid toon om gedurende meiose verlore te gaan (Evans en Jenkins, 1960; Islam *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1982). Onder nege W1422 plante was daar sewe (77.8 %) draers van die $3J_1^dS$ -translokasie (plante 101, 102, 122, 123, 145, 146 en 147). Vir veiligheidsonthalwe is die betrokke PKR weer herhaal, en dieselfde resultaat is verkry. Hoewel slegs ‘n klein plantmonster getoets is, blyk dit dus dat die translokasiechromosoom waarskynlik normale 3:1 F_2 -segregasie getoon het ($P_{[3:1]} = 0.92$). DNS van plant 101 is vervolgens gebruik vir EST-SSR-ontleding en AFLP-merkeropsporing. Uit elf W1421-3 plante het vier (36.4 %) vir die $3J_1^dL$ -translokasie gesegregeer. Twee van die reaksies (lane 2 en 6) het egter swak amplifikasie getoon terwyl nog twee (plante 127 en 144) duidelik as draers vir die $3J_1^dL$ -translokasie geïdentifiseer kon word. Die DNS van plant 127 is gebruik vir EST-SSR-ontleding en AFLP-merkeropsporing. Nog vyftien plante uit ‘n tweede F_2 -populasie (W1421-1) is ook gesif vir die $3J_1^dL$ -translokasie, maar nie een plant kon as draer geïdentifiseer word nie (gelfoto nie ingesluit in Fig. 3.1 nie), dus is die ware oordrag van die $3J_1^dL$ -translokasie eerder 15.4 %. Laasgenoemde syfer is aansienlik laer ($P_{[3:1]} = 0.0005$) as die 75 % wat verwag word vir normale Mendeliese segregasie en dui daarop dat die translokasie teen laer as verwagte tempo deur die gamete oorgedra word. Een moontlike

rede hiervoor is dat die translokasie die lewenskragtigheid van die gamete/sigote mag benadeel.

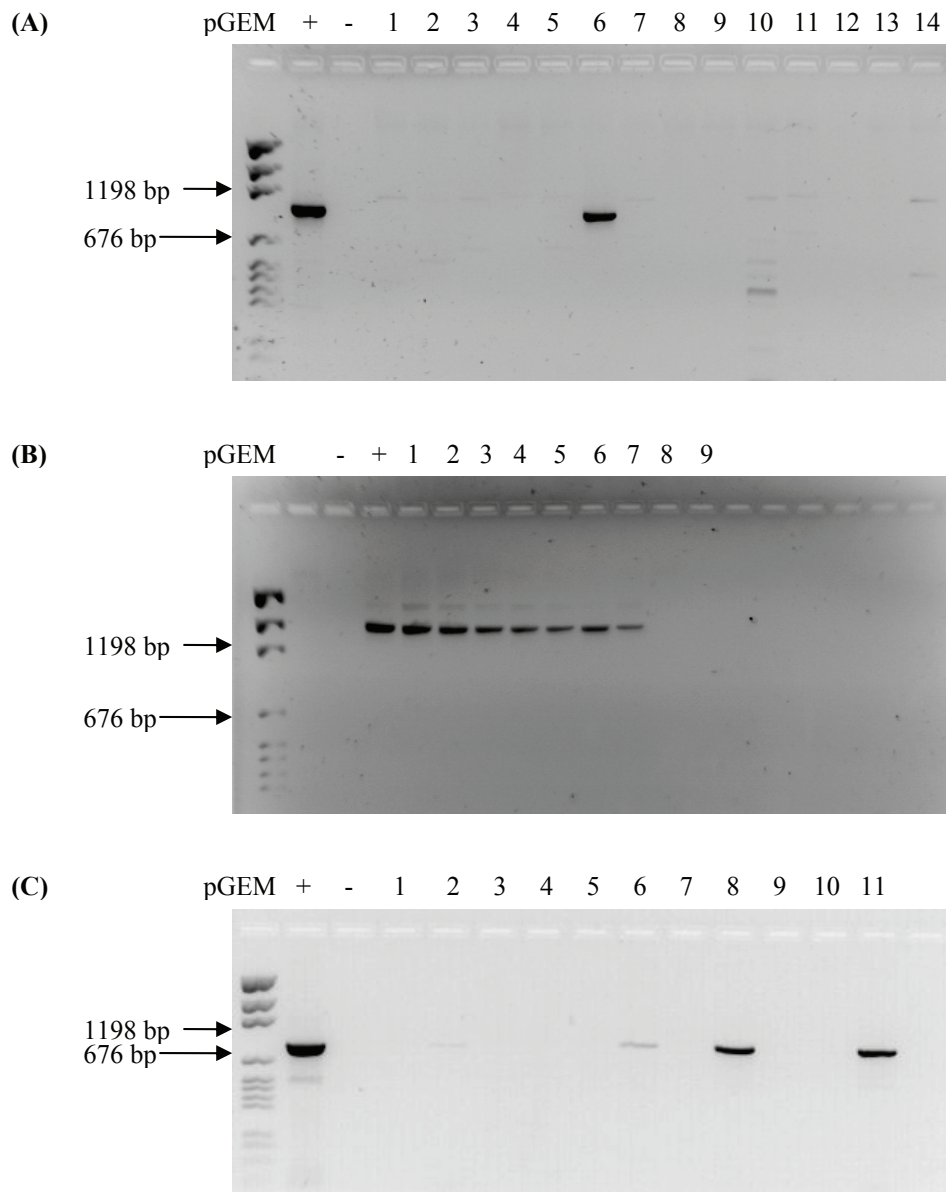


Fig. 3.1 PKR-sifting van plante wat onderskeidelik segregeer vir die $2J_1^d\beta$ -chromosoom, $3J_1^dS$ -en $3J_1^dL$ -translokasies: (A) Seleksie van $2J_1^d\beta$ -segregerende plante met inleier UST1- $2J_1^d$. Plant 133 (laan 6) was 'n draer van die $2J_1^d\beta$ -chromosoom; (B) Seleksie van plante wat segregeer het vir $3J_1^dS$ -translokasie met inleier UST8- $3J_1^dS$. Plant 101 (laan 1) het positief getoets; (C) Seleksie van plante wat segregeer het vir die $3J_1^dL$ -translokasie met inleier UST5- $3J_1^dL$. Plant 127 (laan 8) is een van twee plante wat duidelik positief getoets het vir die $3J_1^dL$ -translokasie. Plante wat positief getoets het is gebruik in genotipe paneel (Tabel 2.1 & Tabel 3.1)

3.3 *Th. distichum*-spesifieke EST-SSR merkers

Mikrosatelliet PKR-produkte is eers op 'n agarose toetsgel ge-elektroforeer om te toets vir suksesvolle amplifikasie, voordat dit op 'n 6 % poli-akriëlamied volgordebepalingsgel geskei

is. 'n Voorbeeld van so 'n agarose toetsgel en sy ooreenstemmende mikrosatellietgel word in Fig. 3.2 verskaf.

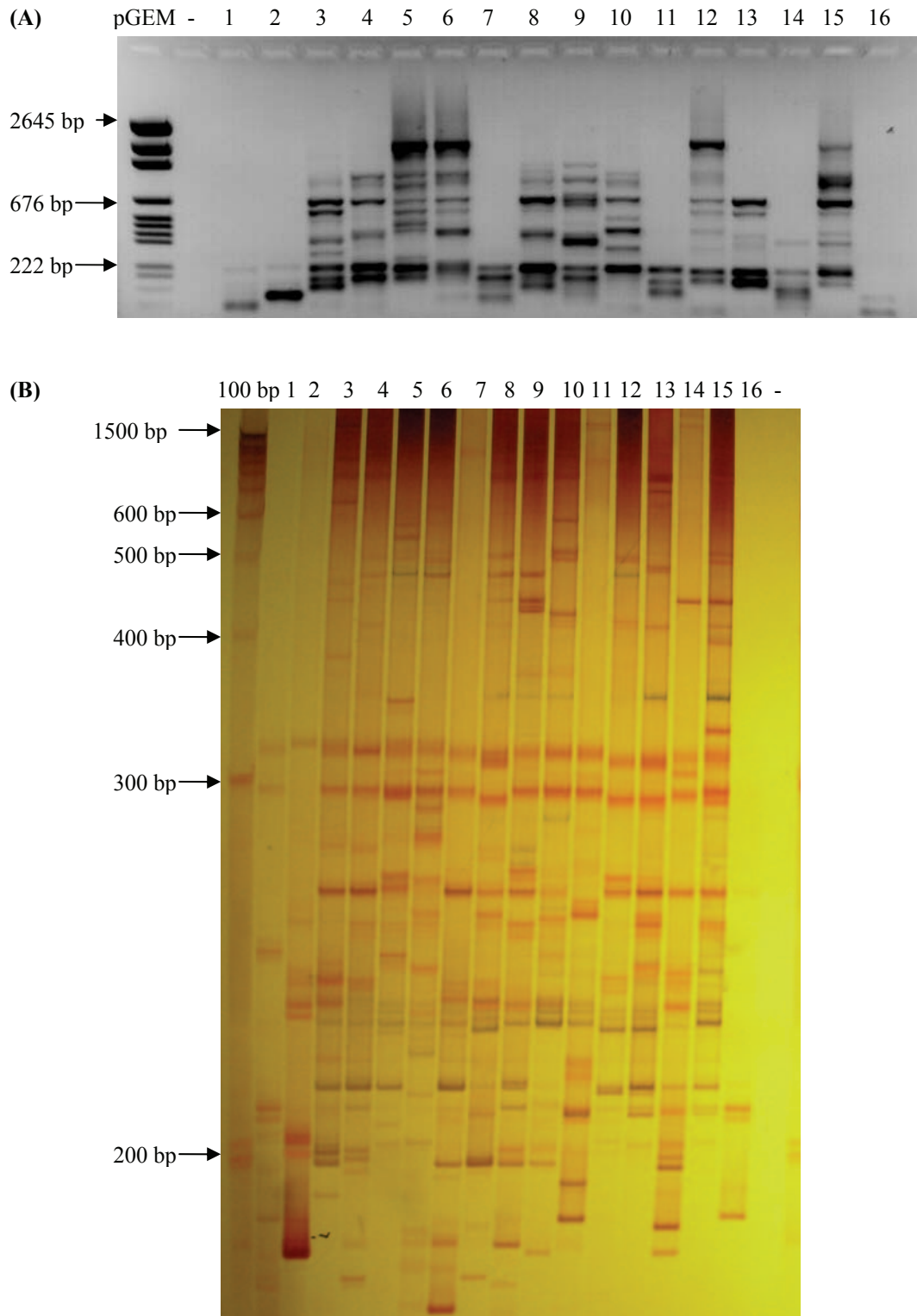


Fig. 3.2 'n Voorbeeld van mikrosatelliete wat ge-amplifiseer is met inleier cfe67 en eers geskei is op 'n agarose toetsgel (A), en daarna op 'n 6 % poliakriëlamied volgordebepalingsgel (B). In albei fotos is lane 1 tot 16 gelaai met die genotipes wat gebruik is vir merkerontwikkeling (sien Tabel 2.1). (A) Die agarose toetsgel is gelaai met 'n pGEM DNS-merker-leer. (B) Die poli-akriëlamied gel is gelaai met 'n 100 bp DNS-leer.

Amplifikasie met die 13 EST-SSR inleiers het slegs vier (30.8 % van die inleiers) mikrosatelliet-fragmente opgelewer wat met spesifieke *Th. distichum* chromosome geassosieer het. Slegs een hiervan het met 'n teikenchromosoom geassosieer. Onder die merkers was daar twee vir chromosoom 4J₂^d, een vir chromosoom 5J₁^d en een vir chromosoom 7J₂^d. Die relevante inligting aangaande die vier merkers word in Tabel 3.2 opgesom, en die visualiserings van die betrokke fragmente op die ooreenstemmende mikrosatellietgel word in Fig. 3.3 verskaf.

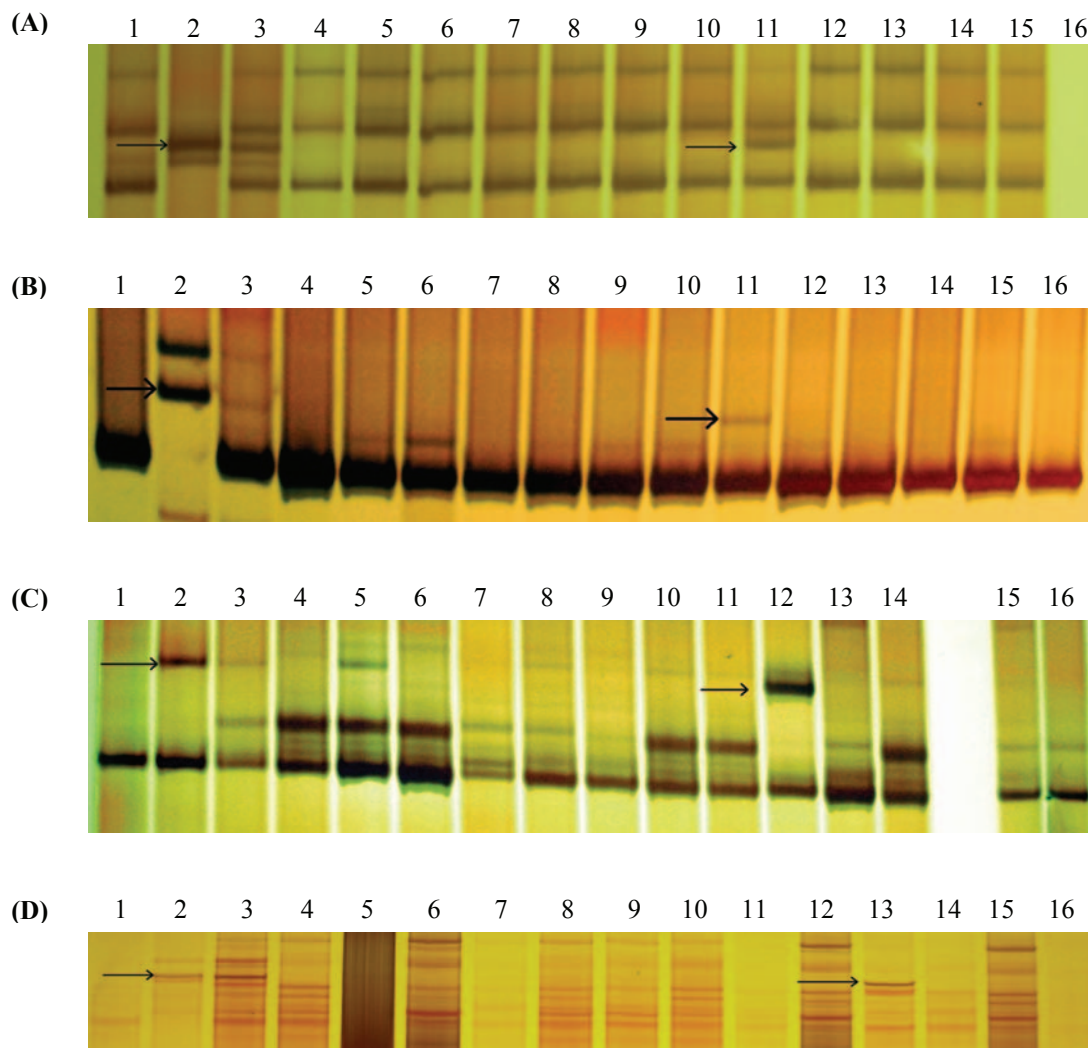


Fig. 3.3 Mikrosatellietgel-fotos van *Th. distichum*-spesifieke EST-SSR merkers: (A) inleier cfe34-gegenereerde merker vir chromosoom 4J₂^d; (B) inleier cfe37-gegenereerde merker vir chromosoom 4J₂^d; (C) inleier cfe159-gegenereerde merker vir chromosoom 5J₁^d; (D) inleier cfe229-gegenereerde merker vir chromosoom 7J₂^d. Lane 1 tot 16 bevat die volgende: Laan 1 – Rex; Laan 2 – *Th. distichum*; Laan 3 – 96M2; Laan 4 – 79S15A; Laan 5 – DH544-18; Laan 6 – DH544-19; Laan 7 – W1411; Laan 8 – W1412; Laan 9 – W1413; Laan 10 – W1414; Laan 11 – W1415; Laan 12 – W1416; Laan 13 – W1417; Laan 14 – W1422; Laan 15 – W1421-3; Laan 16 – 2β37.

Tabel 3.2 Besonderhede van vier oënskynlik *Th. distichum*-spesifieke EST-SSR merkers.

EST-SSR inleier	<i>Th. distichum</i> chromosoomligging	Fragmentgrootte (bp)	Fig. 3.3 verwysing
cfe34	4J ₂ ^d	224	3.3 (A)
cfe37	4J ₂ ^d	±120	3.3 (B)
cfe159	5J ₁ ^d	±120	3.3 (C)
cfe229	7J ₂ ^d	>>1500	3.3 (D)

Die groottebepaling van die mikrosatelliet-fragmente was problematies. Die 100 bp DNS-Promega-leer het abnormale skeiding getoon. Bande van elke bepaalde grootte het in twee of meer fragmente geskei, wat dit moeilik gemaak het om fragmentgrootte te tipeer. Die enigste EST-SSR merker waarvan die fragmentgrootte akkuraat bepaal kon word is geproduseer deur inleier cfe34 (Fig. 3.3; D). Die grootte van hierdie fragment is 224 bp (identies aan cfe34 merker vir 4BL ontwikkel deur Zhang *et al.*, 2007; sien Tabel 2.4), en is bepaal met behulp van 'n pGEM-DNS-leer op 'n agarose gel. Skattings van die ander drie EST-SSR merkers (Fig. 3.3; A, B, C) se fragmentgrootte is gemaak.

Van die 13 EST-SSR mikrosatelliet inleiers wat gebruik is het 12 (92.3 %) suksesvolle PKR-amplifikasie van die genotipe paneel tot gevolg gehad. Die enigste inleier wat geen PKR-amplifikasie getoon het nie was inleier cfe53. Tien van die mikrosatelliet-inleiers het elk ten minste een *Thinopyrum*-spesifieke PKR-produk opgelewer. Die drie inleiers wat nie spesie-spesifieke mikrosatelliete in *Thinopyrum* kon amplifiseer nie was cfe13, cfe53 en cfe197. Indien die oordraagbaarheid van 'n EST-SSR mikrosatelliet breedweg gedefinieer word (soos deur Zhang *et al.*, 2005) as die vermoë om 'n spesie-spesifieke produk in die tweede spesie te amplifiseer, kan oordraagbaarheid van die getoetsde mikrosatelliete na *Thinopyrum* dus as 76.9 % geraam word. Hierdie persentasie is aansienlik hoër as die EST-SSR oordraagbaarheids persentasie vir *Agropyron elongatum* (55.8 %), 'n nabyverwante spesie aan *Thinopyrum*, soos bepaal deur Zhang *et al.* (2005). Hierdie is te verwagte aangesien die mikrosatelliet-inleiers wat in hierdie studie gebruik is, juis geselekteer is op grond van goeie oordraagbaarheid na onverwante spesies.

Die dertien EST-SSR inleierstelle is oorspronklik gekies op grond daarvan dat hulle loci op broodkoring chromosome wat tot homoeoloë groepe 2, 4 en 5 behoort, herken. Die produkte van slegs vier van daardie EST-SSR inleierstelle (Tabel 3.2) wat spesie-spesifieke bande geproduseer het kon egter aan *Thinopyrum* chromosome toegeken word. Al vier inleierstelle is aanvanklik gekies op grond daarvan dat hulle chromosoom 5-spesifieke bande in broodkoring amplifiseer (cfe34 het egter ook 'n 4BL band geamplifiseer). Slegs een van die

vier inleierstelle (cfe159) het egter 'n *Thinopyrum* 5J₁^d-spesifieke band opgelewer terwyl cfe34 'n 4J₂^d-spesifieke band opgelewer het. Die waarneming kan waarskynlik verklaar word aan die hand daarvan dat die totale poli-akrielamied-gel profiele (Figure 3.2 en 3.3) van die EST-SSR inleiers baie kompleks is en dat elke inleierstel waarskynlik verdere loci op verskillende chromosome amplifiseer vanweë die kompleksiteit van die genome. Indien oordraagbaarheid van 'n EST-SSR dus eerder gedefinieer sou word as die vermoë om 'n spesie-spesifieke band geassosieer met 'n homoeolokus in 'n tweede spesie op te spoor, is die oordraagbaarheid betreklik laag, naamlik 15.4 %.

Die enkele nuttige EST-SSR mikrosatelliet-merker wat vir 5J₁^d gevind is, kan as 'n handige molekulêre merker dien waarmee getoets kan word vir die teenwoordigheid van die *Th. distichum* 5J₁^d-chromosoom, en kan uiteindelik ook gebruik word in MAS vir soutverdraagsaamheid. Die PCR-amplifikasie van mikrosatelliete gevolg deur elektroforese op 'n volgordebepalingsgel en gepaardgaande visualisering is egter tydrowend, duur en arbeidsintensief indien daar met 'n groot aantal monsters gewerk word. 'n Poging is gevolglik aangewend om hierdie unieke mikrosatelliet te omskep in 'n SCAR merker-tipe. Die 5J₁^d-spesifieke EST-SSR produk wat met inleierstel cfe159 ge-amplifiseer is (Fig. 3.3; C) is daarom deur Bester en Marais (2008, persoonlike mededeling) gekloneer. Die fragment se DNS-volgorde is bepaal en alhoewel verskeie PCR-inleierstelle hieruit ontwerp is het almal altyd dieselfde grootte fragment in elke monster (positiewe en negatiewe kontroles) op die toetspaneel ge-amplifiseer. Die teikenvolgorde blyk dus gekonserveerd te wees oor genusgrense (*Triticum*, *Secale* en *Thinopyrum*), wat PCR merkerontwikkeling bemoeilik. Die chromosoom 4J₂^d-spesifieke fragment (gegenereer met inleierstel cfe34, Fig. 3.3; A) kon daarenteen geredelik omgeskakel word na 'n PCR-gebaseerde SCAR-merker (Bester en Marais 2008, persoonlike medeling).

Opsommend kan dus gesê word dat die gebruik van spesie-oordraagbare EST-SSR mikrosatelliete as potensiële bron van *Thinopyrum* chromosoom-spesifieke merkers teleurgestel het. Eerstens, is daar slegs 'n lae frekwensie van inleierstelle wat wel spesie-spesifieke polimorfismes in die vier *Thinopyrum* teikenchromosome ge-amplifiseer het. Tweedens, veroorsaak die kompleksiteit van die fragmente geenereer per inleierkombinasie dat die oorgrootte meerderheid van geamplifiseerde loci anoniem bly. Dit is dus nie moontlik om afleidings aangaande homologie te maak nie en ook nie om sulke loci as posisionele anker-merkers vir kartering te gebruik nie. Derdens, kon die 5J₁^d-spesifieke fragment nie na 'n

PKR-gebaseerde merker omgeskakel word nie. Daar was ekstensief gepoog om PKR-kondisies en reaksies te optimiseer, maar ongelukkig sonder sukses (Bester en Marais 2008, persoonlike mededeling). Die nukleotiedvolgorde van hierdie fragment was ondersoek, maar geen mikrosatelliet-herhalings kon opgespoor word nie. Dit dui aan dat die fragment in werklikheid nie 'n EST-SSR was nie, en moontlik 'n fragment is wat lukraak deur die betrokke inleierpaar geamplifiseer is.

3.4 AFLP-merker ontwikkeling

Produkte van alle AFLP restriksie-ligasie- en pre-selektiewe amplifikasie-reaksies wat met beide *EcoRI/MseI* en *Sse8387I/MseI* kombinasies gegenereer is, is eers op agarose toetsgels geskei om vas te stel of die reaksies suksesvol was. Voorbeelde van suksesvolle *EcoRI/MseI* restriksie-ligasie (wat gekenmerk word deur 'n baie ligte smeer vergeleke met die negatiewe reaksie) en pre-amplifikasie reaksies (wat gekenmerk word deur 'n donker smeer en/of bande tussen 100-600 bp) word in Fig. 3.4 verskaf.

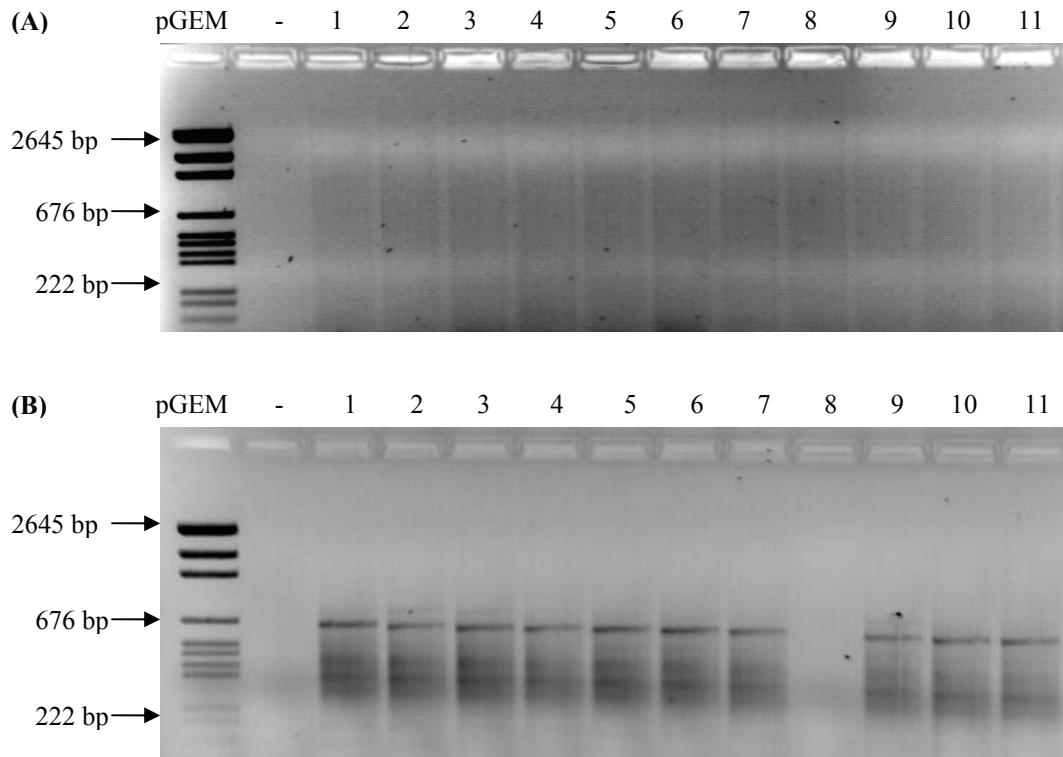


Fig. 3.4 Fotos van suksesvolle *EcoRI/MseI* restriksie-ligasie- en preselektiewe amplifikasie-reaksies: (A) Restriksie-ligasie reaksie toetsgel. Lane 1 tot 11 bevat die produkte van restriksie-ligasie reaksies; (B) Preselektiewe amplifikasie-reaksie toetsgel. Lane 1 tot 11 bevat preselektiewe amplifikasie-produkte. In laan 8 is 'n onsuksesvolle pre-amplifikasie reaksie.

Die 60 *EcoRI/MseI* selektiewe inleier-kombinasies het 'n totaal van 1642 onderskeibare fragmente ge-amplifiseer vanaf die plantmateriaal wat vir AFLP-merkeropsoring gebruik is (Tabel 2.1). Hieruit is 146 fragmente (8.89 %) geïdentifiseer as moontlike *Th. distichum*-spesifieke AFLP-merkers. Die fragmentgroottes het gewissel tussen 100 en 500 basispare. *Thinopyrum*-spesifieke AFLP-merkers is geïdentifiseer as fragmente wat teenwoordig was in *Th. distichum*, die 96M2 amfiploïed, en 'n tersaaklike addisielyn, maar wat nie in Rex voorgekom het nie. Elektroferogramme wat deur Genemapper® geskep is (voorbeeld in Fig. 3.5), is visueel ondersoek om die fragmente te evalueer.

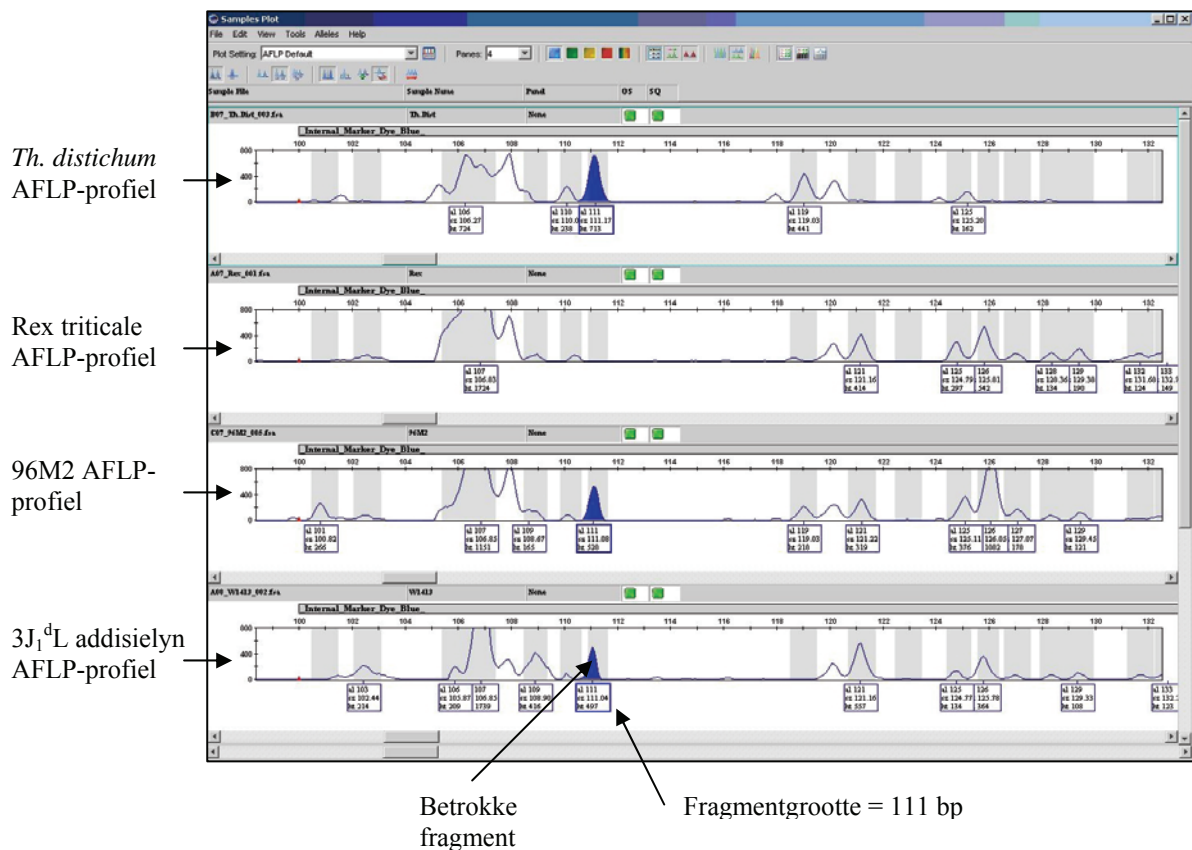


Fig. 3.5 Voorbeeld van 'n elektroferogram wat deur Genemapper® geskep is en wat gebruik is om AFLP-merkers te identifiseer. Duidelik kom die betrokke fragment (in blou) slegs voor in *Th. distichum*, die 96M2 amfiploïed en die 3J₁^dL addisielyn, maar nie in Rex triticales nie. Die fragment kan dus beskou word as 'n potensieel-nuttige *Thinopyrum*-spesifieke AFLP-merker.

Die 1642 AFLP-fragmente wat deur die 60 *EcoRI/MseI* selektiewe inleier-kombinasies geamplifiseer is aansienlik minder in vergelyking met die studies van Zhang *et al.* (2002) en Wang *et al.* (2003). Zhang *et al.* (2002) het gefokus op die molekulêre en sitogenetiese karakterisering van *Th. bessarabicum* chromosome, en hulle het daarin geslaag om 3545

fragmente met slegs 32 *EcoRI/MseI* selektiewe inleier-kombinasies te amplifiseer, teen 'n gemiddelde amplifikasie-frekwensie van 111 fragmente per selektiewe inleier-kombinasie. In hierdie studie kon 'n amplifikasie-frekwensie van slegs 27 fragmente per selektiewe inleier-kombinasie gehaal word. Een rede hiervoor mag wees dat *Th. bessarabicum* eenvoudig net meer AFLP-fragmente lewer as *Th. distichum*. Zhang *et al.* (2002) het egter ook verskillende kriteria vir die identifisering van fragmente gebruik. Hulle het byvoorbeeld fragmente tussen 50 bp en 500 bp oorweeg as potensiële AFLP-merkers, terwyl hierdie studie slegs fragmente tussen 100 bp en 500 bp oorweeg het. Die derde rede mag wees dat selektiewe inleiers wat deur Zhang *et al.* (2002) gebruik is, bloot meer amplifikasie-produkte opgelewer het. Wang *et al.* (2003) het AFLP-analise gebruik om die oordrag van *Th. junceum* genetiese materiaal na koringlyne te monitor. Hulle het in totaal 3146 fragmente geamplifiseer met 48 *EcoRI/MseI* selektiewe inleier-kombinasies, teen 'n gemiddelde van 66 fragmente per selektiewe inleier-kombinasie. Wang *et al.* (2003) het ook fragmente kleiner as 100 bp oorweeg as AFLP-merkers. *Thinopyrum junceum* is heksaploïed ($2n = 6x = 42: E^bE^bE^bE^bE^cE^c$) (Liu en Wang, 1993) terwyl *Th. distichum* tetraploïed is ($2n = 4x = 28: J_1^dJ_1^dJ_2^dJ_2^d$). Aangesien *Th. junceum* se genoom een-en-'n-half keer so groot (en daarom waarskynlik meer divers) is as dié van *Th. distichum*, kan verwag word dat selektiewe inleiers meer AFLP-fragmente sal genereer in *Th. junceum*. Die Genemapper® sagteware wat gebruik is vir die opsporing van die AFLP-fragmente in hierdie studie funksioneer waarskynlik ook nie optimaal nie. By verskeie geleenthede kon fragmente, wat deur die programmatuur uitgelaat is, opgespoor en bygevoeg word na visuele ondersoek van die elektroferogramme. Dit is dus aan te beveel dat benewens die gebruik van die programmatuur, alle elektroferogramme ook visueel ondersoek word om te verseker dat alle fragmente wel (en korrek) geïdentifiseer is.

Die *Sse8387I/MseI* AFLP-reaksies het teleurstellende resultate opgelewer. Slegs twee (*Sse8387I*-AGG & *MseI*-AC; *Sse8387I*-AGG & *MseI*-AG) van die 18 selektiewe inleier-kombinasies wat getoets is het suksesvolle amplifikasie gelewer. In lig van die lae suksestempo en die kostes verbonde aan AFLP-analise is geen verdere *Sse8387I/MseI* inleier-kombinasies gebruik nie. Die twee bruikbare inleierkombinasies het 'n totaal van 315 fragmente ge-amplifiseer, waarvan 13 fragmente (4.13 %) geblyk het om *Th. distichum*-spesifiek te wees. Daar is gepoog om die mislukte *Sse8387I/MseI* AFLP-reaksies verder te optimiseer vir fluoressensie-gebaseerde semi-geoutomatiseerde ontleding. Die *Sse8387I/MseI* AFLP-reaksies is voorheen bewys om goeie resultate te lewer indien outoradiografie as visualiseringsmetode gebruik word (Groenewald *et al.*, 2005). Dus is daar aanvanklik

hoofsaaklik vanaf laasgenoemde protokol gewerk vir die uitvoering van die *Sse8387I/MseI* AFLP reaksies. In ‘n poging om die tegniek te bestendig is daar egter later begin om die *Sse8387I/MseI* AFLP-reaksies eerder volgens die ‘Plant Mapping Kit’ van Applied Biosystems uit te voer en om die onderskeie entstukke en pre-selektiewe inleiers op te los in ‘Milli-Q’ H₂O eerder as TE_{0.1}-buffer (soos aanbeveel deur die vervaardigers van die entstukke, pre-selektiewe en selektiewe inleiers). Hierna het twee van die *Sse8387I/MseI* selektiewe inleier-kombinasies wel ge-amplifiseer. Dit is dus moontlik dat die orige 16 selektiewe inleier kombinasies uiteindelik ook suksesvol mag amplifiseer na noukeurige optimisering van die individuele selektiewe PCR amplifikasie-stappe.

Uit die totaal van 1957 fragmente (beide *EcoRI/MseI* en *Sse8387I/MseI* amplifikasie-produkte) is 159 fragmente (8.12 % van die totale amplifikasie-produkte) geklassifiseer as uniek tot die J₁^d- en J₂^d-genome. Agt-en-dertig van hierdie fragmente (1.94 % van die totale amplifikasie-produkte) is met behulp van die beskikbare addisie- en translokasielyne toegewys aan ‘n enkele *Th. distichum* chromosoom. Omdat daar nie ‘n volledige stel van die 14 moontlike addisielyne beskikbaar was nie, kan daar nie met sekerheid gesê word watter fragmente ‘n chromosoom-unieke oorsprong het nie. Omdat die oordrag van soutverdraagsaamheidsgene fokus op die vier teikenchromosome is die merkers egter potensieël nuttig omdat die meeste daarvan wel uniek blyk te wees vir een van hierdie vier teikenchromosome. Die unieke enkel-chromosoom AFLP-merkers is vervolgens in twee groepe verdeel. Die eerste groep AFLP-merkers, is die kwalitatiewe merkers (waarvan daar 25 in totaal is), en word in Tabel 3.3 gelys. Hierdie merkers is van ‘n hoë gehalte (kan ondubbelsinnig geïdentifiseer word) en word gekenmerk deur die totale afwesigheid van ‘n amplifikasieprodukt in die negatiewe kontrole (Rex triticale).

Tabel 3.3 Kwalitatiewe unieke enkel-chromosoom AFLP-merkers

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosoom	Fragment-grootte (bp)	Inleier-kombinasie	Elektroferogram visualisering
E32M15.209	2J ₁ ^{dβ}	209	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CA	
E32M21.105	2J ₁ ^d	105	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -GG	

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosoom	Fragment-grootte (bp)	Inleier-kombinatie	Elektroferogram visualisering
E32M21.237	3J ₁ ^d S	237	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-GG	
E32M47.153	3J ₁ ^d S	153	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CAA	
E32M49.124	4J ₂ ^d	124	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CAG	
E32M49.125	2J ₁ ^d	125	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CAG	
E32M49.144	5J ₁ ^d	144	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CAG	
E32M60.177	3J ₁ ^d L	177	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CTC	
E35M15.220	2J ₁ ^d β	220	<i>Eco</i> RI-ACA & <i>Mse</i> I-CA	
E35M18.331	4J ₂ ^d	331	<i>Eco</i> RI-ACA & <i>Mse</i> I-CT	
E35M49.137	3J ₁ ^d S	137	<i>Eco</i> RI-ACA & <i>Mse</i> I-CAG	
E35M60.111	3J ₁ ^d L	111	<i>Eco</i> RI-ACA & <i>Mse</i> I-CTC	
E41M13.148	3J ₁ ^d L	148	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-AG	

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosoom	Fragment-grootte (bp)	Inleier-kombinatie	Elektroferogram visualisering
E41M17.125	7J ₂ ^d	125	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CG	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1417</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 125, sz 124.81, ht 673), Rex (nl 125, sz 124.78, ht 606), 96M2 (nl 125, sz 124.59, ht 134), W1417 (nl 125, sz 124.59, ht 134).</p>
E41M47.112	4J ₂ ^d	112	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CAA	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1415</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 112, sz 112.09, ht 265), Rex (nl 112, sz 112.09, ht 265), 96M2 (nl 112, sz 111.94, ht 140), W1415 (nl 112, sz 112.15, ht 120).</p>
E41M47.235	3J ₁ ^{dL}	235	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CAA	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1413</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 235, sz 234.29, ht 391), Rex (nl 235, sz 234.26, ht 229), 96M2 (nl 235, sz 234.26, ht 229), W1413 (nl 235, sz 234.36, ht 86).</p>
E41M49.103	2J ₁ ^d	103	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CAG	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1411</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 103, sz 103.05, ht 762), Rex (nl 103, sz 102.24, ht 361), 96M2 (nl 103, sz 103.06, ht 384), W1411 (nl 103, sz 103.02, ht 208).</p>
E41M49.121	5J ₁ ^d	121	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CAG	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1416</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 121, sz 120.56, ht 396), Rex (nl 121, sz 120.70, ht 222), 96M2 (nl 121, sz 120.70, ht 222), W1416 (nl 121, sz 120.57, ht 154).</p>
E41M49.131	2J ₁ ^d	131	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CAG	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1411</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 131, sz 130.63, ht 132), Rex (nl 131, sz 130.79, ht 72), 96M2 (nl 131, sz 130.79, ht 72), W1411 (nl 131, sz 131.24, ht 105).</p>
E41M49.188	3J ₁ ^{dL}	188	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CAG	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1413</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 188, sz 188.17, ht 122), Rex (nl 188, sz 188.17, ht 122), 96M2 (nl 188, sz 187.98, ht 72), W1413 (nl 188, sz 187.95, ht 135).</p>
E41M62.132	7J ₂ ^d	132	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CTT	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1417</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 132, sz 132.09, ht 464), Rex (nl 132, sz 132.09, ht 464), 96M2 (nl 132, sz 132.08, ht 193), W1417 (nl 132, sz 132.13, ht 170).</p>
E41M62.133	7J ₂ ^d	133	<i>Eco</i> RI-AGG & <i>Mse</i> I-CTT	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1417</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 133, sz 133.12, ht 1144), Rex (nl 133, sz 133.12, ht 1144), 96M2 (nl 133, sz 133.12, ht 290), W1417 (nl 133, sz 133.16, ht 255).</p>
S29M12.112	2J ₁ ^d	112	<i>Sse</i> 8387I-AGG & <i>Mse</i> I-AC	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1411</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 112, sz 111.41, ht 153), Rex (nl 112, sz 111.41, ht 153), 96M2 (nl 112, sz 111.53, ht 41), W1411 (nl 112, sz 111.52, ht 193).</p>
S29M12.127	4J ₁ ^d	127	<i>Sse</i> 8387I-AGG & <i>Mse</i> I-AC	<p><i>Th. distichum</i> Rex 96M2 W1414</p> <p>Peak data: <i>Th. distichum</i> (nl 127, sz 127.15, ht 292), Rex (nl 127, sz 127.15, ht 292), 96M2 (nl 127, sz 126.97, ht 1552), W1414 (nl 127, sz 127.02, ht 678).</p>

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosoom	Fragment-grootte (bp)	Inleier-kombinasie	Elektroferogram visualisering
S29M12.141	3J ₁ ^{dL}	141	<i>Sse</i> 8387I-AGG & <i>Mse</i> I-AC	

Vanuit Tabel 3.3 kan gesien word dat twee AFLP-merkers, naamlik E32M15.209 en E35M15.220, verkry is wat met die 2J₁^{dβ} chromosoom geassosieer is maar nie met die gewone *Th. distichum* chromosoom 2J₁^d nie. Daar word vermoed dat 2J₁^{dβ} ontstaan het as gevolg van homoeoloë rekombinasie waartydens die terminale gedeelte van 2J₁^{dL} verplaas is met chromatien vanaf 2J₂^{dL}. Die vermoede is gebaseer op die waarneming dat lyn 2β37 slegs bibrachiale chromosome besit en dat dit nie die SCAR-lokus *Xust4* wat op 2J₁^{dL} voorkom uitdruk nie (Marais 2008, persoonlike mededeling). Die huidige waarneming sinspeel daarop dat die verandering in chromosoom 2J₁^{dβ} nie die gevolg van ‘n delesie is nie maar eerder veroorsaak is deur oorkruising met 2J₂^d óf ‘n translokasie-gebeurtenis.

Die tweede groep unieke, enkel-chromosoom AFLP-merkers (waarvan daar 13 is), is kwantitatief van aard en word in Tabel 3.4 opgesom. Hierdie AFLP-merkers is van ‘n laer gehalte. Hulle het wel ‘n amplifikasieprodukt in die negatiewe kontrole getoon, maar fluoressensie (piekhoogte) was so laag dat GeneMapper® v.3.0 sagteware dit nie as fragmente registreer nie.

Tabel 3.4 Kwantitatiewe unieke enkel-chromosoom AFLP-merkers

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosoom	Fragment-grootte (bp)	Inleier-kombinasie	Elektroferogram visualisering
E32M16.126	3J ₁ ^{dL}	126	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CC	
E32M47.118	3J ₁ ^{dL}	118	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CAA	
E32M49.118	2J ₁ ^d	118	<i>Eco</i> RI-AAC & <i>Mse</i> I-CAG	

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosoom	Fragment-grootte (bp)	Inleier-kombinasie	Elektroferogram visualisering
E32M49.129	3J ₁ ^d	129	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG	
E35M12.155	3J ₁ ^d	155	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AC	
E35M17.113	3J ₁ ^{dL}	113	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CG	
E35M47.120	7J ₂ ^d	120	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAA	
E35M47.162	4J ₂ ^d	162	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAA	
E41M11.127	3J ₁ ^{dS}	127	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AA	
E41M11.139	4J ₂ ^d	139	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AA	
E41M14.110	7J ₂ ^d	110	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AT	
E41M22.112	2J ₁ ^d	112	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -GT	
S29M12.133	4J ₂ ^d	133	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC	

Die waargenome *Th. distichum*-spesifieke AFLP-fragmente wat 8.12 % van die totale amplifikasie-produkte uitmaak stem ooreen met die resultate van Zhang *et al.* (2002). In hul

studie het 10.9 % van die AFLP-produkte geblyk om *Th. bessarabicum*-spesifiek te wees. Slegs 77 *Th. distichum*-spesifieke AFLP-fragmente (Tabelle 3.3, 3.4 en 3.5), wat 3.93 % van alle AFLP-amplifikasie-produkte verteenwoordig, kon egter tydens hierdie studie met behulp van die addisie- en translokasie-lyne aan *Thinopyrum* chromosome toegeken word. Hierdie persentasie stem weer ooreen met die studie van Wang *et al.* (2003) wat op soortgelyke wyse slegs 4.6 % van hul totale AFLP-amplifikasie-produkte aan spesifieke *Th. junceum* chromosome kon toeken.

In totaal was daar dus: sewe merkers vir chromosoom 2J₁^d; twee merkers vir chromosoom 2J₁^{dβ}; 15 merkers vir 3J₁^d; een merker vir 4J₁^d; ses merkers vir 4J₂^d; twee merkers vir 5J₁^d; en vyf merkers vir 7J₂^d gevind. Hierdie frekwensie van merkers vir *Th. distichum* chromosome is laer vergeleke met die bevindings van Zhang *et al.* (2002). Hulle het daarin geslaag om die volgende *Th. bessarabicum*-spesifieke AFLP-merkers op te spoor: 48 merkers vir chromosoom 1E^b; 67 merkers vir chromosoom 2E^b; 39 merkers vir chromosoom 4E^b; 59 vir chromosoom 5E^b; en 54 merkers vir 7E^b. Selfs met inagneming van die feit dat Zhang *et al.* (2002) drie keer meer AFLP-fragmente geamplifiseer het (en dat hierdie studie na slegs ses van die 14 *Th. distichum* chromosome gekyk het), sou mens steeds verwag het om meer AFLP-merkers vir chromosome 2J₁^d, 4J₁^d, 5J₁^d en 7J₁^d te vind. Dit is moontlik dat die verskil te wyte mag wees aan strengere seleksie-kriteria (fragmente tussen 100 - 500 bp versus 50 - 500 bp) vir die identifikasie van potensieële merkers in die huidige studie. Die onderskeid tussen kwalitatiewe en kwantitatiewe AFLP-merkers, soos voorheen gedefinieer is, is belangrik. Aangesien eersgenoemde ondubbelsinnig getipeer kan word, kan verwag word dat hierdie tipe AFLP-merker hoër herhaalbaarheid sal hê en meer geskik sal wees vir massasifting. Die gebruik van kwantitatiewe AFLP-merkers sal daarenteen hoër akkuraatheid ontleding (in terme van DNS gehalte en konsentrasies, reagens konsentrasies, reaksiekondisies ensovoorts) verg en behoort sover moontlik geoutomatiseer te word. Die gebruik van replisering/bevestiging van monsters of gereelde insluiting van bekende kontroles sou die voorspelbaarheid van kwantitatiewe merkers verder kon verhoog.

Van die 1957 fragmente wat ge-amplifiseer is, is 39 *Thinopyrum*-spesifieke fragmente (1.99 % van die totale amplifikasie-produkte) op twee of meer *Th. distichum* chromosome ge-amplifiseer. Hierdie merkers word in Tabel 3.5 verskaf. Fragment E32M48.209 is in al die *Thinopyrum*-chromosome en chromosoomsegmente wat getoets is, geamplifiseer. Dit mag dus 'n herhaalbare element soos 'n mikrosatelliet of transposonvolgorde wees wat uniek is aan

die spesie. Die volgorde behoort verder getipeer te word ten einde vas te stel hoe wydverspreid dit oor al die chromosome voorkom en tot watter mate dit gebruik sou kon word as 'n algemene indikator van die teenwoordigheid van *Th. distichum* chromatien. Die omskakeling van AFLP-merkers na PKR-gebaseerde SCAR-merkers is egter moeilik, vereis gespesialiseerde apparatuur asook duur reagense en het 'n lae sukses tempo (Shan *et al.*, 2000).

Tabel 3.5 AFLP-merkers wat op twee of meer *Th. distichum* chromosome voorkom

Merker ID	<i>Th. distichum</i> chromosome/segmente	Fragment-grootte (bp)	Inleier-kombinasie
E32M12.197	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	197	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AC
E32M13.105	4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 7J ₂ ^d	105	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AG
E32M15.311	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d	311	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CA
E32M47.263	4J ₂ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	263	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAA
E32M48.208	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d L, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 7J ₂ ^d	208	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAC
E32M48.209	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	209	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAC
E32M49.167	3J ₁ ^d , 4J ₁ ^d	167	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E35M12.143	3J ₁ ^d S, 4J ₂ ^d	143	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AC
E35M12.206	2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d , 3J ₁ ^d L, 4J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	206	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AC
E35M16.137	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	137	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CC
E35M18.167	3J ₁ ^d L, 5J ₁ ^d	167	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CT
E35M18.255	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d S, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	255	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CT
E35M18.330	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 7J ₂ ^d	330	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CT
E35M22.127	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 4J ₂ ^d , 7J ₂ ^d	127	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -GT
E35M47.163	3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 5J ₁ ^d	163	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAA
E35M47.190	3J ₁ ^d L, 4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	190	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAA
E35M47.255	3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S	255	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAA
E35M49.110	4J ₂ ^d , 5J ₁ ^d	110	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAG
E35M60.107	2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d S, 3J ₁ ^d L, 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	107	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CTC
E35M60.167	2J ₁ ^d β, 2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	167	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CTC
E41M11.124	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d L, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 7J ₂ ^d	124	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AA
E41M12.111	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d L	111	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
E41M12.116	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d	116	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
E41M14.222	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d L, 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	222	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AT
E41M17.159	3J ₁ ^d L, 7J ₂ ^d	159	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CG
E41M20.114	2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d	114	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GC
E41M21.259	3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 4J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	259	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GG
E41M21.398	3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	398	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GG
E41M22.125	3J ₁ ^d L, 7J ₂ ^d	125	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GT
E41M22.158	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 5J ₁ ^d	158	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GT
E41M47.228	3J ₁ ^d L, 4J ₂ ^d	228	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAA
E41M48.123	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d S, 7J ₂ ^d	123	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAC
E41M49.207	2J ₁ ^d , 3J ₁ ^d S, 3J ₁ ^d L, 4J ₁ ^d , 4J ₂ ^d , 5J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	207	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAG
E41M60.148	3J ₁ ^d L, 4J ₂ ^d	148	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CTC
E41M60.149	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^d β, 3J ₁ ^d L, 3J ₁ ^d S, 4J ₂ ^d	149	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CTC
S29M12.109	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d , 7J ₂ ^d	109	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.111	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d	111	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.115	3J ₁ ^d L, 4J ₂ ^d	115	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.152	4J ₁ ^d , 5J ₁ ^d	152	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC

Aangesien slegs ses van die 14 *Th. distichum* chromosome deur AFLP-analise gekarakteriseer is, kan daar geargumenteer word dat die aantal *Th. distichum*-spesifieke fragmente wat aan

chromosome toegewys kon word (Tabelle 3.3, 3.4 en 3.5) effens minder maar rofweg net so veel moet wees as die aantal *Th. distichum*-spesifieke fragmente wat nie aan ‘n spesifieke *Th. distichum* chromosoom toegewys kon word nie (Tabel 3.6). Die data dui aan dat dit wel die geval is, en dat die verhouding van toegekende *Th. distichum*-spesifieke AFLP-fragmente tot nie-toegekende *Th. distichum*-spesifieke AFLP-fragmente gelyk is aan 77: 82. Dit beteken dus dat die *Th. distichum*-spesifieke AFLP-fragmente waarskynlik eweredig oor die *Thinopyrum*-genoom versprei is.

Die 82 fragmente wat skynbaar uniek is aan *Th. distichum* (4.19 % van die totale amplifikasie-produkte) maar nie aan ‘n spesifieke *Th. distichum* chromosoom toegewys kon word nie, word in Tabel 3.6 getoon. Hierdie fragmente kom dus vermoedelik voor op die oorblywende *Th. distichum* chromosome wat nie as addisielyne in hierdie studie ingesluit is nie, en sal moontlik kan dien as merkers vir hierdie chromosome. Ten einde dit te bevestig sal verdere addisielyne vir *Th. distichum* chromosome 1J₁^d, 1J₂^d, 2J₂^d, 3J₂^d, 5J₂^d, 6J₁^d, 6J₂^d en 7J₁^d ontwikkel moet word. Hieruit sal ‘n genotipe paneel saamgestel moet word, wat positiewe en negatiewe kontroles insluit, en onderwerp word aan AFLP-analise om hul bruikbaarheid as AFLP-merkers te bevestig.

Tabel 3.6 AFLP-merkers met onbekende *Th. distichum* chromosoom-ligging

Merker ID	Fragmentgrootte (bp)	Inleier-kombinasie
E32M11.249	249	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AA
E32M11.310	310	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AA
E32M12.112	112	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AC
E32M12.154	154	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AC
E32M12.311	311	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AC
E32M13.150	150	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AG
E32M13.169	169	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AG
E32M13.282	282	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AG
E32M13.311	311	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -AG
E32M15.263	263	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CA
E32M16.273	273	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CC
E32M17.192	192	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CG
E32M17.282	282	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CG
E32M18.126	126	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CT
E32M19.310	310	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -GA
E32M21.106	106	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -GG
E32M22.117	117	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -GT
E32M47.128	128	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAA
E32M47.141	141	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAA
E32M47.310	310	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAA
E32M47.318	318	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAA
E32M49.112	112	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E32M49.120	120	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CAG
E32M60.102	102	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CTC
E32M60.168	168	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CTC

Merker ID	Fragmentgrootte (bp)	Inleier-kombinasie
E32M60.169	169	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CTC
E32M62.111	111	<i>EcoRI</i> -AAC & <i>MseI</i> -CTT
E35M11.129	129	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AA
E35M11.140	140	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AA
E35M11.141	141	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AA
E35M13.129	129	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AG
E35M14.128	128	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -AT
E35M16.155	155	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CC
E35M16.330	330	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CC
E35M16.418	418	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CC
E35M17.179	179	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CG
E35M18.120	120	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CT
E35M18.268	268	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CT
E35M19.329	329	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -GA
E35M20.120	120	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -GC
E35M49.100	100	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAG
E35M49.108	108	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAG
E35M49.148	148	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CAG
E35M60.119	119	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CTC
E35M60.137	137	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CTC
E35M61.106	106	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CTG
E35M62.129	129	<i>EcoRI</i> -ACA & <i>MseI</i> -CTT
E41M11.199	199	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AA
E41M12.103	103	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
E41M12.105	105	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
E41M12.195	195	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
E41M12.347	347	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
E41M13.101	101	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AG
E41M13.239	239	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AG
E41M13.285	285	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AG
E41M13.330	330	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AG
E41M14.159	159	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AT
E41M14.160	160	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AT
E41M14.194	194	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AT
E41M14.202	202	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AT
E41M14.203	203	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -AT
E41M16.117	117	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CC
E41M16.155	155	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CC
E41M17.204	204	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CG
E41M18.223	223	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CT
E41M19.140	140	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GA
E41M19.336	336	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GA
E41M20.107	107	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GC
E41M21.125	125	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GG
E41M22.118	118	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -GT
E41M47.181	181	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAA
E41M47.203	203	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAA
E41M47.236	236	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAA
E41M48.209	209	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAC
E41M60.117	117	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CTC
E41M60.118	118	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CTC
E41M60.138	138	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CTC
S29M12.148	148	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.155	155	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.189	189	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.216	216	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.254	254	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC

Al die merkers (Tabelle 3.3 en 3.4) behoort egter as potensiële (onbevestigde) merkers beskou te word totdat hulle behoorlik bevestig kan word. AFLP-merker opsporing het op 'n genotipe-paneel berus waarin elke *Thinopyrum*-chromosoom in slegs drie tot vyf lyne teenwoordig was. Dit skep die vraag of die genotipe-paneel groot genoeg was om konsekwent *Thinopyrum*-spesifieke fragmente waar te neem, en of die waargenome fragmente soms die resultaat van agtergrondsvariasie in individuele plante was? Die enigste manier om hierdie vraag te beantwoord is om 'n groter genotipe-paneel vir elke *Th. distichum* chromosoom te skep (byvoorbeeld F₂-plante uit kruisings met genotopies uiteenlopende ouers), en dit dan te sif met al die selektiewe inleier-kombinasies. So 'n poging sal egter baie tyd, arbeid en befondsing vereis, en was nie haalbaar in hierdie studie nie. Tweedens sou dit nodig wees om in enige toepassing van hierdie merkers die ouermateriaal as kontroles in te sluit ten einde te bevestig dat die alleel verantwoordelik vir intense amplifikasie nie ook op 'n chromosoom ander dan die *Thinopyrum* teiken-chromosoom voorkom nie.

Fluoresensie-gebaseerde, semi-geoutomatiseerde AFLP-analise is 'n uitstekende tegniek om 'n groot aantal monsters gelyktydig te sif met 'n aantal AFLP-merkers. 'n Enkele *EcoRI/MseI* selektiewe inleier-kombinasie *EcoRI*-AGG & *MseI*-CAG amplifiseer byvoorbeeld gelyktydig twee AFLP-merkers vir *Th. distichum* chromosoom 2J₁^d; een AFLP-merker vir 3J₁^d; en een AFLP-merker vir 5J₁^d. Met die vermoë van volgordebepalers om tussen verskillende fluorofore te onderskei, skep dit ook 'n geleentheid om tot drie selektiewe inleier-kombinasies gelyktydig te analiseer, wat die effektiwiteit van die tegniek verder verhoog. Die relatiewe gemak, veiligheid en spoed waarmee dit uitgevoer kan word, maak hierdie tipe analise 'n hoogs bruikbare molekulêre tegniek om merker-ontwikkeling, monster-sifting en MAS mee uit te voer.

3.5 Teenwoordigheid van *Th. distichum* chromatien in spilgenotipe 79S15A

Net vier van die *Th. distichum*-spesifieke AFLP-fragmente is in die spilgenotipe 79S15A geamplifiseer. Dit verteenwoordig slegs 2.5 % van al die nuttige *Thinopyrum*-spesifieke AFLP-merkers. Die vier AFLP-merkers wat wel in 79S15A gevind is, word in Tabel 3.7 opgesom.

Tabel 3.7 *Th. distichum*-spesifieke AFLP-merkers wat in spilgenotipe 79S15A gevind is.

Merker ID	Fragmentgrootte (bp)	<i>Th. distichum</i> chromosoomligging	Inleierkombinasie
E41M48.123	123	2J ₁ ^d , 2J ₁ ^{dβ} , 3J ₁ ^{dS} , 7J ₂ ^d	<i>EcoRI</i> -AGG & <i>MseI</i> -CAC
S29M12.111	111	2J ₁ ^d , 4J ₁ ^d	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.127	127	4J ₁ ^d	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC
S29M12.133	133	4J ₂ ^d	<i>Sse8387I</i> -AGG & <i>MseI</i> -AC

Lyn 79S15A is vanaf 'n enkelplant met 42 chromosome verhaal en is aanvanklik vermoed om die genoomsamestelling AABBJ₁₂^dJ₁₂^d te hê. Die nageslag van hierdie plant het oënskynlik gesegregeer vir verskillende fenotipes en 'n nageslagsplant wat met SCAR-merkers getoets is, het geblyk om geeneen van die van die kritiese *Th. distichum* chromosome te besit nie (Marais 2008, persoonlike mededeling). Indien 79S15A dus 'n derde genoom, bestaande uit 'n mengsel van J₁^d en J₂^d chromosome sou besit, behoort dit ongeveer 50 % van al die *Thinopyrum*-spesifieke merkers te amplifiseer. Dit was egter nie die geval nie (soos blyk uit Tabel 3.7), en die afleiding wat hieruit gemaak kan word, is dat daar slegs enkele *Thinopyrum* chromosome segregeer in 79S15A nageslagte. Marais (2008, persoonlike mededeling) het 79S15A getoets vir die teenwoordigheid van rog-chromosome met gebruik van beide 'n rog-spesifieke RAPD-merker (OPH20) en C-bande. Die rog-spesifieke OPH20-polimorfisme is deur Ko *et al.* (2002) geïdentifiseer en beskryf. Sterk amplifikasie van die merker-fragment het gedui op die teenwoordigheid van rog-chromosome in 79S15A, en die waarneming kon met C-bande bevestig word. Dit het geblyk dat 79S15A 'n derde genoom besit wat uit 'n mengsel van (hoofsaaklik) rog- en *Thinopyrum*-chromosome bestaan. Die lyn het dus 'n genomiese samestelling van AABB(R/J₁^d/J₂^d)(R/J₁^d/J₂^d).

'n *T. durum*/*Th. distichum* amfiploïed (kruisingsnommer 79S15) is oorspronklik deur R. de V. Pienaar ('n voormalige professor in Genetika aan die Universiteit van Stellenbosch) gemaak (Pienaar, 1981). Pienaar het mettertyd sekondêre amfiploïede ontwikkel en het die materiaal vir verskeie generasies onder veldtoestande geselekteer. 'n Aantal seleksies het na sy aftrede in die Departement agtergebly. Plant 79S15A is uit hierdie materiaal verhaal. Die lyn het waarskynlik voortgespruit uit 'n toevallige (of moontlik ook beplande) kruising van die primêre (of sekondêre) amfiploïed *T. durum*/*Th. distichum* (AABBJ₁^dJ₁^dJ₂^dJ₂^d) met heksaploïede tritcale (2n = 42; AABBR). Terugkruising van die hibried (2n = 49; AABBRJ₁^dJ₂^d) na tritcale kon aanleiding gegee het tot die 79S15A genotipe (Marais 2008, persoonlike mededeling).

3.6 Soutverdraagsaamheidsevaluasie

Agt F_1 -kruisingskombinasies (Tabel 2.7) is met diagnostiese SCAR-merkers (Tabel 2.2) getoets vir die teenwoordigheid van spesifieke $2J_1^d$ en $3J_1^d$ chromosome/chromosoomfragmente. 'n Totaal van 61 plante met die korrekte genotipes is geïdentifiseer, en het bestaan uit 8 tipe-A, 1 tipe-B, 12 tipe-C, 9 tipe-D, 5 tipe-E, 5 tipe-F, 7 tipe-G en 14 tipe-H plante. Agtien Rex- (heksaploïede triticale) en vyftien Henoch-plante (diploïede rog) is as kontroles ingesluit, en 'n totaal van 94 plante is dus in die soutproef ge-evalueer.

Die soutproef het 32 dae geduur, en die individuele plante is op dag 33 visueel beoordeel volgens die skaal weergegee in Tabel 2.9. 'n Gemiddelde punt is vervolgens vir elke groep plante bereken. Die gemiddelde beoordelingspunt word in Tabel 3.8 verskaf. Fotos van die plante (saam gegroepeer volgens kruisings) is ook op dag 33 geneem. Die fotos word in Fig. 3.6.1, Fig. 3.6.2 en Fig. 3.6.3 verskaf.

Tabel 3.8 Gemiddelde visuele beoordelingspunte van F_1 -kruisingskombinasies wat in 'n soutproef geëvalueer is.

	$2J_1^d$ addisie	$2J_1^d\beta$ addisie	Gemiddeldes
$3J_1^{dS}$ translokasie	(A) = 4.88 (8 plante)	(E) = 3.0 (5 plante)	(A+E) = 4.15 (13 plante)
$3J_1^{dL}$ translokasie	(B) = 2.0 (1 plant)	(F) = 1.4 (5 plante)	(B+F) = 1.5 (6 plante)
$3J_1^{dL}$ telosoom	(C) = 1.58 (12 plante)	(G) = 2.0 (7 plante)	(C+G) = 1.74 (19 plante)
$3J_1^d$ addisie	(D) = 3.44 (9 plante)	(H) = 2.71 (14 plante)	(D+H) = 3.0 (23 plante)
Gemiddeldes	(A+D) 4.12 (17 plante)	(E+H) = 2.79 (19 plante)	
Kontroles	Rex = 3.17 (18 plante)	Henoch = 1.1 (15 plante)	

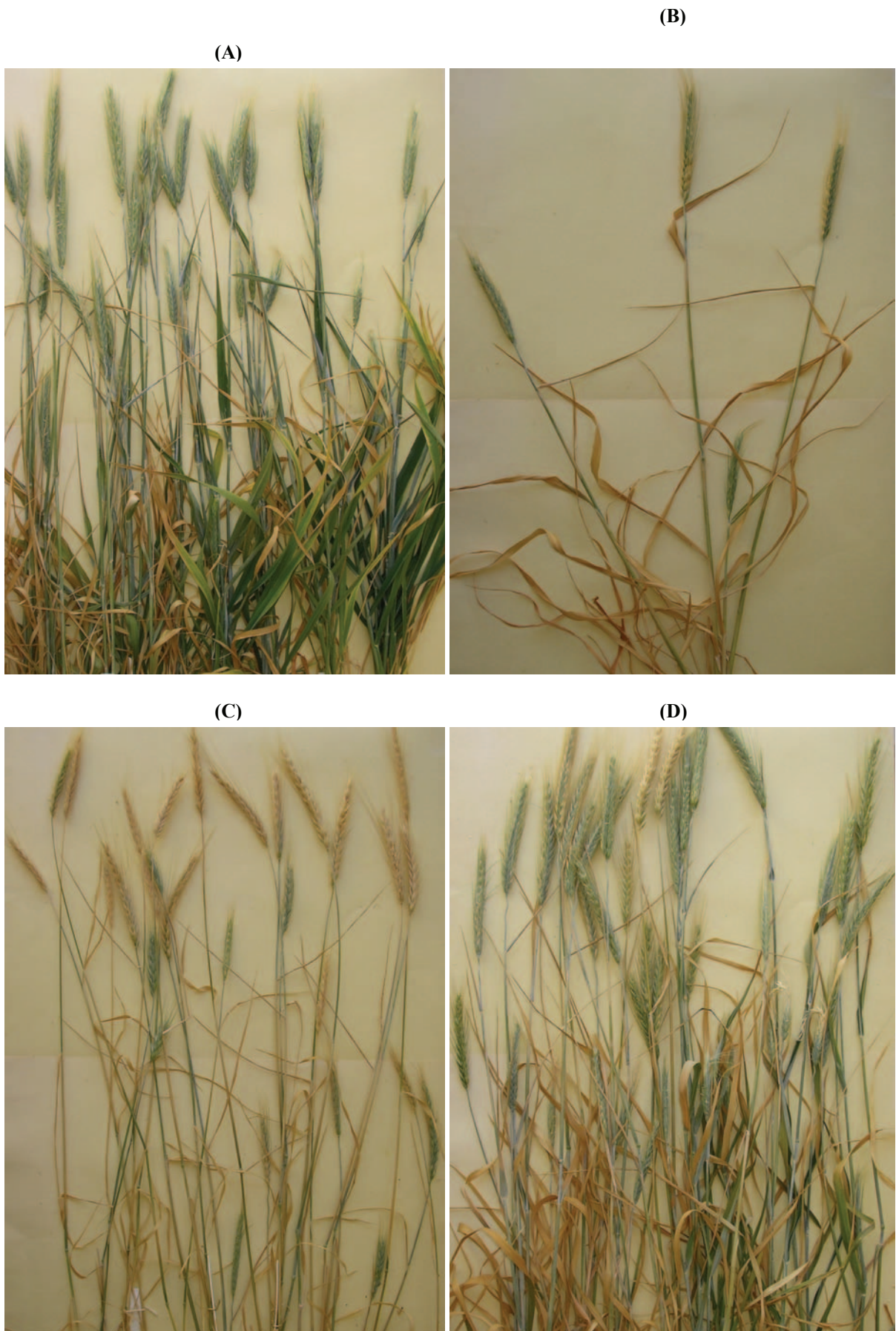


Fig. 3.6.1 Fotos van plante in F_1 -kruisingskombinasies A tot D (Tabel 2.7) geneem na afloop van die soutproef.

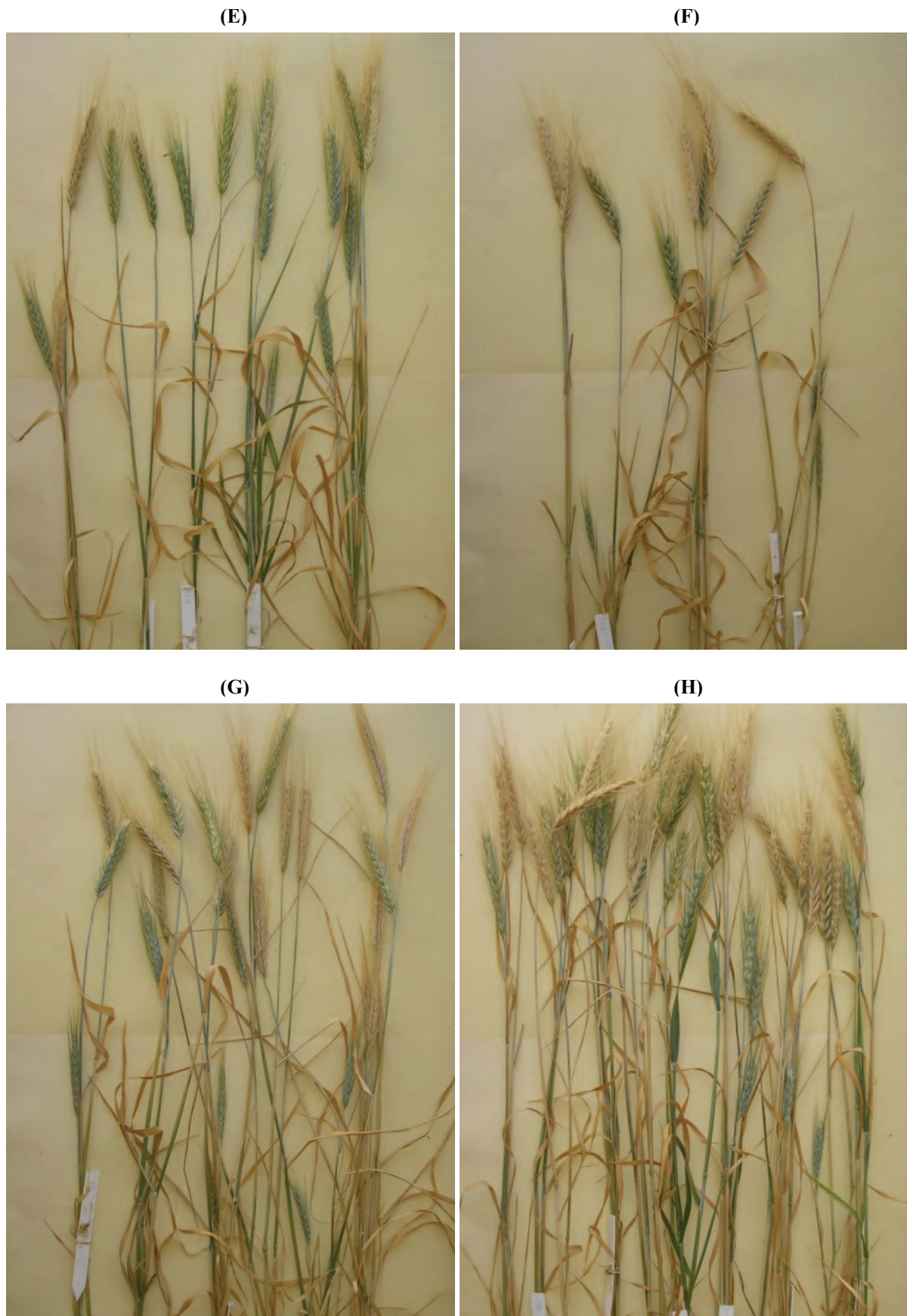


Fig. 3.6.2 Fotos van plante in F_1 -kruisingskombinasies E tot H (Tabel 2.7) geneem na afloop van die soutproef.

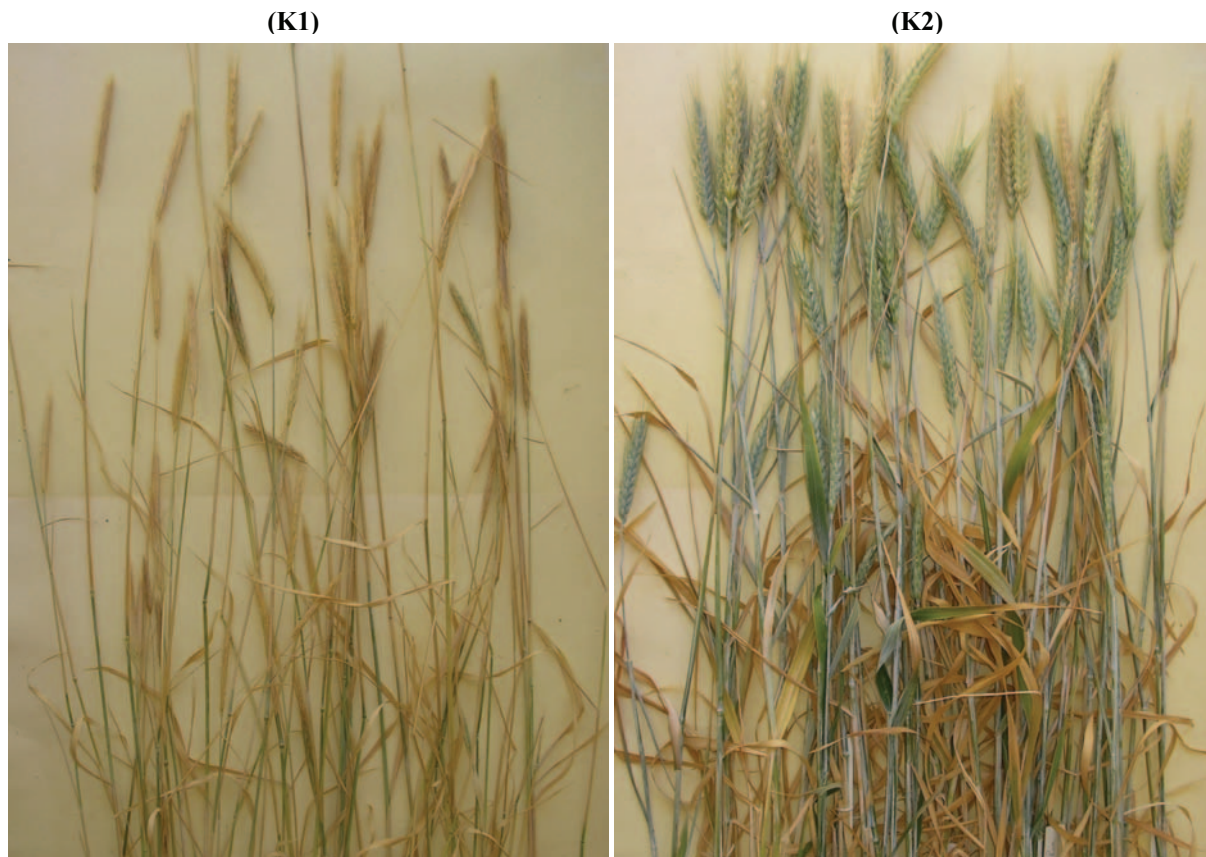


Fig. 3.6.3 Fotos van plante van kontrolegroep K1 (Henoch) en K2 (Rex) geneem na afloop van die soutproef

Uit Tabel 3.8 blyk dat die gemiddelde visuele beoordelingspunte van kombinasies (B), (C), (F) en (G) laer was as dié van die Rex kontrolegroep. Die fotos in Fig. 3.6.1, Fig. 3.6.2 en Fig. 3.6.3 toon ook duidelik dat hierdie kombinasies swakker gevaar het in die soutproef. Hierdie is dan ook die kombinasies waar chromosoomsegment $3J_1^dS$ weggelaat is. Kombinasies (E) en (H) het onderskeidelik soortgelyk en effens swakker as die Rex kontrolegroep vertoon. Daarenteen het kruisingskombinasies (A) en (D) onderskeidelik beter en effens beter as Rex gevaar. Kombinasie (A) waar $3J_1^dS$ (op 'n translokasie) met die volledige chromosoom $2J_1^d$ gekombineer is, was duidelik die mees soutverdraagsame genotipe. Die gemiddelde effek op soutverdraagsaamheid van *Th. distichum* chromosoom-segment $3J_1^dS$ is groter as dié van die volle $3J_1^d$ chromosoom: (A) & (E) vs. (D) & (H) = 4.15 vs. 3.0. Dit kan daarop dui dat die afwesigheid van chromosoom-segment $3J_1^dL$ óf die substitusie van 'n 3S homoeoloë arm 'n voordelige effek in terme van soutverdraagsaamheid het. Indien daar na verskille tussen die $2J_1^d$ addisie- en die $2J_1^d\beta$ addisie-groepe gekyk word (Tabel 3.8), blyk dit dat die gemiddelde effek van addisie $2J_1^d$ (oor kombinasies [A] en [D]), groter is as die gemiddelde effek van die $2J_1^d\beta$ addisie (oor kombinasies [E] en [H]). Hierdie kontras dui dus daarop dat die verlies van 'n gedeelte van *Thinopyrum* chromosoom-segment $2J_1^dL$ soutverdraagsaamheid mag verlaag.

Kruisingskombinasie (D), wat beide die volledige chromosoom $2J_1^d$ en $3J_1^d$ addisies besit, het 'n gemiddelde visuele beoordelingspunt van 3.44 gehad (sien Tabel 3.8). Dit is effens hoër as die gemiddeld van die Rex kontrole groep (3.17). Die fotos in Fig. 3.6.1 en Fig. 3.6.3 toon ook dat groep (D) plante beter vertoon het as die Rex kontrolegroep. Hoewel die effekte klein is, en die resultate in opvolgtoetse bevestig sal moet word, dui die data daarop dat beide die $2J_1^d$ en $3J_1^d$ chromosome betrokke is by soutverdraagsaamheid soos voorheen gerapporteer deur Marais en Marais (2003) en Marais *et al.* (2007). Hierdie bevindings stem ook ooreen met data van Dvořák *et al.* (1988) en Zhong en Dvořák (1995) wat aangedui het dat chromosoom 3E van *Th. elongatum* bydra tot verdraagsaamheid ten opsigte van geleidelike sout-stremming. Die betrokkenheid van chromosoom $2J_1^d$ van *Th. distichum* stem ooreen met die resultate van Omielan *et al.* (1991), wat aangedui het dat chromosoom 2E van *Th. elongatum* betrokke is by soutverdraagsaamheid.

Die soutproef in hierdie studie het getoon dat *Th. distichum* chromosoomarms $2J_1^dL$ en $3J_1^dS$ blyk om 'n rol te speel in verdraagsaamheid ten opsigte van geleidelike sout-stremming, en dus sal kombinasies van hierdie twee chromosoomsegmente waarskynlik belangrik wees vir toekomstige benutting van *Th. distichum* se soutverdraagsaamheid. Zhong en Dvořák (1995) kon nie bepaal watter chromosoomarms van *Th. elongatum* chromosoom 3E betrokke is by verdraagsaamheid ten opsigte van skielike of geleidelike sout-stremming nie. Forster *et al.* (1988) het egter bevind dat *Th. junceum* chromosoom 2EL soutverdraagsaamheid verlaag. Zhong en Dvořák (1995) het ook bevind dat *Th. elongatum* chromosoomarm 2EL soutverdraagsaamheid verlaag, en dus is daar vermoed dat 2EL heel waarskynlik soutvatbaarheidsgene besit. Dit verskil met die bevindings van hierdie studie, wat aantoon dat *Th. distichum* chromosoomarm $2J_1^dL$ 'n bydrae lewer tot verdraagsaamheid ten opsigte van geleidelike sout-stremming. Die verskil is moontlik toe te ken aan interspesie variasie, en dui moontlik aan dat die chromosomale posisies van soutverdraagsaamheidsgene wissel tussen *Thinopyrum* spesies, soos ook blyk uit die verskillende bevindings van Forster *et al.* (1988) en Dvořák *et al.* (1988).

Addisionele werk sal gedoen moet word om die interaksie van chromosoomarms $2J_1^dL$ en $3J_1^dS$ te bevestig. Volgens Marais (2008, persoonlike mededeling) het C-bandkleuring daarop gedui dat die translokasie in kombinasie (A) (Tabel 3.8) waarskynlik 'n $3J_1^dS.3RL$ Robertsoniese translokasie is. 'n Poging word tans aangewend om ook 'n $2J_1^dL$ -translokasie te vind. Indien dit moontlik is, kan naby isogeniese tritcalelyne met onderskeidelik geen

translokasie, een van die translokasies en beide translokasies daargestel word vir souttoetsing. Sodra sodanige materiaal beskikbaar is sal omvattende, gerepliseerde proewe met die materiaal uitgevoer kan word. Dit sal ook belangrik wees om op 'n latere stadium die materiaal teen meer realistiese (laer) soutvlakke te evalueer as wat tans die geval is (visuele beoordeling noodsaak die gebruik van soutvlakke wat letaal vir die kontrolemateriaal is). Sodra betroubare merkers beskikbaar is vir die identifisering van beide die kort en lang arms van chromosome $4J_1^d$ en $5J_1^d$, sal toekomstige werk moet fokus op die ontwikkeling van ditelosomiese- of translokasie-lyne van elk van die $4J_1^d$ en $5J_1^d$ chromosoomarms. Hierdie lyne sal dan in kombinasie met die bestaande $2J_1^d$ en $3J_1^d$ derivate in kruisings en soutproewe ingesluit moet word ten einde te bepaal watter $4J_1^d$ en $5J_1^d$ chromosoomsubstreke betrokke is by die soutverdraagsaamheidsinteraksie.

'n Enkele Rex kontroleplant (Fig. 3.7) het egter bo verwagtinge besonder goed presteer tydens sout-evaluasie. Hierdie plant is na die afloop van die soutproef behou, en daaglikse behandeling met die $38 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ soutoplossing is voortgesit. Die plant het 2 weke na afloop van die soutproef steeds groen vertoon en nuwe, groen spruite ontwikkel.



Fig. 3.7 Foto van die soutverdraagsame Rex plant op dag 33, na afloop van die soutproef.

DNS is ge-ekstraheer uit die soutverdraagsame Rex plant en getoets vir die teenwoordigheid van die *Thinopyrum* loci $Xust1-2J_1^d$ en $Xust8-3J_1^dS$ (Tabel 2.2) om te bevestig dat die plant nie 'n misplaasde plant uit die kruisingsgroep is nie. Die gelfoto van die PKR-resultate word in Fig. 3.8 verskaf. In die geval van $Xust1-2J_1^d$ het die plant dieselfde bandpatrone as twee ander Rex kontroles gelewer. In die geval van $Xust8-3J_1^dS$ het die soutverdraagsame Rex plant dieselfde bandpatroon as een van die ander Rex kontroleplante getoon. Die bandpatroon van die soutverdraagsame Rex plant het verskil van *Th. distichum* s'n. Die plant is bevestig as 'n Rex genotipe, en is hernoem as 'tolerant'-Rex, oftewel 't-Rex'.

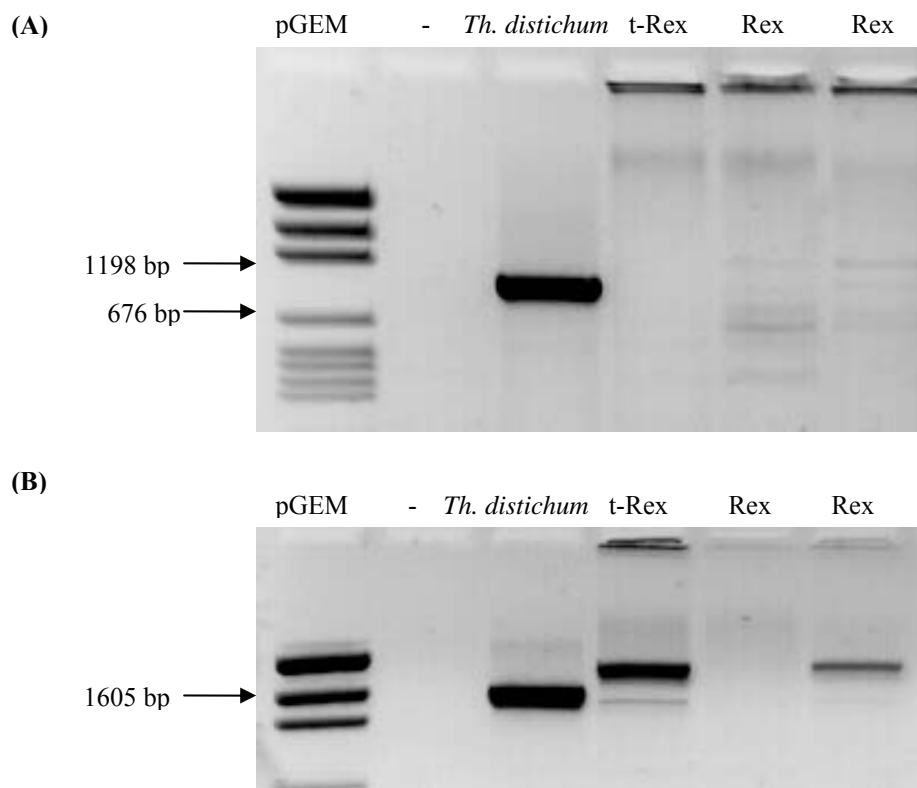


Fig. 3.8 Gelfotos van 'n PKR-sifting van 't-Rex' vir *Thinopyrum* loci: (A) $Xust1-2J_1^d$; (B) $Xust8-3J_1^dS$. Twee afsonderlike Rex plante en *Th. distichum* is as kontroles gebruik.

Die UST8 inleierstel amplifiseer 'n fragment, effens groter as die chromosoom $3J_1^d$ -diagnostiese fragment, in sommige Rex plante. Hierdie fragment karteer op die lang arm van koringchromosoom 2D (Marais 2008, persoonlike mededeling) en kan dus in triticales gebruik word om gesubstitusieerde tipes te identifiseer. Die data toon dus dat Rex triticales heterogeen is vir die voorkoms van plante met 'n volle R-genoom en plante waarin 2R verplaas is met 2D (gesubstitusieerde triticales).

‘n Opvolgstudie waarin t-Rex nageslag in ‘n soutproef met gewone Rex vergelyk is, het daarop gedui dat die twee groepe nie verskil in terme van hul soutverdraagsaamheid nie (Marais 2008, persoonlike mededeling). Die enkele, skynbaar meer bestande Rex plant verteenwoordig waarskynlik eksperimentele (binne-groep) variasie.

3.7 Merker-assosiasie studie

‘n Groep van 93 trigeneriese sekondêre hibriede is met tien nuut-geïdentifiseerde AFLP-merkers, wat in Tabel 2.11 beskryf word, gesif. Daarna is die groep hibriede ook gekarakteriseer met STS-/SCAR-merkers wat in Tabel 2.12 verskyn. Nege-en-veertig plante het *Th. distichum* chromosome besit (soos vasgestel met die versameling chromosoom-spesifieke SCAR-merkers). ‘n Opsomming van die groep hibriede en watter merkers by spesifieke plante opgespoor is, word in Tabel 3.9 verskaf.

Na toetsing met die diagnostiese STS-/SCAR-merkers kon die hibriede gegroepeer word volgens die *Th. distichum* chromosoom/chromosome wat hulle besit (Tabel 3.9). Dus indien die nuwe AFLP-merkers betroubaar was, sou hulle in ‘n patroon soortgelyk aan diè van die STS-/SCAR-merkers amplifiseer. Tabel 3.9 dui aan dat die UST8-3J₁^d inleier ‘n fragment op beide die 3J₁^dS en op 4J₁^d amplifiseer. Hierdie data stem ooreen met die bevinding van Marais *et al.* (2007) dat daar *Xust8* loci op beide 3J₁^dS en 4J₁^d voorkom. Slegs inleier UST2-2J₁^dL het ‘n band in kontrole-plant 2086 geamplifiseer, wat ooreenstem met onlangse C-band data (Marais 2008, persoonlike mededeling) wat daarop dui dat hierdie plant ‘n 2J₁^dL telosoom besit. Inleier UST8-3J₁^dS het wel ‘n band in kontrole-plant W1422 geamplifiseer, wat bevestig dat hierdie populasie segregeer vir die 3J₁^dS translokasie (sien afdeling 3.2).

Tabel 3.9 Opsomming van AFLP- en SCAR-merkers wat gevind is onder die groep trigeneriese sekondêre hibriede. (Plante 80 en 91 het nie oorleef nie, en is weggelaat)

		<i>Thinopyrum distichum</i> chromosome												
		$2J_1^d$			$3J_1^d$				$4J_1^d$		$5J_1^d$			
Plant no.	2n	E32M49.118	E41M49.103	E41M49.131	UST1-2J ₁ ^d S	UST2-2J ₁ ^d L	E35M49.137	E41M49.188	UST5-3J ₁ ^d L	UST8-3J ₁ ^d S	UST9-4J ₁ ^d	UST15-4J ₁ ^d	UST13-5J ₁ ^d	UST14-5J ₁ ^d
2	41													
6	41													
11	41													
13	42													
15	42													
22	42													
24	41			+										
27	42													
29	42													
30	42													
31	41													
41	42			+										
44	42													
45	43			+										
46	41													
50	42			+										
52	42													
54	42													
58	42													
66	41			+										
71	42													
72	42			+										
74	42													
76	42													
77	42													
83	42			+										
1	42	+	+	+	+	+								
10	43	+	+		+	+								
12	43	+	+		+	+								
37	43	+	+		+	+								
64	43	+	+		+	+								
81	43	+	+		+	+								
84	43	+	+	+	+	+								
89	43	+	+		+	+								
7	43						+	+						
14	42						+	+						
16	43						+	+						
20	43			+			+	+						
26	41+t ¹			+			+	+						
33	43			+			+	+						
34	43						+	+						
35	42+t ¹			+			+	+						
36	43						+	+						
38	42						+	+						
39	43						+	+						
42	43			+			+	+						
55	41						+	+						
56	43			+			+	+						

		<i>Thinopyrum distichum</i> chromosome												
		2J ₁ ^d				3J ₁ ^d				4J ₁ ^d		5J ₁ ^d		
Plant no.	2n	E32M49.118	E41M49.103	E41M49.131	UST1-2J ₁ ^{dS}	UST2-2J ₁ ^{dL}	E35M49.137	E41M49.188	UST5-3J ₁ ^{dL}	UST8-3J ₁ ^{dS}	UST9-4J ₁ ^d	UST15-4J ₁ ^d	UST13-5J ₁ ^d	UST14-5J ₁ ^d
60	43			+				+	+					
70	43							+	+					
78	43							+	+					
82	43			+				+	+					
9	42						+	+	+	+				
32	42			+			+	+	+	+				
65	42			+			+	+	+	+				
73	42						+	+	+	+				
75	42						+	+	+	+				
87	42						+	+	+	+				
93	43						+	+	+	+				
3	43		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
18	43		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
19	43		(+) ³							(+) ³	+	+		
21	43		(+) ³							(+) ³	+	+		
23	42		(+) ³							(+) ³	+	+		
28	43		(+) ³							(+) ³	+	+		
40	43		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
43	43		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
47	43		(+) ³							(+) ³	+	+		
48	43		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
49	42		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
51	43		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
53	43		(+) ³							(+) ³	+	+		
61	42		(+) ³							(+) ³	+	+		
62	43		(+) ³							(+) ³	+	+		
68	42		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
86	42		(+) ³	+						(+) ³	+	+		
4	42+t ¹												+	+
5	43												+	+
25	42												+	+
59	42												+	+
63	42												+	+
69	42												+	+
85	43												+	+
92	42			+									+	+
17	43	+	+	+	+	+	+	+	+					
57	42	+	+		+	+	+	+	+					
8	42	+	+	+	+	+	+	+	+					
67	43	+	+	+	+	+				(+) ³	+	+		
90	43	+	+	+	+	+				(+) ³	+	+		
95	43	+	+		+	+				(+) ³	+	+		
79	43		(+) ³				+	+	+	+	+	+		
88	42		(+) ³							(+) ³	+	+	+	+
94	43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
2086						+								
W1422							+		+					
K ²														

¹ +t verwys na die teenwoordigheid van 'n ongeïdentifiseerde telosoom

² K is 'n negatiewe kontrole

³(+) dui aan dat 'n addisionele fragment op 'n ander chromosoom ge-amplifiseer is.

Die groep sekondêre hibriede was twee maal onderwerp aan AFLP-analise. Die data uit die eerste analise (nie ingesluit nie) kon oënskynlik slegs vier van die 10 potensiële AFLP-merkers onder die groep hibriede opspoor. Hulle was: E41M49.103 (2J₁^d); E41M49.131 (2J₁^d); E41M49.188 (3J₁^{dL}); en E41M49.121 (5J₁^d). Geeneen van hierdie AFLP-merkers se voorkoms het egter gekorreleer met die STS-/SCAR-data nie, en verskeie AFLP-merkers het voorgekom in plante waarvan die ouers nie die ooreenstemmende *Thinopyrum* chromosoomsamestelling gehad het nie. Dit was ook vreemd dat die AFLP-merkers baie min plante met *Thinopyrum* chromosome herken het in vergelyking met die STS-/SCAR-merkers. Kort daarna is 'n verklaring deur Applied Biosystems uitgereik wat aangedui het dat van hul AFLP-produkte (waaronder die lot-nommers van die besending wat in hierdie studie gebruik is), foutief was. Skynbaar is verskeie stelle pre-selektiewe inleiers oor 'n tydperk van drie jaar verkeerd gesintetiseer, en dus sou data wat met gebruik hiervan deur AFLP-analise gegenereer word onbetroubaar wees. Daar bestaan ook 'n moontlikheid dat foutiewe pre-selektiewe inleiers gebruik is tydens AFLP-merker ontwikkeling, maar aangesien geen rekords (lot-nommers) meer beskikbaar was nie, kon dit nie bevestig word nie. Indien foutiewe pre-selektiewe inleiers wel gebruik was, sou dit beteken dat alle AFLP-merkers wat tydens hierdie studie opgespoor is van geen nut is nie. Nuwe pre-selektiewe inleiers is wel uiteindelik van die vervaardigers verkry, en die groep sekondêre hibriede is vir 'n tweede maal onderwerp aan AFLP-analise. Die AFLP-profiel van die tweede sifting het aansienlik verskil met dié van die eerste sifting. Data uit hierdie tweede analise het beter ooreengestem met die STS-/SCAR-data en word in Tabel 3.9 opgesom.

Amplifikasie met selektiewe inleierkombinasies *EcoRI*-AAC & *MseI*-CAG, *EcoRI*-ACA & *MseI*-CAG en *EcoRI*-AGG & *MseI*-CAG het 'n totaal van 264 fragmente opgelewer. Hierdie getal is aansienlik hoër as wat verkry is met dieselfde selektiewe inleierkombinasies tydens AFLP merker-ontwikkeling (wat in totaal 145 fragmente opgelewer het). Die fragmente wat in die merker assosiasie studie verkry is, is vergelyk met die fragmente wat geamplifiseer is met die genotipe paneel tydens AFLP merker-ontwikkeling: 101 fragmente het ooreengestem vir beide die merker assosiasie studie en die AFLP merker-ontwikkeling; 44 fragmente wat tydens AFLP-merker ontwikkeling verkry is, was nie onder die groep hibriede gevind nie; en 163 fragmente is nuut geamplifiseer onder die groep sekondêre hibriede tydens die merker assosiasie studie. Hierdie verskille in AFLP amplifikasie-produkte mag moontlik aandui dat daar wel met foutiewe pre-selektiewe inleiers gewerk is tydens AFLP merker-ontwikkeling.

Die resultate kan egter ook die gevolg wees van die twee geneties-verskillende populasies wat in die twee studies gebruik is. Dit is onwaarskynlik dat eksperimentele foute betekenisvol bygedra het tot die groot verskil in die getal ge-amplifiseerde bande aangesien daar deurgaans noukeurig volgens die aanvaarde protokol gewerk is om te verseker dat alle AFLP-restriksie-ligasie-, pre-selektiewe- en selektiewe-amplifikasie reaksies uniform uitgevoer word.

Dit is egter moontlik dat die AFLP-protokol wat hier gebruik is effens aangepas kan word om die herhaalbaarheid van resultate te verbeter. In die huidige AFLP-protokol maak die totale volume ensiem (*EcoRI*, *MseI* en T4-DNS ligase) in restriksie-ligasie reaksies 6 % van die totale reaksievolume uit. Die ensieme word in gliserol geberg, en dus kan aanvaar word dat gliserol naastebly 6 % van die restriksie-ligasie reaksies se volume uitmaak. Volgens die 'AFLP Plant Mapping Kit' van Applied Biosystems moet seker gemaak word dat die volume ensiem wat by elke restriksie-ligasie reaksie gevoeg word nie daartoe lei dat gliserol meer as 5 % van die totale reaksievolume uitmaak nie, aangesien dit kan lei tot *EcoRI** (ster) aktiwiteit. *EcoRI** (ster) aktiwiteit lei daartoe dat die ensiem nie die DNS volgens sy spesifieke nukleotied-herkenningsetel sny nie, maar eerder op 'n lukrake wyse. Dit sal lei tot AFLP-fragmente met foutiewe groottes wat nie herhaalbaar is nie. Aangesien die gliserol volume/volume persentasie in hierdie studie se restriksie-ligasie reaksies bo hierdie grenswaarde van 5 % val, beteken dit dat 'n mate van *EcoRI** (ster) aktiwiteit moontlik kon plaasgevind het tydens restriksie-snyding van die templaar-DNS. Die 'Plant Mapping Kit' van Applied Biosystems beveel aan dat 5 U *EcoRI*, 1 U *MseI* en 1 U T4-DNS-ligase per reaksie (11 μ L totale volume) gebruik word om volledige restriksie en ligasie te bewerkstellig. Die verlaging van die *EcoRI* en T4-DNS-ligase hoeveelhede sal dus heel moontlik die effektiwiteit van restriksie en/of ligasie benadeel. Dit blyk egter dat die AFLP-protokol wat tydens hierdie studie gebruik is, gebruik maak van 'n oormatige hoeveelheid *MseI* restriksie-ensiem (5 U versus 1 U). Daar kan dus geargumenteer word dat die verlaging van die hoeveelheid *MseI*-ensiem in restriksie-ligasie reaksies, nie die AFLP-profiel van groot komplekse genome behoort te beïnvloed nie. Vir die uitvoer van toekomstige AFLP restriksie-ligasie reaksies sal dit dus raadsaam wees om vas te stel of verlaging van die volume/volume persentasie gliserol (deur die hoeveelheid *MseI* ensiem wat bygevoeg word van 5 U per reaksie na 2 U per reaksie te verlaag) wel herhaalbaarheid sal verbeter.

Vyf van die 10 nuwe AFLP-merkers, waarmee die groep hibriede getoets is, kon nie opgespoor word nie. Hulle was AFLP-merkers: E32M49.124 (4J₂^d); E32M49.125 (2J₁^d);

E32M49.129 ($3J_1^d$); E32M49.144 ($5J_1^d$); en E41M49.121 ($5J_1^d$). Hierdie fragmente het moontlik weens verskeie redes nie ge-amplifiseer tydens selektiewe amplifikasie nie. Die eerste moontlike verduideliking is dat hierdie potensiële AFLP-merkers eenvoudig nie so *Thinopyrum*-spesifiek is as wat die aanvanklike data aangedui het nie. Dit impliseer dat daar tydens merker-ontwikkeling skynbaar-*Thinopyrum*-spesifieke bande in die tritcale genome van beide die primêre hibried, 96M2, en die tersaaklike addisielyn geamplifiseer het. Dieselfde band moes dan afwesig wees in die tritcale-genome van al die ander addisielyne in die toetspaneel. Omdat die tritcale agtergronde van al die addisielyne naby-verwant is, is dit baie onwaarskynlik, en kan dit beswaarlik 'n rede wees waarom die merkers oor die algemeen so swak herhaal het. 'n Tweede moontlikheid waarom soveel van die potensiële AFLP-merkers nie ge-amplifiseer het nie kan wees dat daar tydens merker-ontwikkeling foutiewe pre-selektiewe inleiers vir pre-selektiewe amplifikasie gebruik is. Die oorspronklike elektroferogramme wat verkry is tydens AFLP-merker ontwikkeling (in afdeling 3.4) is weereens visueel deeglik ondersoek. Die oorspronklike toewysings van die fragmente as AFLP-merkers kon eger bevestig word. Die gebruik van foutiewe inleiers is dus die waarskynlikste rede vir die swak herhaalbaarheid van die data. Dit was egter teleurstellend dat die twee merkers vir chromosoom $5J_1^d$, E32M49.144 en E41M49.121 nie geamplifiseer het nie. *Thinopyrum* chromosoom $5J_1^d$ is een van die kritiese chromosome waarvoor die minste molekulêre merkers beskikbaar is (Marais 2008, persoonlike mededeling). Daar sal dus in die toekoms sterk klem geplaas moet word op die ontwikkeling van addisionele molekulêre merkers vir *Thinopyrum* chromosoom $5J_1^d$, en die toekenning van hierdie merkers aan die chromosoomarms.

Van die 10 potensiële AFLP-mekers wat met behulp van die selektiewe inleierkombinasies *EcoRI*-AAC & *MseI*-CAG, *EcoRI*-ACA & *MseI*-CAG en *EcoRI*-AGG & *MseI*-CAG geamplifiseer moes word, het slegs vyf wel onder die groep hibriede voorgekom. Hulle was: E32M49.118 ($2J_1^d$); E41M49.103 ($2J_1^d$); E41M49.131 ($2J_1^d$); E35M49.137 ($3J_1^d$); en E41M49.188 ($3J_1^{dL}$).

Uit Tabel 3.9 kan gesien word dat fragment E32M49.118 slegs voorgekom het in plante wat positief getoets het vir loci *Xust1* (inleierpaar UST1- $2J_1^{dS}$) en *Xust2* (inleierpaar UST2- $2J_1^{dL}$). Aangesien AFLP-merker E32M49.118 volgens Tabel 3.9 nie amplifiseer in die 2086 kontrole plant (besit die $2J_1^{dL}$ telosoom) nie, karteer hierdie merker heel waarskynlik op die kort arm van $2J_1^d$. Daar kan dus met redelike sekerheid gesê word dat AFLP-merker E32M49.118 'n

herhaalbare en betroubare merker vir *Thinopyrum* chromosoomsegment $2J_1^dS$ is. Tabel 3.9 dui aan dat fragment E41M49.103 ook voorgekom het in alle plante wat positief getoets het vir loci *Xust1* en *Xust2*. Die selektiewe inleierkombinasie *EcoRI*-AGG & *MseI*-CAG blyk egter om ook 'n addisionele fragment van dieselfde grootte te amplifiseer, wat skynbaar op chromosoom $4J_1^d$ karteer. Hierdie addisionele fragment het egter nie in plant 53 (waar dit wel behoort voor te kom) geamplifiseer nie. Dit kan moontlik die gevolg van swak amplifikasie wees. Data wat verkry is tydens AFLP-merker ontwikkeling is geraadpleeg, en daar is opgemerk dat hierdie addisionele fragment nie voorgekom het in die $4J_1^d$ addisielyn nie. 'n Moontlike verduideliking hiervoor is dat die fragment (ook soos in die geval van plant 53) toevallig nie geamplifiseer het nie. Fragment E41M49.103 amplifiseer ook nie in die 2086 kontrole plant (met die $2J_1^{dL}$ telosoom) nie, en blyk dus om 'n herhaalbare AFLP-merker vir *Thinopyrum* chromosoomsegment $2J_1^dS$ te wees. Die feit dat die betrokke selektiewe inleierkombinasie 'n identiese, addisionele fragment op $4J_1^d$ amplifiseer, beteken egter dat hierdie AFLP-merker van beperkte nut is. Uit Tabelle 3.9 en 2.10 kan gesien word dat fragment E41M49.131 geensins korreleer met die voorkoms van chromosoom $2J_1^d$ nie. Die betrokke elektroferogram (wat tydens die merker-assosiasie studie ontwikkel is) is ondersoek, en daar is gevind dat alle monsters 'n relatiewe groot densitometriese piek in die posisie van fragment E41M49.131 gehad het. 'n Fragment wat 'n enkele basispaar groter is (132 bp) het langsaan E41M49.131 in elke monster voorgekom, en het 'n aansienlike hoeveelheid fluoressensie getoon. Hierdie fragment het heel waarskynlik gelei tot sogenaamde fluoressensie-opbloei, en kon veroorsaak dat die volgordebepaler 'n sogenaamde hik-verskynsel toon. Hierdie hik-verskynsel behels dat 'n baie groot fluoressensie-meting (as gevolg van die teenwoordigheid van 'n hoë fragment konsentrasie) veroorsaak dat 'n kleiner densitometriese fluoressensie-piek een basispaar voor of na die ware fragment op die elektroferogram waargeneem word. Dit sou dus die teenwoordigheid of afwesigheid van fragment E41M49.131 versluier. Fragment E41M49.131 is dus nie 'n *Thinopyrum*-spesifieke fragment nie.

Fragment E35M49.137 kan volgens Tabel 3.9 gesien word om volledig met SCAR-merker UST8- $3J_1^dS$ ooreen te stem, en amplifiseer ook in die W1422 kontrole plant ($3J_1^dS$ translokasielyn). Hierdie sinspeel daarop dat die fragment karteer op die kort arm van *Thinopyrum* chromosoom $3J_1^d$. Dus blyk dit dat fragment E35M49.137 'n herhaalbare en betroubare AFLP-merker vir *Thinopyrum* chromosoomsegment $3J_1^dS$ is. Tabel 3.9 toon vervolgens dat fragment E41M49.188 saam met STS-merker UST5- $3J_1^{dL}$ segregeer. Hierdie

fragment karteer dus waarskynlik op die lang arm van *Thinopyrum* chromosoom 3J₁^d. Fragment E41M49.188 blyk dus om 'n betroubare en herhaalbare AFLP-merker vir *Thinopyrum* chromosoomsegment 3J₁^dL te wees.

Die feit dat van die ontwikkelde AFLP-merkers wel gedurende die karakterisering van die sekondêre hibriede bevestig kon word, beteken dat die foutiewe pre-selektiewe inleiers nie tot 'n totale mislukking van die AFLP-merkerontwikkeling gelei het nie. Die verwagte impak van die foutiewe inleiers is egter moeilik om te voorspel aangesien Applied Biosystems tot dusver geen spesifieke besonderhede omtrent die foutiewe inleiers verskaf het nie. Die enigste wyse waarop bepaal kan word wat die werklike effek van hierdie foutiewe inleiers is, is om met nuwe, korrekte inleiers pre-selektiewe amplifikasie uit te voer met die oorspronklike AFLP restriksie-ligasie reaksies van die genotipe paneel wat tydens AFLP-merkerontwikkeling gebruik is. Die AFLP-profiel van die onderskeie monsters moet dan met mekaar vergelyk word om alle verskille tussen die profiele uit te lig.

Die nuttige AFLP-merkers tesame met die STS-/SCAR-merkers het die identifikasie van potensieel-nuttige plantmateriaal onder die groep sekondêre hibriede toegelaat. Uit Tabel 3.9 kan gesien word dat plant 1 'n chromosoomgetal van 42 gehad het en positief getoets het vir beide die UST1-2J₁^dS- en UST2-2J₁^dL-merkers. Plant 1 kon dus moontlik 'n 2J₁^d substitusie-plant gewees het. 'n 3J₁^dL telosoom kon moontlik in plant 35 voorgekom het. Daarenteen lyk dit egter nie asof daar 'n 3J₁^dS translokasie of telosoom onder die groep hibriede voorgekom het nie. Plante 9, 32, 65, 73, 75 en 87 het chromosoomgetalle van 42, en het positief getoets vir beide UST5-3J₁^dL en UST8-3J₁^dS. Enigeen van hierdie plante kon dus substitusielyste vir die volledige 3J₁^d chromosoom gewees het. Plante 23, 49, 61, 68 en 86 het chromosoomgetalle van 42 gehad. Hierdie plante het ook positief getoets vir die *Xust9* (inleierpaar UST9-4J₁^d) en *Xust15* (inleierpaar UST15-4J₁^d) loci. Aangesien dit onbekend is waar presies hierdie loci op chromosoom 4J₁^d karteer, kan daar nie met sekerheid gesê word of die betrokke plante moontlike 4J₁^d translokasies of substitusies was nie. Uit Tabel 3.9 kan afgelei word dat plante 25, 59, 63, 69 en 92 moontlike substitusies vir chromosoom 5J₁^d was. Die data van Tabel 3.9 het ook aangedui dat plant 4 heel waarskynlik 'n 5J₁^d telosoom besit het. C-band data (Marais 2008, persoonlike mededeling) het egter getoon dat dit nie 'n 5J₁^d telosoom was nie. Plant 8 kon volgens Tabel 3.9 'n moontlike dubbele substitusie vir *Thinopyrum* chromosome 2J₁^d en 3J₁^d gewees het, en hierdie plant se nageslag behoort opgevolg te word ten einde dit te bevestig. Plant 88 kon moontlik ook 'n dubbele substitusie

wees vir chromosome $4J_1^d$ en $5J_1^d$. Plant 94 kon moontlik twee substitusies asook 'n addisie besit het, wat chromosome $2J_1^d$, $3J_1^d$ en $4J_1^d$ betrek. Dit is egter meer waarskynlik dat die bogenoemde plante monosomiese eerder as disomiese substitusies was. In so 'n geval sou hul nageslag nogtans deursoek kon word vir disomiese substitusies.

Tussen die 93 hibriede in Tabel 3.9 kom daar 18 plante voor wat waarskynlik 'n $3J_1^dL$ -translokasie besit het. Die translokasies kan almal waarskynlik teruggevoer word na 'n enkel uitruiling-gebeurtenis. Soos reeds aangedui mag daar moontlik nog verdere translokasies wees wat chromosome $4J_1^d$ en $5J_1^d$ betrek het. Omdat die potensiële translokasies onbevestig is en dit boonop nie duidelik is hoeveel onafhanklike translokasie-gebeurtenisse daar was nie, kan 'n sinvolle translokasiefrekwensie nie beraam word nie.

Alle plante wat geblyk het om moontlike substitusie- en translokasielyne te wees, sal egter verder gekarakteriseer moet word by wyse van C-band kleuring en GISH. Potensieël-nuttige materiaal is dus tydens die merker-assosiasie studie opgespoor. Hierdie materiaal kan nuttig gebruik word vir verdere karakterisering van soutverdraagsaamheid in *Thinopyrum*, en bring die kommersiële benutting van *Th. distichum* se soutverdraagsaamheid in verboude grane, nog 'n stap nader.

4. Algemene Bespreking

Dit het geblyk dat spesie-oordraagbare EST-SSR's van min nut was vir die ontwikkeling van *Thinopyrum* chromosoom-spesifieke merkers. 'n Lae frekwensie van spesie-spesifieke polimorfismes is waargeneem en 'n poging om twee van die polimorfiese fragmente om te skakel na PKR-gebaseerde SCAR-merkers, was slegs in een geval suksesvol. Die 5J₁^d-spesifieke fragment wat nie omgeskakel kon word nie het ook geen SSR's bevat nie, wat twyfel geskep het omtrent die EST-SSR's se oordraagbaarheid asook die vermoë van die inleierpare om werklik EST-SSR's te amplifiseer.

Deur die loop van hierdie studie het dit duidelik geword dat die aanvanklike benadering om soutverdraagsaamheid van *Th. distichum* te benut deur amfiploïede plante met herrangskikte genome te ontwikkel nie haalbaar is nie. Dit was grotendeels te wyte aan die genomiese onstabiliteit van die amfiploïede asook die onvermoë om plante met korrekte (teiken) chromosoomgetalle en kritiese *Th. distichum* chromosoom-kombinasies te verhaal. Die mees belowende benadering om soutverdraagsaamheid te benut blyk dus nou te wees om sistematies translokasies van die kritiese *Th. distichum* chromosoomsegmente na triticale plante te bewerkstellig, en daarna al die translokasies in 'n enkele triticale lyn te kombineer.

In hierdie studie kon dit bevestig word dat *Th. distichum* chromosome 2J₁^d en 3J₁^d betrokke is by die soutverdraagsaamheidsinteraksie. Verder het dit ook vir die eerste maal geblyk dat *Th. distichum* chromosoomarms 2J₁^dL en 3J₁^dS die gedeeltes is wat meer spesifiek by soutverdraagsaamheid betrokke is, en moontlik soutverdraagsaamheidgene mag bevat.

Nuwe chromosoom-spesifieke AFLP-merkers kon geredelik geïdentifiseer word. Ongelukkig is daar gedurende bevestiging gevind dat slegs vier van die tien AFLP-merkers wat getoets is, werklik geblyk het om herhaalbaar en nuttig te wees. Die primêre rede vir die swak herhaalbaarheid was die verskaffing van inleiers van inkonsekwente gehalte deur die vervaardiger, en oor 'n lang periode van tyd. Nog 'n belangrike gevolgtrekking wat voorgespruit het uit die bevestigingsproses, is dat daar nie altyd staatgemaak kan word op programmatuur alleen om AFLP-fragmente te identifiseer nie. Elektroferogramme behoort altyd ook volledig visueel ondersoek word ten einde alle AFLP-polimorfismes te bevestig.

Fluoresensie-gebaseerde semi-geoutomatiseerde AFLP-analise, soos oorspronklik deur Schwarz *et al.* (2000) gerapporteer, is 'n uitstekende molekulêre tegniek. Dit laat 'n navorser toe om 'n groot aantal monsters relatief vinnig en akkurraat te tipeer. Die tegniek is ook hoogs herhaalbaar en betroubaar mits daar absolute sekerheid is omtrent die integriteit van die AFLP-reagense en nougesette toepassing van al die betrokke stappe. Hoewel die tegniek dus geblyk het om baie effektief te wees vir die daarstelling van unieke merkers, en dit blyk om 'n hoogs herhaalbare metodiek te wees indien dit presies uitgevoer word, bly die kompleksiteit daarvan 'n "Achilles-hakskeen". Aangesien die tegniek ook eksklusiewe, hoogs-gespesialiseerde apparatuur en duur reagense vereis, beteken dit dat die gebruik daarvan beperk is tot goed-uitgeruste molekulêre laboratoria met geredelike toegang tot befondsing. Omskakeling van geïdentifiseerde polimorfismes na 'n goedkoper, eenvoudige PKR-gebaseerde protokol soos byvoorbeeld SCAR's (wat relatief maklik ontwikkel en uitgevoer kan word deur enige molekulêre laboratorium), sal waarskynlik groter robuustheid en kontroleerbaarheid van die merkers in die hand werk.

5. Literatuurlyst

Amtmann A, Sanders D (1999) Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.*, **29**: pp 75-112

Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: pp 3736-3740

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, **285**: pp 1256-1258

Ashraf M (1994) Genetic variation for salinity tolerance in spring wheat. *Hereditas*, **120**: pp 99-104

Ashraf M, O'Leary JW (1997) Ion distribution in leaves of salt tolerant and salt sensitive lines of spring wheat under salt stress. *Acta Bot. Neerl.*, **46**: pp 207-217

Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.*, **126(2)**: pp 374-380

Binzel ML, Ratajczak R (2000) In press: Function of membrane systems under salinity: tonoplast. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Brown LR, Flavin C, French HF (1995) State of the World 1996: A Worldwatch Institute report on progress toward a sustainable society. W. W. Norton and Company, New York, pp 3-20

Chen PD, Tsujimoto H, Gill BS (1994) Transfer of *Ph¹* gene promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* into common wheat and their utilization in alien genetic introgression. *Theor. Appl. Genet.*, **88**: pp 97-101

Chen ZJ, Ni Z (2006) Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays*, **28**: pp 240-252

Colmer TD, Munns R, Flowers TJ (2005) Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Aust. J. Exp. Agr.*, **45**: pp 1425-1443

Colmer TD, Flowers TJ, Munns R (2006) Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.*, **57**: pp 1059-1078

Comai L (2000) Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol. Biol.*, **43**: pp 387-399

Davies PA, Pallotta MA, Driscoll CJ (1985) Centric fusion between nonhomologous rye chromosomes in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.*, **27**: pp 627-632

Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, **4**: pp 215-223

Donini P, Elias ML, Bougourd SM, Koebner RMD (1997) AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome*, **40**: pp 521-526

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: pp 13-15

Dubcovsky J, Galvez AF, Dvořák J (1994) Comparison of the genetic organization of the early salt stress response gene system in salt-tolerant *Lophopyrum elongatum* and salt-sensitive wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **87**: pp 957-964

Dubcovsky J, Santa Maria G, Epstein E, Luo MC, Dvořák J (1996) Mapping of the K⁺/Na⁺ discrimination locus *Kn1* in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **92**: pp 448-454

Dvořák J, Edge M, Ross K (1988) On the evolution of the adaptation of *Lophopyrum elongatum* to grow in saline environments. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: pp 3805-3809

Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P, Powell W (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **104**: pp 399-407

Evans LE, Jenkins BC (1960) Individual *Secale cereale* chromosome additions to *Triticum aestivum*. I. The addition of individual “Dakold” fall rye chromosomes to “Kharkhov” winter wheat and their subsequent identification. *Can. J. Genet. Cytol.*, **2**: pp 205-215

Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.*, **55**: pp 307-319

Flowers TJ, Yeo AR (1995) Breeding for salinity resistance in crops - where next?. *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**: pp 875-884

Forster BP, Gorham J, Miller TE (1987) Salt tolerance of an amphiploid between *Triticum aestivum* and *Agropyron junceum*. *Plant Breeding*, **98**: pp 1-8

Forster BP, Miller TE, Law CN (1988) Salt tolerance of two wheat *Agropyron junceum* disomic addition lines. *Genome*, **30**: pp 559-564

Galinski EA (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, **37**: pp 273-328

Gao LF, Jing RL, Huo NX, Li Y, Li PX, Zhou RH, Chang XP, Tang JF, Ma ZY, Jia JZ (2004) One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **108**: pp 1392-1400

Ghassemi F, Jakeman AJ, Nix HA (1995) Salinization of land and water resources. Human causes, extent, management, and case studies (1st Edition), CAB International, Wallingford

Gorham J (1993) Genetics and Physiology of enhanced K^+/Na^+ discrimination. In: Randall PJ, Delhaize E, Richards RA, Munns R (eds.) Genetic aspects of plant mineral nutrition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 151-158

Gorham J, Forster BP, Budrewicz E, Wyn Jones RG, Miller TE, Law CN (1986) Salt tolerance in the *Triticeae*: solute accumulation and distribution in an amphiploid derived from

Triticum aestivum cv. Chinese Spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *J. Exp. Bot.*, **37**: pp 1435-1449

Gorham J, Bristol A, Young EM, Wyn Jones RG (1990) The presence of the enhanced K^+/Na^+ discrimination trait in the diploid *Triticum* species. *Theor. Appl. Genet.*, **82**: pp 729-736

Gorham J, Bridges J, Dubcovsky J, Dvořák J, Hollington PA, Luo MC, Khan JA (1997) Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K^+/Na^+ discrimination in wheat. *New Phytol.*, **137**: pp 109-116

Greenway H, Munns R (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**: pp 149-190

Gregorio GB, Senadhira D (1993) Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **86**: pp 333-338

Gregory RS (1987) Triticale breeding. In: Lupton (ed.) Wheat breeding, Chapman & Hall, London – New York, pp 269-286

Groenewald JZ, Fourie M, Marais AS, Marais GF (2005) Extension and use of a physical map of the *Thinopyrum*-derived *Lr19* translocation. *Theor. Appl. Genet.*, **112**: pp 131-138

Gupta PK, Priyadarshan PM (1982) Triticale: Present status and future prospects. *Adv. Genet.*, **21**: pp 255-343

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **51**: pp 463-499

Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch T, Steinmeyer K (1996) A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a *CLC* gene disruption. *J. Biol. Chem.*, **271**: pp 33632-33638

Hollington PA, Ahktar J, Aragues R, Hussain Z, Mahar AR, Quarrie SA, Qureshi RH, Royo A, Saqib M (2002) Recent advances in the development of salinity and waterlogging tolerant bread wheats. In: Ahmad R, Malik KA (eds.) Prospects for saline agriculture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 83-99

Islam AKMR, Shepherd KW, Sparrow DHB (1981) Isolation and characterization of euplasmic wheat – barley chromosome addition lines. *Heredity*, **46**: pp 161-174

Islam S, Malik AI, Islam AKMR, Colmer TD (2007) Salt tolerance in a *Hordeum marinum* - *Triticum aestivum* amphiploid, and its parents. *J. Exp. Bot.*, **58(5)**: pp 1219-1229

Jacobs JA, Hanekom L, Marais AS, Marais GF (2004) Development of SCAR markers for a *Thinopyrum distichum* chromosome that appears to be involved in salt tolerance. *S. Afr. J. Plant Soil*, **21(4)**: pp 236-239

Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevski A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP, and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding*, **3**: pp 381-390

Karaba A, Dixit S, Greco R, Aharoni A, Trijatmiko KR, Marsch-Martinez N, Krishnan A, Nataraja KN, Udayakumar M, Pereira A (2007) Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt-tolerance gene. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: pp 15270-15275

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.*, **17**: pp 287-291

King IP, Purdie KA, Rezanoor HN, Koebner RMD, Miller TE, Reader SM, Nicholson P (1993a) Characterization of *Th. bessarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNA's (RAPD's) and genomic *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.*, **86**: pp 895-900

King IP, Purdie KA, Orford SE, Reader SM, Miller TE (1993b) Detection of homoeologous chiasma formation in *Triticum durum* × *Th. bessarabicum* hybrids using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*, **71**: pp 369-372

King IP, Purdie KA, Liu CJ, Reader SM, Pittaways TS, Orford SE, Miller TE (1994) Detection of interchromosomal translocations in the *Triticeae* by RFLP analysis. *Genome*, **37**: pp 882-887

King IP, Orford SE, Cant KA, Reader SM, Miller TE (1996) An assessment of the salt-tolerance of wheat/*Th. bessarabicum* 5E^b addition and substitution lines. *Plant Breeding*, **115**: pp 77-78

King IP, Law CN, Cant KA, Orford SE, Reader SM, Miller TE (1997) Tritipyrum, a potential new salt-tolerant cereal. *Plant Breeding*, **116**: pp 127-132

Kingsbury R, Epstein E (1984) Selection for salt-resistant spring wheat. *Crop Sci.*, **24**: pp 310-315

Ko JM, Do GS, Suh DY, Seo BB, Shin DC, Moon HP (2002) Identification and chromosomal organization of two rye genome-specific RAPD products useful as introgression markers in wheat. *Genome*, **45**: pp 157-164

Lindsay MP, Lagudah ES, Hare RA, Munns R (2004) A locus for sodium exclusion (*Nax1*), a trait for salt-tolerance, mapped in durum wheat. *Func. Plant Biol.*, **31**: pp 1105-1114

Littlejohn GM (1988) Salt tolerance of amphiploids and derivatives of crosses between wheat and wild *Thinopyrum* species. In: Miller TE, Koebner RMD (eds.) *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge, UK, pp 845-849

Liu ZW, Wang RRC (1993) Genome constitutions of *Thinopyrum curvifolium*, *T. scirpeum*, *T. distichum*, and *T. junceum* (*Triticeae: Gramineae*). *Genome*, **36**: pp 641-651

Lüttge U, Ratajczak R (1997) The physiology, biochemistry, and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. *Adv. Bot. Res.*, **25**: pp 253-296

Maas EV, Hoffman GJ (1977) Crop salt tolerance – current assessment. *J. Irr. Drain. Div. – ASCE.*, **103**: pp 115-134

Maathuis FJM, Ichida AM, Sanders D, Schroeder JI (1997) Roles of higher plant K⁺ channels. *Plant Physiol.*, **114**: pp 1141-1149

Marais GF, Marais AS (1994) The derivation of compensating translocations involving homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Euphytica*, **79**: pp 75-80

Marais GF, Marais AS (1998) Derivation of triticale plants with additions of *Thinopyrum distichum* chromosomes. In: Juskiw P, Dyson C (eds.) *Proc. 4th Int. Triticale Symp.*, Red Deer, Alberta, Canada, pp 33-36

Marais GF, Marais AS (2003) Identification of *Thinopyrum distichum* chromosomes responsible for its salt tolerance. *S. Afr. J. Plant Soil*, **20**: pp 103-110

Marais GF, Marais AS, Badenhorst PC (1998) Hybridization of *Thinopyrum distichum* and *Secale cereale*. *Plant Breeding*, **117**: pp 107-111

Marais GF, Ghai M, Marais AS, Loubser D, Eksteen A (2007) Molecular tagging and confirmation of *Thinopyrum distichum* chromosomes that contribute to its salt tolerance. *Can. J. Pure Appl. Sci.*, **1**: pp 1-8

Martin PK, Ambrose MJ, Koebner RMD (1994) A wheat germplasm survey uncovers salt-tolerance in genotypes not exposed to salt stress in the course of their selection. In: Aspects of applied biology 39, The impact of genetic variation on sustainable agriculture, The Association of Applied Biologists, Wellesbourne, pp 215-222

Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, **264**: pp 421-424

McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, **226**: pp 792-801

McCue KF, Hanson AD (1990) Drought and salt-tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.*, **8**: pp 358-362

Mergoum M, Pfeiffer W, Rajaram S, Pena RJ (1998) Triticale at CIMMYT: Improvement and adaptation. In: Juskiw P, Dyson C (eds.) *Proc. 4th Int. Triticale Symp.*, Red Deer, Alberta, Canada, pp 58-64

Miller TE, Hutchinson J, Chapman V (1982) Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **61**: pp 27-33

Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol. Breeding*, **3**: pp 87-103

Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, **3**: pp 175-182

Munns R (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.*, **16**: pp 15-24

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, **25**: pp 239-250

Munns R, James RA, Läuchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, **57**: pp 1025-1043

Nicot N, Chiquet V, Gandon B, Amilhat L, Legeai F, Leroy P, Bernard M, Sourdille P (2004) Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.*, **109**: pp 800-805

- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.*, **109**: pp 735-742
- Omielan JA, Epstein E, Dvořák J (1991) Salt tolerance and ionic relations of wheat as affected by individual chromosomes of salt tolerant *Lophopyrum elongatum*. *Genome*, **34**: pp 961-974
- Pienaar RdV (1981) Genome relationships in wheat x *Agropyron distichum* (Thunb.) Beauv. hybrids. *Z. Pflanzenzücht*, **87**: pp 193-212
- Pienaar RdV (1990) Wheat x *Thinopyrum* hybrids. *Biotechnol. Agr. Forest.*, **13**: pp 167-217
- Prins R, Marais GF, Janse BJH, Pretorius ZA, Marais AS (1996) A physical map of the *Thinopyrum*-derived *Lr19* translocation. *Genome*, **39**: pp 1013-1019
- Ren ZL, Lelley T, Röbbelen G (1990) The use of monosomic rye addition lines for transferring rye chromatin into bread wheat. 1. The occurrence of translocations. *Plant Breeding*, **105**: pp 257-264
- Rinehart TA (2004) AFLP analysis using GeneMapper® software and an Excel® macro that aligns and converts output to binary. *BioTechniques*, **37**: pp 186-188
- Röder MS, Korsun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganai MW (1998) A microsatellite map of the wheat genome. *Genetics*, **149**: pp 2007-2023
- Rubio F, Gassman W, Schroeder JI (1995) Sodium driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt-tolerance. *Science*, **270**: pp 1660-1663
- Rus AM, Estañ MT, Gisbert C, Garcia-Sogo B, Serrano R, Caro M, Moreno V, Bolarín MC (2001) Expressing the yeast *HAL1* gene in tomato increases fruit and enhances K⁺/Na⁺ selectivity under salt stress. *Plant Cell Environ.*, **24**: pp 875-880

- Sayed HI (1985) Diversity of salt-tolerance in a germplasm collection of wheat (*Triticum* spp.). *Theor. Appl. Genet.*, **69**: pp 651-657
- Schachtman DP, Munns R, Whitecross MI (1991) Variation in sodium exclusion and salt-tolerance in *Triticum tauschii*. *Crop Sci.*, **31**: pp 992-997
- Schachtman DP, Lagudah ES, Munns R (1992) The expression of salt-tolerance from *Triticum tauschii* in hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **84**: pp 714-719
- Schwarz G, Herz M, Huang XQ, Michalek W, Jahoor A, Wenzel G, Mohler V (2000) Application of fluorescence-based semi-automated AFLP analysis in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **100**: pp 545-551
- Sears ER (1972) Chromosome engineering in wheat. *Stadler Genet. Symp.*, **4**: pp 23-38
- Sears LMS (1973) Misdivision of five different 3B monosomes in 'Chinese Spring' wheat. *Proc 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, Missouri, USA, pp 739-743
- Sears ER (1977) An induced mutant with homoeologous pairing in wheat. *Can. J. Genet. Cytol.*, **19**: pp 585-593
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, **256**: pp 663-665
- Shan X, Blake TK, Talbert LE (2000) Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **98**: pp 1072-1078
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: pp 7719-7723

Sourdille P, Tavaud M, Charmet G, Bernard M (2001) Transferability of wheat microsatellites to diploid *Triticeae* species carrying the A, B and D genomes. *Theor. Appl. Genet.*, **103**: pp 346-352

Srivastava JP, Jana S (1984) Screening wheat and barley germplasm for salt tolerance. In: Staples RC, Toenniesen GH (eds.) *Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement*, Wiley, New York, pp 273-283

Szabolcs I (1994) Soils and salinization, In: Pessarakali M (ed.) *Handbook of plant and crop stress*, Marcel Dekker, New York, pp 3-11

Sze H, Li X, Palmgren MG (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell*, **11**: pp 677-689

Tester N, Davenport R (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot. - London*, **91**: pp 1-25

Tixier MH, Sourdille P, Charmet G, Gay G, Jaby C, Cadalen T, Bernard S, Nicolas P, Bernard M (1998) Detection of QTLs for crossability in wheat using a double haploid population. *Theor. Appl. Genet.*, **97**: pp 1076-1082

Varshney RK, Thiel T, Stein N, Langridge P, Grande A (2002) *In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **7**: pp 537-546

Vernon DM, Bohnert HJ (1992) A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.*, **11**: pp 2077-2085

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**: pp 4407-4414

- Wang RRC, Li XM, Hu ZM, Zhang JY, Larson SR, Zhang XY, Grieve CM, Shannon MC (2003) Development of salinity-tolerant wheat recombinant lines from a wheat disomic addition line carrying a *Thinopyrum junceum* chromosome. *Int. J. Plant Sci.*, **164**(1): pp 25-33
- Wolf O, Munns R, Tonnet ML, Jeschke WD (1991) The role of the stem in the partitioning of the Na⁺ and K⁺ in salt-treated barley. *J. Exp. Bot.*, **42**: pp 697-704
- Wu YY, Chen QJ, Chen M, Chen J, Wang XC (2005) Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene. *Plant Sci.*, **169**: pp 65-73
- Wyn Jones RG, Storey R, Leigh RA, Ahmad N, Pollard A (1977) A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: Marre E, Cifferi O (eds.) Regulation of cell membrane activities in plants, Elsevier, Amsterdam, pp 121-136
- Xue ZY, Zhi DY, Xue GP, Zhang H, Zhao YX, Xia GM (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Sci.*, **167**: pp 849-859
- Yu JN, Huang J, Wang ZN, Zhang JS, Chen SY (2007) An Na⁺/H⁺ antiporter gene from wheat plays an important role in stress tolerance. *J. Bioscience*, **32**(6): pp 1153-1161
- Zhang JY, Li XM, Wang RRC, Cortes A, Rosas V, Mujeeb-Kazi A (2002) Molecular cytogenetic characterization of E^b-genome chromosomes in *Thinopyrum bessarabicum* disomic addition lines of bread wheat. *Int. J. Plant Sci.*, **163**(1): pp 167-174
- Zhang LY, Bernard M, Leroy P, Feuillet C, Sourdille P (2005) High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theor. Appl. Genet.*, **111**: pp 677-687
- Zhang LY, Bernard M, Ravel C, Balfourier F, Leroy P, Feuillet C, Sourdille P (2007) Wheat EST-SSRs for tracing chromosome segments from a wide range of grass species. *Plant Breeding*, **126**: pp251-258

Zhien RG, Kim E, Rea PA (1997) The molecular and biochemical basis of pyrophosphatase-energized ion translocation at the vacuolar membrane. *Adv. Bot. Res.*, **27**: pp 297-337

Zhong GY, Dvořák J (1995) Chromosomal control of the tolerance of gradually and sudden imposed salt stress in *Lophopyrum elongatum* and wheat, *Triticum aestivum* L., genomes. *Theor. Appl. Genet.*, **90**: pp 229-236