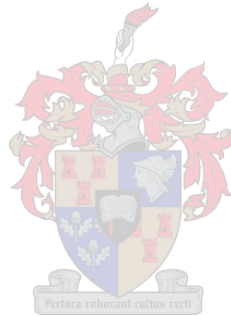


# **Poging om die *Aegilops sharonensis*-verhaalde *Lr56/Yr38* koringtranslokasie te verkort**

Pieter Engelbertus Badenhorst



Tesis ingelewer ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad van 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.

Datum: 15 September 2008

Kopiereg ©2008 Universiteit van Stellenbosch  
Alle regte voorbehou

---

## OPSOMMING

---

Die koring weerstandsgene, *Lr56* (blaarroes) en *Yr38* (streeproes), kom op 'n *Aegilops sharonensis*-verhaalde translokasie voor wat die volle 6AS chromosoomarm, asook die proksimale gedeelte van die 6AL chromosoomarm, beslaan. Die doel van hierdie studie was om rekombinante vorms van hierdie translokasie te identifiseer waarin oortollige vreemde chromatien grotendeels verwyder is maar waarin een of beide van die weerstandsgene steeds voorkom. Die planteteelt-program van die Universiteit van Stellenbosch het in Januarie 2007 'n homeoloë paringsinduksie eksperiment met die translokasie voltooi. Die eksperiment het gepoog om, in die afwesigheid van die *Ph1*-lokus, meiotiese rekombinasie tussen *Triticum aestivum* chromosoom 6A en die *Lr56/Yr38*-translokasie te bewerkstellig. Uit hierdie poging is 'n groot aantal toetskruis-F<sub>1</sub> nageslag verhaal wat in hierdie studie met behulp van molekulêre merkers getoets is ten einde verkorte vorms van die translokasie te identifiseer.

Kaarte van chromosoom 6A van *Triticum aestivum*, saamgestel deur Röder et al. (1998) en Sourdille et al. (2004), is geraadpleeg om potensieël-buikbare mikrosatellietmerkers te vind. Ses mikrosatellietmerkers is gebruik om die toetskruispopulasie, 06M04, inisieel te sif en rekombinante te identifiseer vir verdere karakterisering. Genetiese ontleding van hierdie data het daarop gedui dat die weerstandsgene waarskynlik op die 6AL arm, naby die translokasie-breekpunt geleë is. Die data het dit ook moontlik gemaak om 'n kleiner paneel van rekombinante, waaronder van die kortste vorms mag voorkom, te identifiseer. Vervolgens is nog drie mikrosatellietloci wat moontlik in die algemene omgewing van die weerstandsgene karteer, op hierdie kleiner paneel getoets.

Nadat die nuttige, beskikbare mikrosatellietmerkers uitgeput was, was dit nodig om verdere merkersisteme te beproef in 'n poging om die groep verkorte rekombinante nog verder te orden. Vir hierdie doel is AFLP-merkers beproef. Die kleiner paneel van rekombinante is getoets met 33 *MseI/EcoRI*-inleier kombinasies asook 'n *MseI/PstI*-inleier kombinasie.

Die AFLP-analise het ses polimorfiese loci gegeneer waarmee verdere verkorte translokasies geïdentifiseer is. Drie plante met die kortste translokasies is uit die oorspronklike groep van 156 bestande plante geïdentifiseer. Die translokasies in hierdie plante verskil waarskynlik min in

terme van fisiese grootte en mag moeilik wees om verder te orden. Omdat daar deurgaans gefokus is op die kartering van *Lr56*, sal die materiaal verder ontleed moet word ten einde vas te stel of *Yr38* steeds op die kortste translokasies voorkom. Die aansienlike reduksie in die grootte van die translokasie sal beslis die kommersiële benutbaarheid van *Lr56* (en *Yr38*?) verhoog. Dit sal egter nodig wees om die materiaal omvattend agronomies te toets ten einde te bevestig dat daar geen residuele, nadelige spesie-gene oorgebly het nie.



---

## SUMMARY

---

The wheat resistance genes, *Lr56* (leaf rust) and *Yr38* (stripe rust), occur on an *Aegilops sharonensis*-derived translocation which spans the entire 6AS chromosome arm as well as a large proximal region of 6AL. This study aimed to identify recombinant forms of this translocation in which excess foreign chromatin was replaced with common wheat chromatin without loss of the resistance genes. In January of 2007 the plant breeding program of the University of Stellenbosch conducted a homoeologous-pairing induction experiment with the translocation. The purpose of the experiment was to promote homoeologous meiotic recombination (through absence of the *Ph1*-locus) between *Triticum aestivum* chromosome 6A and the *Lr56/Yr38*-translocation. A large number of F<sub>1</sub> test-cross progeny was produced. In this study the material was characterized with molecular markers in order to identify useful, shortened forms of the translocation.

Maps of chromosome 6A of *Triticum aestivum* (Röder *et al.* 1998; Sourdille *et al.* 2004) were consulted to identify potentially useful microsatellite markers for mapping the translocation. Six microsatellite markers that span the translocated segment were then used in an initial characterization of the testcross-population, 06M04. This identified a subset of plants that were recombinants. Genetic analysis of the data showed that the resistance genes were probably located on the 6AL arm close to the translocation breakpoint. The data also made it possible to identify an even smaller panel of recombinants that were likely to include the shortest forms. Three additional microsatellite loci that were likely to occur in the general region of the resistance genes were identified and tested on the smaller panel.

In the absence of further useful, mapped microsatellite markers it was necessary to find additional markers in an attempt to further map the resistance and identify still shorter recombinants. The smaller panel of recombinants was therefore tested for polymorphic AFLP loci making use of 33 *MseI/EcoRI*-primer combinations as well as an *MseI/PstI*-primer combination.

The AFLP-analysis produced six polymorphic loci which could be used to identify further shortened translocations. Three of the original 156 leaf rust resistant plants that retained the

smallest amounts of foreign chromatin were identified. The translocations in these plants are probably similar in size and it may be difficult to determine which is the shortest. Since the study focused on mapping *Lr56* it will be necessary to also characterize the material for stripe rust resistance in order to locate *Yr38*. The large reduction in the size of the translocation will facilitate commercial utility of *Lr56* (and *Yr38*?). However, it will be necessary to do a thorough agronomic evaluation of the reduced translocations to ascertain that no deleterious species chromatin remained.

---

## BEDANKINGS

---

Opregte dank aan:

- Prof GF Marais vir u professionele kennis, bekwame leiding, bystand en waardevolle advies. Dit was 'n voorreg om u as studieleier te hê
- Ansie Marais vir al die tegniese bystand en geselskap in die laboratorium
- Al die mense van lab 239 vir al die lekker tye binne en buite die laboratorium. Spesiale dank aan Luigia Kotze, Jorik Visser, Aletta Eksteen en Jenn Honing vir die hulp in die laboratorium
- Al my vriende, wat hierdie jare vir my onvergeetlik gemaak het. Spesiale dank aan:
  - Benita Pretorius wat 'n konstante was oor my laaste ses jaar van studies – vir al jou vriendskap oor die jare
  - Ben Jordaan wat jare se frustrasies en blydskap gedeel het as woonstelmaat en vriend
  - Jasper Niesing – vir elke dag se visvang of jag avontuur
- My broer vir al sy broederlike liefde
- My ouers vir hulle onvoorwaardelike liefde en ondersteuning asook die opvoedingsgeleentede wat hulle vir my moontlik gemaak het
- Al die lof en eer aan Jesus Christus – vir die vermoëns en geleentede uit genade van Hom ontvang

---

## AFKORTINGS

---

A	Adenien
<i>Ae.</i>	<i>Aegilops</i>
AFLP	Geamplifiseerde-Fragmentlengte-Polimorfismes
ATP	Adenosien 5'-Trifosfaat
$\beta$ -ME	$\beta$ -merkptoetanol
bp	Basispaar
BSA	Bees-serum albumien
$^{\circ}$ C	Grade Celsius
C	Sitosien
CIMMYT	“International Maize and Wheat Improvement Center”
cm	Sentimeter
‘CS’	‘Chinese Spring’
CTAB	Setiel trimetielammonium bromied
DaRT	Diversiteits Reeks Tegnologie
ddH <sub>2</sub> O	Gedeïoniseerde gedistilleerde water
dH <sub>2</sub> O	Gedistilleerde water
DNS	Deoksiribonukleïensuur
dNTP	Deoksinukleotied trifosfaat
<i>EcoRI</i>	Endonuklease geïsoleer uit <i>Escherichia coli</i> ras R
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (Latyns: en andere)
EtBr	Ethidium-bromied
F	Voorwaarste
g	Gram
gDNS	Genomiese DNS
G	Guanien
GISH	Genomiese <i>in situ</i> hibridisasie
hr	Uur
Hz	Herts

ICARDA	“International Center for Agricultural Research in the dry Areas”
kb	Kilobasispaar
L	Lang arm van ‘n chromosoom
<i>Lr</i>	Blaarroes weerstandsgeen
m	Massa
M	Molaar (mol per liter)
Mbp	Megabasispaar
mg	Milligram
MgCL <sub>2</sub>	Magnesium-chloried
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
<i>MseI</i>	Endonuklease geïsoleer vanaf <i>Micrococcus</i> species
n	Haploïede chromosoomgetal
2n	Diploïede chromosoomgetal
Na <sub>2</sub> EDTA	Dinatrium etileendiamientetraasynsuur
NaCl	Natrium-chloried
ng	Nanogram
ng/μl	Nanogram per mikroliter
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammonium-sulfaat
p.	Bladsy
PAA	Poli-akriëlamied
PAGE	Poli-akriëlamied jel-elektroforese
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PKR	Polimerase kettingreaksie
pp.	Bladsye
<i>PstI</i>	Endonuklease geïsoleer uit <i>Providencia stuartii</i> 164
R	Terugwaartse
RAPD	Lukraak-Geamplifiseerde-Polimorfiese-DNS

RFLP	Restriksie-ensiem-fragmentlengte-polimorfisme
rpm	Revolusies per minuut
s	Sekonde(s)
S	Kort arm van 'n chromosoom
SCAR	Volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde-area
SNP	Enkel-nukleotied-polimorfisme
SSR	Eenvoudige-volgorde-herhaling
T	Timien
<i>T.</i>	<i>Triticum</i>
TBE	Tris-boraat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetrametyleendiamien
Tris	2-amino-2-hidroksiemetielpropaan-1,3-diol
U	Eenhede
US	Universiteit van Stellenbosch
UV	Ultraviolet
v	Volume
V	Volts
V.S.A.	Verenigde State van Amerika
W	Watt
m/v	Massa per volume
<i>Yr</i>	Streeproes weerstandsgeen
<i>Xbarc</i>	'Beltsville Agriculture Research Center' mikrosatellietlokus
<i>Xcfd</i>	'P. Sourdille; Clermont-Ferrand', mikrosatellietlokus
<i>Xgpw</i>	'P. Sourdille; Clermont-Ferrand', mikrosatellietlokus
<i>Xgwm</i>	'Gatersleben' mikrosatellietlokus
<i>Xwmc</i>	'Koring mikrosatelliet konsortium' mikrosatellietlokus
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

---

# INHOUDSOPGAWE

---

<b>VERKLARING</b> .....	<b>ii</b>
<b>OPSOMMING</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>v</b>
<b>BEDANKINGS</b> .....	<b>vii</b>
<b>AFKORTINGS</b> .....	<b>viii</b>
<b>INHOUDSOPGAWE</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. LITERATUUROORSIG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Triticum aestivum</i></b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 CHROMOSOOM MANIPULASIE</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 <i>Ph1</i> en homeoloë rekombinasie .....	7
<b>1.3 ROESSIEKTES VAN KORING</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Algemeen .....	11
1.3.2 Stamroes .....	13
1.3.3 Blaarroes.....	15
1.3.4 Streeproes .....	16
<b>1.4 KORING WEERSTANDSGENE</b> .....	<b>17</b>
<b>1.5 WILDE KORINGVERWANTE GRASSPESIES</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 <i>Aegilops sharonensis</i> .....	19
<b>1.6 MERKERS</b> .....	<b>20</b>
1.6.1 Morfologiese merkers .....	20
1.6.2 Proteïenmerkers.....	20
1.6.3 DNS-merkers.....	21
1.6.3.1 Restriksie-ensiem-fragmentlengte-polimorfisme (RFLPs) .....	22

1.6.3.2	Diversiteitsreeks-Tegnologie (DArT).....	23
1.6.3.3	Lukraak-geamplifiseerde-polimorfiese-DNS (RAPD).....	25
1.6.3.4	Mikrosatellietmerkers.....	26
1.6.3.5	Geamplifiseerde-Fragment-Lengte-Polimorfismes (AFLPs).....	29
1.6.3.6	Enkel-nukleotied-polimorfismes (SNP).....	30
<b>1.7</b>	<b><i>Lr56/Yr38</i>-TRANSLOKASIE AFKOMSTIG VAN <i>Ae. sharonensis</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAAL EN METODEDES .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>PLANT-MATERIAAL .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>DNS-ISOLERING.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3</b>	<b><i>Ph1</i>-DETEKSIE .....</b>	<b>36</b>
<b>2.4</b>	<b>MIKROSATELLIETANALISE VAN DIE <i>Lr56/Yr38</i>-TRANSLOKASIE.....</b>	<b>36</b>
2.4.1	Silwer-kleurings prosedure .....	38
<b>2.5</b>	<b>GEAMPLIFISEERDE-FRAGMENTLENGTE-POLIMORFISMES (AFLPs).....</b>	<b>40</b>
2.5.1	Restriksie-vertering van genomiese-DNS en ligering van passtukke .....	40
2.5.2	Pre-amplifikasie reaksie (nie-fluoesserend).....	41
2.5.3	Selektiewe-amplifikasie reaksie.....	41
2.5.4	Opsporing van die geamplifiseerde produk en data analise.....	42
<b>3.</b>	<b>RESULTATE EN BESPREKING .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b><i>ph1b</i>-SELEKSIE.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>MIKROSATELLIETMERKERS.....</b>	<b>47</b>
3.2.1	Toets vir rekombinasie met behulp van mikrosatelliet merkers .....	50
<b>3.3</b>	<b>GEAMPLIFISEERDE-FRAGMENTLENGTE-POLIMORFISMES (AFLPs).....</b>	<b>61</b>
3.3.1	Restriksie-vertering en ligasie van passtukke .....	61
3.3.2	Pre-selektiewe amplifikasie.....	62
3.3.3	Selektiewe amplifikasie.....	63
3.3.4	Deteksie van die selektiewe amplifikasieprodukte en data- analise .....	64
<b>4.</b>	<b>SAMEVATTING .....</b>	<b>71</b>



<b>5. BRONNELYS .....</b>	<b>73</b>
<b>6. ADDENDUM .....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 MIKROSATELLIETRESULTATE.....</b>	<b>92</b>
6.1.1 Xgwm427.....	92
6.1.2 Xgwm334.....	97
6.1.3 Xcfd190.....	99
6.1.4 Xbarc171 .....	100
6.1.5 Xgwm459.....	102
6.1.6 Xgpw2295.....	103
6.1.7 Xwmc256.....	104
6.1.8 Xgwm570.....	105
6.1.9 Xgwm617.....	106
<b>6.2 AFLP RESULTATE .....</b>	<b>108</b>

---

## 1. LITERATUUROORSIG

---

Gewasverbouing het ontwikkel namate vroeë bevolkings die voedingswaarde van sekere wilde plant- en dierspesies besef het en hierdie voedingsbronne gedomestikeer en begin selekteer het. Die gras-familie, *Poaceae*, omsluit 'n diverse, wydverspreide groep plante waaronder talle gedomestikeerde vorms. Mielies, rys, sorghum en koring is voorbeelde van ekonomies-belangrike gedomestikeerde grasse wat die *Poaceae* een van die belangrikste plant-families vir die mens maak. Hierdie gewasse voorsien die meeste van die wêreld se voedsel en selfs die wêreld-politiek word deur die produksie en verspreiding van hierdie graansoorte beïnvloed (Salem et al. 2007). Een van die oudste en belangrikste gedomestikeerde grasspesies in die *Poaceae* is *Triticum aestivum* L. (broodkoring). Broodkoring behoort tot die genus *Triticum* van die tribus *Triticeae*, en die ontstaan daarvan dateer terug tot vroeër as 9 500 V.C. (Evans & Peacock, 1981; Jauhar & Chibbar, 1999).

Vandag word koring wêreldwyd as stapelvoedsel verbou, met 'n jaarlikse produksie van 624.4 miljoen ton in 2005/6 (FAO, 2006). Dit is die volopste van alle verboude plantmateriaal en produseer ook die meeste droë materiaal vir menslike gebruik. Koring is boonop een van die volopste bronne van energie en proteïene en is een van die belangrikste voedselbronne wat die mensdom onderhou (Evans & Peacock, 1981; Salem et al. 2007).

Koring kan verwerk word tot meel en veevoer. Die meel van harde koring variëteite word normaalweg gebruik vir die produksie van brood en pasta terwyl die variëteite met sagter endosperm gebruik word vir die produksie van koekmeel. Die graan kan ook gefermenteer word om alkohol te lewer. As sulks kan koring gebruik word vir die distillasie van vodka en whisky; as 'n bestanddeel in die produksie van bier, en vir die maak van bio-brandstof. Meel is die belangrikste van al die bogenoemde produkte en word algemeen gebruik in gebak. Die groot verskeidenheid voedselprodukte wat met meel geproduseer kan word, lei tot 'n groot aanvraag vir die graan (Duke, 1983).

In Suid-Afrika word koring geplant in verskeie streke wat verspreid oor die land voorkom. Dit sluit die Wes-Kaap (droëland) in asook die noordelike dele van die land soos die Oranje- en Vaalrivier besproeiingsgebiede, droëland produksiegebiede van die Vrystaat, die Springbokvlakte

en Kwazulu-Natal. Die Wes-Kaap is 'n winterreënval-streek met matige winters, geskik vir die produksie van lentekoring, terwyl winters in die noordelike dele van die land normaalweg baie droog en koud is. Die koring (winter- en intermediêre tipes) wat in die Vrystaat onder droëland toestande verbou word, word met opgegaarde grondvog afkomstig van die vorige seisoen se reënval gevestig. Die meeste van Suid-Afrika se jaarlikse koring-oes van ongeveer 3 miljoen ton word onder droë-land toestande in die noorde van die land gekweek (Scott, 1990).

## 1.1 *Triticum aestivum*

Broodkoring (*T. aestivum* L. em Thell;  $2n = 6x = 42$ ) is 'n alloheksaploïed met drie genome naamlik die A-, B- & D- genome, wat elk sewe pare chromosome bevat. *T. aestivum* het evolusionêr deur twee unieke hibridisasie gebeurtenisse ontstaan: Die eerste hibridisasie het die diploïede A-genoom ( $2n = 14$ ) van die wilde spesie *Triticum urartu* Thum ev Gand. en die diploïede B-genoom ( $2n = 14$ ) van *Aegilops speltoides* Tausch betrek (Kilian et al. 2006). Die hibried het die sitoplasma van die B-genoom donor ontvang. Die tweede hibridisasie het ongeveer 9 500 jaar gelede plaasgevind nadat die gedomestikeerde tetraploïed (AABB,  $2n = 28$ ) na die weste van Iran geneem is waar dit met die diploïede D- genoom spesie, *Aegilops tauschii* Coss. gehibridiseer het om oorsprong te gee aan *T. aestivum*. Hibridisasie het weereens in die sitoplasma van die B-genoom donor geskied (Tsunewaki, 1991; Röder et al. 1998a; Jauhar & Chibbar, 1999; Francki & Appels, 2002; Levy & Feldman, 2002; Sourdille et al. 2004).

Die koring-genoom is baie groot ( $1.6 \times 10^{10}$  bp) met 'n gemiddelde chromosoomgrootte van 810 Mb, waarvan minder as 2.7 % 'n geen-bevattende fraksie is en meer as 80% herhalende, nie-koderende DNS uitmaak (Gupta et al. 1999; Semagn et al. 2006). Verspreid tussen die herhalende, nie-koderende streke kom daar lae-kopie-getal gene of enkelgene voor. Die genoomgrootte, groot herhalende streke en yl-verspreide gene maak die koring-genoom een van die mees komplekse genome van alle gewasse. Gedetailleerde RFLP-, koppelings- en fisiese kaarte van die genoom is alreeds gepubliseer vir al sewe homeoloë chromosoomgroepe (Röder et al. 1998a; Francki & Appels 2002; Schmidt, 2002; Akhunov et al. 2003).

Die 21 koring-chromosome word onderverdeel in drie homeoloë groepe, elke homeoloë groep is afkomstig van een van die drie voorouerlike diploïede spesies, dus van die A-, B- of D- genome

(Martínez-Pérez et al. 1999). Sears (1966) het vasgestel dat daar groter homologie tussen die A- en D- genoom homeoloë bestaan as tussen óf die A- en B- óf die B- en D- genoom homeoloë (Akhunov et al. 2003). Alhoewel die homeoloë chromosome verwant is aan mekaar, paar hulle normaalweg nie met mekaar tydens meiose nie. Onderdrukking van intergenomiese paring is belangrik vir die behoud van vrugbaarheid asook om die permanente heterosigotisiteit tussen homeoallele te bewaar (Levy & Feldman, 2002).

Sedert die domestikasie van koring was daar oor die eeue heen 'n konstante seleksie vir plante met gesogte kwalitatiewe fenotipiese kenmerke. Terselfdertyd is die gewas na geografies verskillende areas geneem en geplant. Sodoende is koring aan verskillende klimaat- en klimaatstoestande onderwerp. Hierdie geografiese verspreiding het verdere geleentheid geskep vir nuwe geen-mutasies en dus het 'n baie ryk, diverse genetiese poel ontstaan. Teeltegnieke vir die gewas het gaandeweg verbeter maar dit was slegs oor die laaste eeu dat genetiese verbetering op 'n kontinue wyse plaasgevind het. Moderne teeltegnieke gepaard met die volgehoue toepassing daarvan sedert die vroeë 1900's was instrumenteel tot die ontwikkeling van moderne, hoog-produiserende kultivars (Borlaug, 1968; Worland, 1999). Genetiese verbetering gepaard met verbeterde agronomiese praktyke soos die gebruik van hoër kunsmisvlakke, insekdoders, besproeiing en die uitbreiding van die oppervlakte onder verbouing het gelei tot 'n aansienlike verhoging in die globale produksie. Wêreldwyd het die area onder koringverbouing nie noemenswaardig vergroot sedert die 1960's nie, maar was daar 'n bykans drie-voudige verhoging in opbrengs. Die verhoging kan toegeskryf word aan verbeterde verbouingspraktyke met gepaardgaande teling van koring-kultivars met hoër opbrengspotensiaal en prosesseringsgehalte (Marshall et al. 2001). Met die groeiende wêreldbevolking, besoedeling en die tekort aan beskikbare grond, water en energie-reserwes, is daar vandag talle uitdagings wat oorkom moet word ten einde verdere opbrengsverhoging te bewerkstellig. Daar word beraam dat die globale jaarlikse graanproduksie met 2% moet styg om teen 2050 aan die voorspelde addisionele voedselbehoefte te voorsien (Gill et al. 2004). In hierdie konteks is die volgehoue genetiese verbetering van die gewas essensieel.

Die intensiewe en gefokusde seleksie-drukke wat die mensdom tydens domestikering, veral in die laaste eeu, op koring geplaas het, het egter 'n verval in genetiese diversiteit tot gevolg gehad.

Moderne verbouingspraktyke gebaseer op hoogs uniforme kultivars het die poel van potensieël nuttige gene dramaties laat krimp oor die afgelope 50 jaar. Dit kan veral toegeskryf word aan die verplasing van hoogs diverse koring landrasse in groot dele van die wêreld met 'n klein groep van hoë-opbrengs, suiwerlyn variëteite (Frankel, 1970; Evans & Peacock, 1981; Feldman, 1988). Die ontwikkeling en wêreldwye verspreiding van hierdie “verbeterde” variëteite het die eens diverse geenpoel drasties geskaad en baie van die potensieel bruikbare gene vanweë kiemplasma verwaarlosing tot niet laat gaan (Feldman & Sears, 1981; Feldman, 1988). Omdat die meeste variëteite se insek- of siekte-weerstandsvermoë normaalweg op slegs een hoofgeen gebaseer is, skep dit die potensiaal dat eenvoudige siekte-toestande in epidemies kan verval indien die hoofgeen deur 'n nuwe virulente biotipe of patotipe oorkom word.

Volgehoue genetiese verbetering hang grootliks saam met die beskikbaarheid van nuwe genetiese diversiteit. Om die kiemplasma-basis wat vir teling beskikbaar is te vergroot word daar nou gefokus op wilde koring-spesies asook naby verwante grasspesies as bron van nuwe variasie (Feldman, 1988; Francki & Appels, 2002; Ceoloni et al. 2005). Hierdie is die enigste bruikbare bronne van potensieel nuttige gene om die genetiese diversiteit van koring weer te verhoog (Evans & Peacock, 1981; Feldman & Sears, 1981; Gill et al. 1983; Feldman, 1988; Esquinas-Alcàzar, 1993). Koring het talle wilde verwante wat divers is in fenotipe en aanpassing. Die verskillende grasse varieer grootliks ten opsigte van chromosoomgetal, genoom-grootte en die fisiese grootte van die chromosome (Arumuganathan & Earle, 1991). Die wilde, verwante grasspesies is gevolglik 'n uitstekende bron van genetiese variasie wat gebruik kan word vir die ontwikkeling van koringgenotipes met verbeterde hitte-, koue-, droogte- of soutverdraagsaamheid; verbeterde pesweerstand en prosesseringskenmerke. Die oordrag van gene vanaf naby-verwante spesies is ook geredelik haalbaar en tegnieke (bv groeihormoon behandeling en/of weefselkultuur tegnieke) is ontwikkel wat dit moontlik maak om wilde spesies met koring te kruis (Evans & Peacock, 1981).

## **1.2 CHROMOSOOM MANIPULASIE**

Met die aanvang van bewustelike hibridisering en seleksie van koring het seleksie-programme gefokus op fenotipiese eienskappe met 'n kwalitatiewe basis. Gevolglik was seleksie van poligeniese kenmerke oneffektief en is baie min genetiese vordering met sodanige kenmerke

gemaak. Namate seleksie-metodologie en rekenaartegnologie ontwikkel is, is daar toenemend aandag gegee aan die verbetering van poligeniese en kwantitatiewe kenmerke (Francki & Appels, 2002). Oor die laaste dekades is 'n reeks sitogenetiese tegnieke ontwikkel wat dit moontlik maak om gene gedra op chromosoomsegmente vanaf naby-verwante genera en wilde spesies na verboude koring oor te dra (Gale & Miller, 1987; Knott, 1987). Die term "chromosome engineering" is deur Sears (1972) voorgestel om hierdie tegnieke te beskryf. Omdat koring 'n heksaploïed is, besit dit triplikaatstelle van gene wat dit buffer teen aneuploïede toestande. Hierdie buffereffek het tot gevolg dat die gewas baie geskik is vir die oordrag van gene vanaf vreemde spesies by wyse van chromosoom-manipulasie.

Die onlangse ontwikkeling van molekulêre merkers het verdere geleentheid geskep vir die meer effektiewe seleksie van kwantitatiewe kenmerke. Merker-tegnologie het ook die weg gebaan vir die oordrag van kwantitatiewe kenmerke vanaf wilde verwantes na verboude grane. Sodanige nuwe variasie kan nou met behulp van chromosoom-manipulasie-tegnieke oorgedra word na kommersieel-suksesvolle kultivars. Seleksie gebaseer op fenotipe alleen het dit vroeër bykans onmoontlik gemaak om hierdie kenmerke oor te dra vanweë die besonder swak agrotipes van die intermediêre hibriede. Met merker-tegnologie kan die koring geenpoel nou gediversifiseer word deur die introgressie van nuwe spesie-gene vir kwantitatiewe kenmerke om sodoende verbeterde kultivars tot stand te bring (Francki & Appels, 2002).

Chromosome van een genoom kan tot 'n mindere of meerdere mate kompenseer vir die verlies van 'n homeoloog in 'n ander genoom, dus kan koring die monosomiese-, of selfs nullisomiese staat van 'n chromosoom verdra. Elke chromosoom het twee ander homeoloë chromosome wat die afwesigheid van gene kan buffer. Verder kan ekstra chromosome (trisomie, tetrasomie en selfs addisies vanaf 'n verwante spesies) verdra word. Poliploïede stel dus 'n geskikte platform daar vir chromosoom-manipulasie eksperimente (Sears, 1972; Endo & Gill, 1996; Jauhar & Chibbar, 1999).

Chromosoom-manipulasie tegnieke het wye aanwending gevind reeds voordat DNS-klonering en transformering van plante moontlik was. Groot genetiese verbetering in koring is bewerkstellig deur die introgressie van vreemde chromosoom-segmente met gewenste gene vanuit verwante

grasspesies (Jauhar & Chibbar, 1999; Francki & Appels, 2002). Hierdie nuwe kiemplasma hou groot voordeel in vir die verbetering van koring reg oor die wêreld in terme van insek- en siekteweerstand, opbrengspotensiaal en planttipe (soos byvoorbeeld bewerkstellig deur die verdwergings- (*Rht*-) gene). Algemene probleme geassosieer met die oordrag van gene uit wilde koring is kruis-onverenigbaarheid, steriliteit en verlaagde opbrengs te wyte aan gekoppelde, nadelige gene (Gill et al. 1983).

As gevolg van die poliploïede aard van koring, kan dit growwe chromosomale afwykings verdra. So byvoorbeeld het Endo en Gill (1996) 'n reeks delesie-lyne in Chinese Spring ('CS') gemaak met gebruik van 'n addisie-chromosoom met gametosied-effek wat vanaf *Aegilops cylindrica* oorgedra is. Drie honderd agt-en-dertig homosigotiese delesie-lyne wat al die 'CS' chromosome betrek is met behulp van C-bande geïdentifiseer en word deur selfbestuiwing onderhou (Endo & Gill, 1996). Hierdie delesie-lyne is baie nuttig in die fisiese kartering van koring-chromosome en is veral belangrik vir die kartering van DNS-merkers (Endo & Gill, 1996). Röder et al. (1998a) en Sourdille et al. (2004) het ook van hierdie delesie-lyne gebruik gemaak om mikrosatelliet-loci toe te ken aan gebiede op koring-chromosome.

Sears (1954) het volledige reekse aneuploïede, wat wissel vanaf nullisomiese tot tetrasomiese lyne, vir elk van die 21 'CS' chromosome ontwikkel. Hieronder was daar mono-, tri-, & tetrasomiese lyne vir al die chromosome van koring (Sears, 1954). Later is daar 42 nullisomiese-tetrasomiese lyne ontwikkel. Dit was moontlik omdat homeoloë chromosome kan kompenseer vir die verlies van 'n chromosoom-paar indien een van die homeoloë chromosoompare dubbeld voorkom (Sears, 1966). Aneuploïede kan spontaan in heksaploïede koring ontstaan indien die homoloë van een of meer bivalente nie daarin slaag om tydens meiose te paar nie (asinapse), of te vroeg dissosieer (desinapse). Monosomiese en trisomiese lyne is die mees algemene tipes aneuploïede wat natuurlik voorkom. Aneuploïede kan ook ontstaan uit inter-spesifieke kruisings tussen tetraploïede en heksaploïede spesies. Hierbenewens kan chemiese mutagense en bestraling ook gebruik word vir die induksie van aneuploïedie (Quisenberry, 1967). Aneuploïede het 'n belangrike hulpmiddel geword vir onder andere die kartering van spesifieke gene. Nullisomiese plante word verkry na selfbestuiwing van monosomiese plante. 'n Nullisomiese plant kort een paar van sy homoloë chromosome en is dikwels manlik steriel. Hierdie lyne word (net soos die

nulli-tetrasomiese lyne) nuttig aangewend vir die toewysing van gene aan spesifieke chromosome en is ook deur Sears (1966) gebruik om chromosome te orden in die sewe homeoloë groepe van die A-, B- en D- genome (Sears, 1966; Quisenberry, 1967).

Die ontstaan van koring is gekenmerk deur spesievorming op die diploïede en poliploïede vlakke en daar het nog 'n sekere mate van homologie oorgebly tussen (en met) die spesies waaruit koring ontstaan het. Dit is dus moontlik om die naby-verwante spesies (wilde korings = primêre geenpoel) wat homoloë genome met koring deel, normaalweg met mekaar en met koring te kruis. Met sitogenetiese manipulasie is dit verder ook moontlik om genetiese materiaal van minder verwante grasspesies (sekondêre geenpoel) oor te dra na koring indien hul met mekaar kan kruis. Die wilde grasspesies is 'n uitstekende geenpoel vir die verbetering van koring en as gevolg van hulle vêrlangse verwantskap bestaan daar 'n groter kans om nuwe (variante) gene na koring oor te dra. Met selfs nog minder verwante spesies (tersiêre geenpoel) is daar egter soms probleme met die ontwikkeling van 'n intergeneriese hibried vanweë onverenigbaarheid tussen die twee spesies, nie-lewensvatbare F<sub>1</sub>-hibriede en steriliteit van die F<sub>1</sub>-hibriede (Gale & Miller, 1987).

### ***1.2.1 Ph1 en homeoloë rekombinasie***

Minder verwante spesies het teoreties meer “vreemde” gene wat nie in koring voorkom nie, en wat potensieel baie belangrik kan wees vir die genetiese verbetering van koring. Chromosoomparing gedurende meiose in interspesifieke hibriede is baie raar indien die koring en vreemde spesie ouers nie 'n genoom in gemeen het nie, met ander woorde as hul genome homeoloog eerder as homoloog aan mekaar is. Dit het egter in die laaste 50 jaar moontlik geword om wel hierdie vreemde (homeoloë) gene doeltreffend by wyse van meiotiese oorkruising na koringchromosome oor te dra. 'n Deurbraak is gemaak in die oordrag van vreemde (homeoloë) gene en chromosoom-segmente met die ontdekking dat 'n dominante geen op chromosoom 5B meiotiese paring tussen chromosome van die A-, B- en D- genome inhibeer (Okamoto, 1957; Riley & Chapman, 1958). Die geen, *Ph1*, kom op die lang arm van chromosoom 5B voor (Sears, 1972; Gale & Miller, 1987) en indien beide kopieë van die geen afwesig is, of onderdruk word, mag meiotiese paring en oorkruising van homeoloë chromosome wel geskied. In die afwesigheid van *Ph1* sal homoloë paring steeds by voorkeur geskied maar in die afwesigheid van homoloë chromosome mag homeoloë paring plaasvind. Dus kan meiotiese paring van vreemde



chromosome met hulle koring homeoloë bewerkstellig word deur die weglating van chromosoom 5B.

Die *Ph* (“pairing homoeologous”) sisteem bestaan uit die *Ph1* geen wat op chromosoom 5BL voorkom en wat die grootste onderdrukkende effek op homeoloë paring het; die *Ph2* geen op chromosoom 3DS wat ‘n intermediêre onderdrukker van homeoloë paring is; asook ‘n aantal ander gene wat kleiner onderdrukkende of bevorderende effekte op homeoloë paring het (Sears, 1976; Feldman & Sears, 1981). Die rol van die *Ph* onderdrukker-gene is om homeoloë paring tussen koring-chromosome en vreemde, homeoloë chromosome van donor-spesies te onderdruk om so diploïed-agtige paring van die A-, B- & D- genome in die heksaploïede spesie toe te laat. Dus beperk dit dikwels die introgressie van nuwe gene vanaf wilde spesies na die koring-genoom. Genoom-stabiliteit word egter op die manier bewerkstellig. Homeoloë paring kan eksperimenteel geïnduseer word deur die weglating van chromosome 5B (waar die *Ph1* geen voorkom) of 3D (waar die *Ph2* geen voorkom); die deleisie van die *Ph* gene self of deur die onderdrukking van hul onderdrukkende reaksies (Sears, 1981).

Metodes bestaan vir die eliminerings van die *Ph1* geen om sodoende paring tussen homeoloë koring-chromosome of tussen koring-chromosome en vreemde spesie chromosome te fasiliteer. Indien hierdie tipe paring (sg. allosindetiese of homeoloë paring) en rekombinasie kan plaasvind, kan geen-oordrag aansienlik vergemaklik word. Sears (1977) het die tegniek verder verbeter deur ‘n *Ph1*-deleisie-mutant, *ph1b*, met behulp van X-straal geïnduseerde mutagenese te skep. Die metodes wat tans in die praktyk gebruik word om ‘n *Ph1*-lose toestand te skep en homeoloë oorkruising te bewerkstellig, sluit in: i) kruisings met *ph1b/ph1b* homosigote (Sears, 1977); ii) die gebruik van ‘n nullisomiese-5B-tetrasomiese-5D lyn, waarin chromosoom 5B afwesig is, en die *Ph1* geen dus afwesig is en iii) deur koring te kuis met sekere wilde spesies, bv. *Ae. speltoides*, waarvan die genoom ‘n onderdrukkende effek op die *Ph1* geen het (Jauhar & Chibbar, 1999; Taketa, 2005).

Chromosoommanipulasie vir die oordrag van teiken-gene uit wilde verwantes berus meesal op die induksie van homeoloë paring in die afwesigheid van *ph1b*. Omdat die tegniek gebaseer is op meiotiese paring en oorkruising, verseker dit dat introgressie van nuwe gene geskied na

sinteniiese streke op 'n verwante koring-chromosoom. Translokasies wat op die wyse geproduseer word is dus meesal kompenserend van aard (Mujeeb-Kazi & Rajaram, 2002). Daar is egter ook ander metodieke beskikbaar om translokasie van vreemde chromosoomgedeeltes na koring-chromosome moontlik te maak. Sommige van hierdie tegnieke berus egter op die ontstaan van toevallige chromosoombreuke en toevallige hegting van gebreekte chromosoomente. Gevolglik is translokasies wat op die wyse ontstaan dikwels nie-kompenserend van aard omdat dit lei tot die duplikasie/delesie van chromosoomstreke. Metodieke wat in hierdie klas ressorteer is somaklonale variasie-skepping en die gebruik van chemiese en fisiese mutagense (Nilan, 1981; Metha & Angra, 2000).

Translokasies tussen vreemde en koring-chromosome kan ook bewerkstellig word deur die uitbuiting van die geneigdheid van univalente om by die sentromeer te breek tydens meiotiese meta-/anafase I (Sears 1972; Zang et al. 2001; Marais et al. 2005). Gelyktydige sentromeriese breuke in twee verskillende chromosome gevolg deur lukraak hegting van twee telosentriese arms mag lei tot die vorming van 'n Robertsoniese translokasiechromosoom (Schubert et al. 1995). Hierdie tipe translokasies kom gereeld in plante voor (Jones, 1978) en speel moontlik 'n groot rol in kariotipe evolusie (Schubert et al. 1995). Deur die gebruik van dubbel monosomie kan so 'n heel arm translokasie geïnduseer word tussen 'n vreemde chromosoom en 'n verwante koring-chromosoom. 'n Heel arm translokasie kan egter baie ongewenste gene bevat wat koppelings-sleuring sal veroorsaak en sal dus nog verder verkort moet word (Jauhar & Chibbar 1999; Marais et al. 2005).

Bestraling kan in assosiasie met chromosoom-manipulasie-tegnieke gebruik word vir die induksie van chromosoom translokasies. Die identifikasie van hierdie translokasies is egter moeilik en word gebaseer op toetskruising met monosomiese lyne, *in situ* hibridisasie of C-bande. Genomiese *in situ* hibridisasie (GISH) is 'n verdere robuuste tegniek vir die identifikasie van vreemde chromatien in 'n koring agtergrond (Chai, 1994; Li et al. 2000).

Tydens 'n translokasie na koring word gewenste asook nadelige gene oorgedra. Boonop verplaas hierdie translokasie 'n groot chromosomale segment van *T. aestivum* waarop daar kwalitatiewe asook kwantitatiewe gene voorkom wat nodig mag wees vir hoër opbrengs, siekteweerstand,

bakkwaliteit, ens. Chromosoom-manipulasie behels dus nie net die induksie en oordrag van translokasies van vreemde spesies na koring nie, maar ook die verdere manipulering van hierdie translokasie om sodoende die oorgedraagde segment so klein as moontlik te maak, maar die gewenste gene te behou. Hierdie proses kan gefasiliteer word deur die manipulering van die homeoloë parings onderdrukker geen, *Ph1*.

‘n Vreemde chromosoomsegment kan verkort word deur meiotiese paring met ‘n homeoloë koring-chromosoom segment te induseer (Sears, 1981; 1983). Dit kan gedoen word deur ‘n translokasie heterosigoot te produseer wat terselfdertyd geen kopie van *Ph1* het nie en byvoorbeeld homosigoties *ph1b/ph1b* is. Die plant kan dan met ‘n geskikte toetskruisouer gekruis word en die toetskruis F<sub>1</sub>-nageslag kan met merkers getoets word om te bepaal of daar rekombinasie plaasgevind het. Rekombinante kan herwin word waarvan die breekpunte proksimaal of distaal van die teikengeen voorkom. Die kortste rekombinant van elke tipe kan nou geïdentifiseer en gebruik word om die translokasie selfs verder te verkort. Deur beide rekombinante chromosome (waarvan die een se breekpunt aan die distale kant van die geteikende geen lê en die ander se breekpunt proksimaal) in dieselfde plant te plaas, kan daar deur gewone homoloë oorkruising (binne die homoloë area van vreemde chromatien wat die teikengeen begrens) oorkruisingsprodukte geproduseer word met ‘n verder verkorte interkallêre translokasie (Sears, 1981, 1983).

Die hoofdoel van planteteeltprogramme is om variëteite daar te stel met hoër saad-opbrengs of biomassa-produksie. ‘n Nuwe variëteit moet kan weerstand bied teen heersende biotiese en abiotiese stremmings. Hierbenewens is die kwaliteit en voedingswaarde van die produk ook baie belangrik. In hierdie verband kan chromosoom-manipulering benut word om die genetiese diversiteit van koring-kiemplasma te verbreed deur nuwe gene vanaf wilde spesies te verkry.

## 1.3 ROESSIEKTES VAN KORING

### *1.3.1 Algemeen*

Chromosoom manipulering word algemeen toegepas om siekte weerstandsgene na koring oor te dra. Vergeleke met ander grane is koring meer vatbaar vir siektes. Siekte besmettings vererger in nat seisoene en lei tot groot finansiële verliese in die graan- en voedselbedrywe (Ruden et al. 2003). Vanweë die groot areas waarop variëteite met monogeniese weerstand gewoonlik aangeplant word kan 'n siektetoestand vinnig versprei en epidemies raak. Die vinnige verspreiding van 'n patogeen kan beperk word deur gelyktydige benutting van diverse weerstandsgene. Dit kan byvoorbeeld bewerkstellig word met gebruik van multilyne met verskillende, effektiewe weerstandsgene of alternatiewelik, die seleksie van plante met kombinasies van effektiewe weerstandsgene (Singh & Rajaram, 2006).

'n Wye reeks bakteriese-, swam- en virus-spesies kan siekte-toestande in koring veroorsaak. Hiervan is die swampatogene, waaronder die roes-tipes val, die mees algemene en skadelikste plant-parasiete. Swampatogene is hoogs aanpasbaar by verskillende omgewings en is van die belangrikste siektes in elk van die ses mega-omgewings soos omskryf deur die "International Maize and Wheat Improvement Center" (CIMMYT) (Rajaram et al. 1993). Swamme besit nie chlorofil nie en kan dus nie fotosinteer om sodoende hul eie voedsel te produseer nie; hulle kry hul voedingstowwe uit ander organiese weefsel. Die swamme kan versprei word deur wind, water, insekte, diere asook die mens (Prescott et al. 1986; Staples, 2000).

In koring kom daar drie verskillende roessiektes voor, nl. stam-, streep- en blaarroes. Hierdie is die belangrikste siektes in die graanbedryf en lei tot drastiese oesverliese. Die versamelnaam vir die siektes is afkomstig van die geel-rooi, roesagtige voorkoms van die urediospore wat deur die epidermis van die koringplant breek. Die voorkoms van roes is hoër in die lente- en somermaande maar dit kom deur die hele jaar voor as die saailinge begin opkom. Die rede vir die hoër voorkoms in die lente- en somermaande is omdat die teliospore-fase eers deur 'n koue fase moet gaan (in gebiede waar 'n geslagtelike fase voorkom) voordat dit kan ontkiem. Roes word nie beperk tot enige gedeelte van 'n plant nie en kan op enige bogrondse gedeelte van die plant

voorkom en meer as een van die siektes kan gelyktydig op 'n plant voorkom (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987).

Deur die geskiedenis was daar talle gedokumenteerde gevalle van reg oor die wêreld rakende roes-epidemies wat groot skade aangerig het. Gedurende die periode 1977-1987 was oesverliese te wyte aan roessiektes in Noord-Amerika alleen 'n geskatte een miljoen metrieke ton per jaar (Wiese, 1987). In die jaar 2000 het die mees wydverspreide streeproes-epidemie in die geskiedenis in meer as 20 state van die V.S.A. voorgekom. Die siekte het multimiljoene dollars se skade aangerig en die kultivar RSI 5 het verliese van tot 50 % getoon in die Sacramento-San Joaquin Delta area van Kalifornië (Chen et al. 2002).

Behalwe die verlies in saadopbrengs, verlaag die roessiektes ook die gehardheid van winterkoring en maak die plant meer vatbaar vir ander siektes. Die swamliggaam breek deur die epidermis wat lei tot verhoogde respirasie en transpirasie asook 'n afname in die fotosintese-vermoë van die plant. Al hierdie faktore dra by tot afname in groeikrag, saadset en wortelgroei (Wiese, 1987).

Die lewensiklus van die roesswamme is soortgelyk aan mekaar en verskil meesal ten opsigte van die alternatiewe gasheer waarop 'n gedeelte van die swam se lewensiklus voorkom. So byvoorbeeld kom daar in die lewensiklus van stamroes vyf sporulasie fases voor, nl:

Spoorfase 0: Spermogonia

Spoorfase 1: Aeciospore in aecia

Spoorfase 2: Urediospore in uredia

Spoorfase 3: Teliospore in telia

Spoorfase 4: Basidiospore op basidia

Beide die urediospoor- en teliospoorfase ontwikkel op die primêre gasheer, o.a. koring, terwyl die spermatogonium- en aeciospoorfase op die alternatiewe gasheer, o.a. die suurdoring ('barberry') voorkom. Die basidiospore is 'n oorgangsfase en infekteer die alternatiewe gasheer. Infeksie van die koringplant geskied in die lente deur die aeciospore. Die aeciospore ontkiem op die blare van die koringplant indien toestande gunstig is en vrye water daarop voorkom. Die swam penetreer

die gasheer deur die huidmondjies en ontwikkel 'n mycelium binne die blaar wat voedingstowwe uit die plant begin onttrek. Die mycelium gee oorsprong aan urediospore wat in “puisies” (uredinia) voorkom. Die epidermis van die gasheer bars oop met die ontwikkeling van die urediospore en die spore word vrygestel aan die omgewing. Hierdie fase kan 'n aantal kere herhaal word en dus die infeksie vinnig versprei. Namate die koringplante volwassenheid bereik en die herfs aanbreek, verander die urediospore-fase na die twee-sellige teliospore-fase. Die teliospore besit 'n dikker selwand en is geskik om die winter te oorleef op oorblywende plantmateriaal. In die volgende lente kan elke teliospore ontkiem en 'n basidiospore vorm. Basidiospore infekteer egter die alternatiewe gasheer en nie koring nie. Met die infeksie van die alternatiewe gasheer vorm daar spermogonia. Elke spermogonium bestaan uit 'n manlike ('spermatia') en vroulike ('hyphae') gedeelte. Hierdie is die swam se geslagtelike fase. Sonder bevrugting van die 'hyphae' deur die 'spermatia' kan die aeciospore-fase nie ontwikkel nie. Die aecia kom op die blare van die suurdoring voor en produseer aeciospore wat weer die koringplant infekteer (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987).

### ***1.3.2 Stamroes***

Stamroes word veroorsaak deur *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. en parasiteer koring, gars, sekere rogsoorte, wilde gars (*Hordeum murinum* L.), bokgras (*Aegilops* spp.) en strandkoringgras (*Agropyron distichum* P. Beauv.) (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987; Murray et al. 1998; Scott, 1990). Hierdie plante is primêre gasheer waarop die swam beide die urediospore (ongeslagtelike fase) en teliospore (geslagtelike fase) kan produseer (Scott, 1990). 'n Deel van die swam se lewensiklus geskied op die suurdoring (*Berberis vulgaris* L.; *B. fendleri* & *B. canadensis* Mill.) asook sekere *Mahonia* spesies. In Suid-Afrika kan die swam nie sy lewensiklus voltooi nie aangesien die alternatiewe gasheer nie inheems aan Suid-Afrika is nie (Scott, 1990). Die swam kan egter ongeslagtelik voortbestaan op die primêre gasheer. Daar is meer as 300 stamroesrasse bekend. Die verskillende rasse kan onderskei word op grond van die infeksie-reaksies wat verkry word na besmetting van standaard differensiële koring-genotipes (Quisenberry & Reitz, 1967).

Die uredia van *P. graminis* f. sp. *tritici* kom grootliks op die stam en nek van die koringplant voor maar is nie tot hierdie dele beperk nie en kan op enige bo-grondse gedeelte ontwikkel. Die

roespuisies is lank en smal en kan 'n grootte van 3 X 10  $\mu\text{m}$  bereik. Die urediospore gee aan die roespuisie 'n oranje-rooi kleur wat later na swart verander namate die teliospore vorm. Die urediospore is 15-24 X 21-40  $\mu\text{m}$  in grootte en besit 'n ovaal vorm terwyl die teliospore tweesellig, ellipsoïed-vormig is met 'n grootte van 15-20 X 40-60  $\mu\text{m}$  (Wiese, 1987). *P. graminis* kan in matige temperature in sy teliospore stadium op opslagplante oorleef maar in minder gunstige omgewings word beide gasheer benodig vir oorlewing.

Stamroes is die mees wydverspreide graansiekte en kom wêreldwyd voor waar koring aangeplant word. In die geskiedenis is daar verskeie groot stamroes-epidemies gedokumenteer. Die 1904 epidemie in die V.S.A. het aanleiding gegee tot die ontstaan van die eerste plantpatologie departement. Die 1906 epidemie in die V.S.A. het 'n geraamde verlies van 38% van die koring-oes tot gevolg gehad. Hierdie epidemie het veroorsaak dat die V.S.A. vergrote finansiële steun vir stamroes navorsing en koring weerstandstelling aangekondig het. Die "Federal-State Barberry Eradication Program" het ook na hierdie epidemie die lig gesien. Omdat die uredium-stadium van *P. graminis* nie die winters van die noordelike V.S.A. kan oorleef nie, kan die swam slegs op sy alternatiewe gasheer, suurdoring, oorleef. In hierdie program is gepoog om al die suurdoring te verwyder en so te verhoed dat *P. graminis* in die noordelike V.S.A. kan oorwinter. Die epidemie van 1935 het 'n opbrengsverlies van 50% in Noord- en Suid-Dakota asook Minnesota veroorsaak. Met die 1953 en 1954 epidemies is daar onderskeidelik 65% en 75% van die durum-oes in die V.S.A. aan stamroes afgestaan. Tussen 1951 en 1960 het jaarlikse oesverliese in die V.S.A. ongeveer 4% van die totale koring-opbrengs beloop (Quisenberry & Reitz, 1967). Vir jare lank was daar wêreldwyd geen groot stamroes epidemies nie. Die suurdoring-projek tesame met die voortdurende gebruik van weerstandsgene het gelei tot 'n afname van stamroes inokulum.

Die mees kommerwekkende onlangse uitbraak van stamroes behels die ras Ug99 wat virulensie teen *Sr31* toon, en vir die eerste keer in 1999 in Uganda (Oos Afrika) waargeneem is. Ras Ug99 het intussen na die hoof koring produserende streke van Iran versprei. 'n "Globale Roes Inisiatief" is as gevolg van die Ug99 uitbraak geïnisieer deur die "International Center for Maize and Wheat Improvement" (CIMMYT) asook die "International Center for Agricultural Research in the dry Areas" (ICARDA) om te help met die onmiddellike probleme in Oos-Afrika asook om 'n potensiële wêreldwye probleem te voorkom (Borlaug, 2005).

### ***1.3.3 Blaarroes***

Blaarroes is 'n verpligte parasiet wat veroorsaak word deur *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. Die swam kom primêr op koring voor en is 'n swak parasiet van sekere garskultivars (Scott, 1990; Wiese, 1987). Die swam plant selde geslagtelik voort alhoewel daar alternatiewe gashere gevind word. In Israel en Griekeland is die alternatiewe gasheer *Ornithogalum umbellatum* (Murray et al. 1998) en in die Wes-Kaap kom die alternatiewe gasheer, *Anchusa* spp. volop voor (Scott, 1990). Die ongeslagtelike (urediospore) fase is die belangrikste fase en is die oorsaak van blaarroes-epidemies. Beide urediospore (ongeslagtelike spore) asook teliospore (geslagtelike spore) word op die primêre gasheer geproduseer.

*P. recondita* kom oral voor waar koring aangeplant word, maar kom meesal in matige klimate voor (Murray et al. 1998). Die siekte word gekarakteriseer deur die ontwikkeling van klein, oranje-bruin puisies wat verspreid op meesal die boonste oppervlakte van die blaar voorkom (Quisenberry & Reitz, 1967; Murray et al. 1998). Blaarroes ontwikkel by temperature van 15-22 °C, met 'n hoë humiditeit of andersins waar water nie 'n beperkende faktor is nie (Wiese, 1987; Scott, 1990; Murray et al. 1998). Temperature bo 25°C verlaag egter die tempo van sporulasie (Murray et al. 1998). As gevolg van die temperatuur-voorkeur begin die uredium-fase van die swam reeds in die vroeë tot middel somer. Die uredia produseer urediospore wat doeltreffend in droë, winderige omstandighede na ander plante kan versprei. Die uredia kan 'n grootte van 1.5 mm in deursnit bereik en urediospore produseer met 'n deursnit van 15 – 30 µm (Wiese, 1987). Met die nuwe infeksie sal dit 7 tot 10 dae neem totdat nuwe, volwasse urediospore geproduseer word. Verskeie generasies kan geproduseer word tot en met die tyd dat die plant volwassenheid bereik. Die swam kan dus in 'n baie kort tyd 'n epidemiese hoeveelheid inokulum produseer (Quisenberry & Reitz, 1967). Met laat verskyning van die uredium fase, kan daar egter net 'n beperkte aantal generasies geproduseer word voordat die plant volwassenheid bereik en die urediale fase vervang word met die teliale fase (Quisenberry & Reitz, 1967). Die telia kom op die onderste oppervlakte van die blare voor en is dieselfde grootte as die uredia. Omdat die telia onder die epidermis van die plant voorkom het dit 'n dowwe, "glansagtige" swart voorkoms.

Die skade wat blaarroes aan koring-oeste aanrig word gereeld onderskat omdat die siekte die oeste nie heeltemal vernietig of te veel skade aan die saad aanrig nie. 'n Swaar infeksie van



blaarroes het eerder 'n negatiewe effek op die grootte van die saad wat verkry word. Verder word daar minder sade per aar geproduseer en neem die kwaliteit van die saad af deurdat die proteïen-inhoud verlaag word terwyl die koolhidraat-inhoud verhoog word. Swaar infeksies verhoog ook die transpirasie-tempo van die plant sodat die water wat per plant benodig word, toeneem. Die plant se algehele groeikrag word aangetas wat lei tot verlaagde koue-gehardheid in winterkoring. Groot verliese word gelei as gevolg van afsterwing van die swakke plante wat nie die winter kan oorleef nie (Quisenberry & Reitz, 1967).

### ***1.3.4 Streeproes***

Streeproes is 'n verpligte parasiet en word veroorsaak deur *Puccinia striiformis* West. Die parasiet se primêre gasheer is rog, koring en 95 ander grasspesies in 18 genera (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987). Dit kom in baie dele van die wêreld voor maar is beperk tot koue, hoogliggende gebiede asook koue omgewings (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987). Meer as 3 000 rasse is bekend (Quisenberry & Reitz, 1967). Die naam is afkomstig van die manier waarop die uridia puisies in 'n liniêre volgorde op die volwasse blare gerangskik is. Op jong blare kom die puisies verspreid voor (Murray et al. 1998). Die uredia is geel en verskyn vroeg in die lente op die blaar. Soos die seisoen vorder kan daar puisies op die are ontwikkel. Die swampuisies is 0.5-1 X 0.25-0.5 mm groot en as dit bars stel dit groot hoeveelhede, helder-geel urediospore vry wat met die wind versprei word (Murray et al. 1998). Die urediospore is sferies en 20-30 µm in deursnit (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987). Die optimale temperatuurreeks vir ontkieming van urediospore is 3 °C tot 15 °C maar ontkieming kan by enige temperatuur tussen 0 °C en 21 °C geskied (Wiese, 1987). Die telia puisies kom sub-epidermaal in die blaarskedes voor, is donker-bruin van kleur en liniêr gerangskik. Die teliospore lyk soortgelyk aan die teliospore van *P. recondita* f. sp. *tritici* maar het nie koue nodig voordat dit kan ontkiem nie (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987).

In Europa is geelroes die roestipe wat die meeste skade kan aanrig; algehele oes-verliese is al aangeteken. In 1960 en 1961 het daar twee groot epidemies in die Pasifiese Noordweste van die V.S.A. voorgekom wat onderskeidelik verliese van 12,500,000 en 25,000,000 skepels ("bushels") aangerig het (Quisenberry & Reitz, 1967). Streeproes affekteer beide die kwaliteit en opbrengs van koring. Dit word teweeggebring deur verlaging van die aantal halms per plant, die aantal sade

per aar asook die grootte en gewig van die sade. Die planthoogte, stamdikte en wortelontwikkeling word ook nadelig geaffekteer (Quisenberry & Reitz, 1967).

Stamroes, blaarroes en streeproes is verpligte parasiete en is hoogs gespesialiseerd. Daar bestaan groot variasie binne die patogeen-populasies, veral in terme van virulensie teen spesifieke weerstandsgene. As gevolg van die hoë tempo van mutasie, migrasie en rekombinasie tussen verskillende virulente patogeenrasse kan hierdie patogene vinnig virulensie ontwikkel teen bestaande weerstandsgene in kommersiële kultivars. Dus is deurlopende weerstandsteling noodsaaklik om sodoende ekonomiese verliese weens roes-infeksie te minimaliseer (Quisenberry & Reitz, 1967; Wiese, 1987).

## **1.4 KORING WEERSTANDSGENE**

Weerstandsgene kan breedweg onderverdeel word in ras/kultivar-spesifieke (vertikale of hoofgeen) weerstand, ras nie-spesifieke of horisontale weerstand en nie-gasheer weerstand. Nie-gasheer weerstand word deur alle plantspesies geopenbaar wat nie 'n gasheer vir 'n spesifieke patogeen is nie (Singh & Rajaram, 2006). Ras/kultivar-spesifieke weerstand word beheer deur die interaksie tussen die produk van 'n dominante/semi-dominante hoofweerstandsgen, met groot of matige effek, en die komplementêre produk van 'n ooreenstemmende avirulensie-gen van die patogeen. Hierdie tipe weerstandsgene het gewoonlik 'n beperkte leeftyd van vyf tot tien jaar na vrystelling in kommersiële variëteite. Ras nie-spesifieke (horisontale) weerstand is effektief teen alle rasse van 'n patogeen. Die genetiese aard van hierdie tipe roesweerstand is gewoonlik kompleks en gebaseer op additiewe interaksies van 'n verskeidenheid van gene met klein of matige weerstandseffekte. Caldwell (1968) het stadige roesontwikkeling ("slow rusting") en partiële weerstand gedefinieer as weerstandstipes waar die siekte teen 'n vertraagde tempo vorder, en matige tot lae vlakke van siekte tot gevolg het. Hierdie is 'n vorm van onvolledige weerstand.

Oor die jare is daar meesal van hipersensitiewe (ras/kultivar-spesifieke) weerstand gebruik gemaak in koring teelprogramme. Die rede hiervoor is dat dit makliker is om enkelgene met groot effekte in nuwe kiemplasma te inkorporeer. Die probleem met so 'n benadering is egter dat

die gene spoedig oorkom word as nuwe virulente rasse deur mutasie of rekombinasie in die patogeen ontwikkel. Dit het wetenskaplikes genoop om te soek vir beter alternatiewe.

Jensen (1952) en Borlaug (1953) het die multilyn benadering voorgestel na die algemene mislukking van ras-spesifieke gene in enkelgeen-gebaseerde variëteite. In die 1960s en 1970s is daar weer gekyk na ras nie-spesifieke weerstand en moontlike benutting daarvan in koringverbetering. Laasgenoemde strategie is toegepas vir die teling van blaarroes-weerstand deur o.a. Caldwell (1968), stamroes-weerstand deur o.a. Borlaug (1972) asook streeproes-weerstand deur o.a. Johnson (1988). Die ras nie-spesifieke benadering tot weerstandstelling was vir meer as 25 jaar die vernaamste strategie in CYMMIT se broodkoring verbeterings-program (Singh & Rajaram, 2006).

Geenstapeling in agronomies meerwaardige genotipes is 'n verdere benadering wat moontlik die epidemiese verspreiding van patogene sal kniehalter. Geenstapeling behels die gelyktydige uitdrukking van meer as een weerstandsgene in 'n enkele variëteit (Shelton et al. 2002). Dus word 'n aantal teikengene van verskeie genotipes in 'n enkele koringgenotipe saamgevoeg. Om dit te bewerkstellig word geen-spesifieke ras inokulum en molekulêre merkers ingespan om verskeie gene in segregerende populasies te volg om sodoende plante te identifiseer wat weerstandsgene bevat vir verskillende patogeenrasse of selfs verskillende siektes (Sharma & Miska 2005).

Vanweë die vermoë van patogene om die bestaande weerstandsgene te oorkom moet daar voortdurend gesoek word na nuwe weerstandsgene, of nuwe, nuttige kombinasies van bestaande weerstandsgene, beide binne die bestaande koring-kiemplasma asook naby-verwante spesies of genera.

## **1.5 WILDE KORINGVERWANTE GRASSPESIES**

Die ontwikkeling van nuwe snelweë en woongebiede aan die kusgebiede van Israel vernietig daaglik groot areas van die natuurlike habitat van wilde koring en verwante spesies (Millet, 2006). Baie van hierdie spesies is in onmiddellike gevaar van uitsterwing en omgewingsdegradering binne die natuurlike oorsprongsgebiede van koring kan lei tot die verlies

van baie waardevolle kiemplasma/genetiese variasie wat in teelprogramme benut kon word. Wilde verwantes kan as bronne van variasie vir weerstand/verdraagsaamheid ten opsigte van 'n wye reeks biotiese en abiotiese stremmings-toestande asook kwantitatiewe en kwalitatiewe variasie vir prosesserings- en agronomiese kenmerke gebruik word (Evans & Peacock, 1981; Feldman & Sears, 1981; Feldman, 1988; Millet, 2006). Die versameling en bewaring van soveel as moontlik diverse genotipes van hierdie wilde spesies is dus van groot belang (Millet, 2006).

### ***1.5.1 Aegilops sharonensis***

*Aegilops sharonensis* (*Gramineae*) is 'n wilde grasspesie wat verlangs verwant is aan verboude koring. *Ae. sharonensis* ( $2n = 14; S^{sh}S^{sh}$ ) behoort tot die Sitopsis-seksie van die genus *Aegilops*, wat die S-genoom besit (Bothmer et al. 1992). Die S-genoom is nader verwant aan die B-genoom van heksaploïede koring as aan die A- en D-genome, maar dit is nie homoloog daaraan nie (Kimber & Feldman, 1987). Die introgressie van nie-homoloë chromosoomgedeeltes is aansienlik moeiliker as die introgressie van homoloë chromosoomstreke (Marais et al. 2006). Die spesie is egter naby genoeg verwant aan verboude koring om geredelik daarmee gehibridiseer te word. *Ae. sharonensis* kan dus ontgin word as bron van nuttige variasie vir koringteelt, maar word tans onder-benut. Hierdie gras toon weerstand teen siektes soos blaar- en streeproes en is daarom 'n potensieël nuttige bron van nuwe weerstandsgene vir koring-verbetering (Taketa et al. 2005).

*Ae. sharonensis* kom natuurlik voor aan die kusgebiede van Israel en Suid-Libanon waar dit op sanderige grond en gestabiliseerde duine groei. Die spesie is egter op die rand van uitsterwing aangesien die natuurlike habitat vernietig word vir die konstruksie van nuwe paaie en woongebiede in die kusstreke van Israel (Millet, 2006). Die Lieberman Geenbank van Tel-Aviv Universiteit onderhou 'n versameling van bykans 2 000 monsters van *Ae. sharonensis* wat vanaf 30 verskillende areas binne die natuurlike habitat van die spesie versamel is. Hierdie fasiliteit onderhou die grootste bestaande versameling van die betrokke spesie en ander Sitopsis spesies. Monsters word al sedert 1981 versamel en in 2003 en 2004 is 'n deeglike opname gemaak van nuwe areas waar verdere monsters versamel kan word en is gepoog om die areas waar die spesies voorkom te karteer (Ezrati et al. 2005).

## 1.6 MERKERS

Die ontdekking van die beginsels van oorerwing deur Mendel in 1866 het die benutting van enkelgeen-merkers in genetiese studies ingelui (Klug & Cummings, 2003). Sodanige enkelgeen-merkers is daargestel deur mutasies wat morfologiese plant-kenmerke ge-afekteer het en is oorwegend gebruik tot en met die ontwikkeling van proteïen- en later DNS-merkers (Tanksley, 1983).

### *1.6.1 Morfologiese merkers*

Variasie in morfologiese merkers word gegrond op die afwyking daarvan vanaf die wilde-tipe fenotipe van die plant (Klug & Cummings, 2003). Kenmerke soos blomkleur, saadkleur, saadvorm en stamlengte (Mendel se eksperimente met ertjies) asook al die genetiese variasie beskryf in Muller se studies met *Drosophila* is voorbeelde van morfologiese merkers (Klug en Cummings, 2003). Alhoewel morfologiese merkers nuttig was in verskeie navorsingsgebiede, is hul bruikbaarheid in planteteelt baie beperk (Tanksley, 1983). Verder mag hulle beïnvloed word deur omgewingsfaktore asook die ontwikkelingsstadium van die plant. Die ontwikkeling van meer informatiewe molekulêre (proteïen- en DNS-) merkers het daarom gelei tot aansienlike uitbreiding van die toepassingsmoontlikhede in planteteelt.

### *1.6.2 Proteïenmerkers*

Isosieme is in 1957 deur Hunter en Markert ontdek en het die grondslag gelê vir elektroforetiese analise van proteïene (Zeidler, 2000). Markert en Moller het egter eers in 1959 isosieme gedefinieer as die verskillende molekulêre vorms waarin 'n proteïen met dieselfde ensiematiese aktiwiteit mag voorkom. Hiervolgens kom daar verskillende variante van dieselfde ensiem, met soortgelyke of identiese funksie, in een individu voor. Isosieme is dus die produkte van homoloë gene by verskillende loci (Zeidler, 2000). Allosieme is daarenteen alternatiewe tipes ensieme geproduseer deur allele van dieselfde geen. Isosiem-variante kan uitgeken word met behulp van jel elektroforese vanweë hul aminosuur-lading verskille (Mueller en Wolfenbarger, 1999). Die gewildheid van isosieme het egter eers na 1966 toegeneem met die ontdekking deur John Hubby en Richard Lewontin dat daar polimorfismes (proteïen-variasies) van isosieme binne dieselfde

natuurlike populasie van *Drosophila* voorgekom het (Zeidler, 2000; Klug en Cummings, 2003). Sedertdien is daar baie toepassings vir proteïen-merkers gevind (Tanksley, 1983).

Isosieme en allosieme word Mendelies oorge-erf en is ko-dominante merkers. 'n Groot nadeel van isosiem-merkers is dat hulle nie so volop soos DNS-gebaseerde merkers is nie. Proteïen-polimorfismes geskied wel op die DNS-vlak maar slegs in koderende areas van die genoom (Dudnikov, 2003). Verder is proteïen-merkers weefsel- sowel as ontwikkelingstadium-spesifiek (Montarroyos et al. 2003).

### ***1.6.3 DNS-merkers***

Die ontdekking van restriksie endonukleases (Meselson & Yuan, 1968) het die eerste geleentheid geskep om die samestelling van 'n organisme op DNS-vlak te ontleed. Die eerste van die molekulêre merkers was restriksie-ensiem-fragmentlengte-polimorfismes (RFLPs – Botstein et al. 1980). Met die ontwikkeling van die polimerase kettingreaksie (PKR)-tegniek (Mullis et al. 1986) het verskeie ander molekulêre merkertegniese die lig gesien. Hieronder was merkersisteme soos lukraak-geamplifiseerde polimorfiese-DNS (RAPDs – Williams et al. 1990), eenvoudige-volgorde-herhalings of mikrosatelliete (SSRe – Weber & May, 1989) en geamplifiseerde-fragmentlengte-polimorfismes (AFLPs – Vos et al. 1995) (Powell et al. 1997; Gupta 1999; Jaccoud et al. 2001; Kilian et al. 2005; Akbari et al. 2006; Semagn et al. 2006).

Gupta (1999) het molekulêre DNS-merkers breedweg in drie groepe geklassifiseer naamlik: (1) Hibridisasie-gebaseerde DNS-merkers soos RFLP; (2) PKR-gebaseerde DNS-merkers soos RAPDs, SSRe, AFLPs asook (3) DNS-skyfies ('chips') en volgorde-gebaseerde DNS-merkersisteme soos SNPs.

DNS-merkers teiken spesifieke volgorde-polimorfismes wat op DNS-vlak tussen individue van 'n spesie of groepe individue mag voorkom. Enkel nukleotied veranderinge, invoegings/delesies en VNTRe (variërende-getal-tandem-herhalings = "variable number of tandem repeats") is die drie mees algemene variasies wat op DNS-vlak voorkom en polimorfismes tussen individue/spesies veroorsaak en word reg oor die genoom gevind (Savelkoul et al. 1999; Batley et al. 2003). DNS-merkers kom oorfloedig in die genoom voor, is onafhanklik van

omgewingsfaktore, is nie weefsel-spesifiek nie en kan op enige stadium van die plant se ontwikkeling gegenotipeer word (Merdinoglu et al. 2000). DNS-merkers vind groot toepassing in planteteelt en help om die ontwikkeling van nuwe variëteite te bespoedig deur vinnige en akkurate opsporing van spesifieke eienskappe in die nageslag (Gupta 1999; Salem et al. 2007). Beide morfologiese en proteïenvariasies is die gevolg van verandering op die DNS-vlak; DNS-merkers is egter baie meer informatief as morfologiese of proteïenmerkers wat slegs 'n klein fraksie van alle DNS-polimorfismes verteenwoordig.

Die populariteit van DNS-merkers vir 'n wye verskeidenheid van gebruike (onder andere genoom-analise, kartering, DNS-vingerafdrukke, ens.) het oor die laaste jare toegeneem. Die ontwikkeling van gedetailleerde fisiese en genetiese chromosoomkaarte is een van die hoof gebruike van DNS-merkersisteme (Gupta et al. 1999; Semagn et al. 2006).

## **HIBRIDISASIE GEBASEERDE METODES**

RFLPs was die eerste molekulêre merkersisteme. Dit was vir lank die vernaamste merkertipe en is gereeld in genetiese studies met plante gebruik. Die tegniek is egter tydrowend en arbeidsintensief (Powell et al. 1997; Gupta et al. 1999). Onlangs is 'n nuwe hibridisasietegniek ontwikkel naamlik diversiteit-reeks-tegnologie (DArT – Jaccoud et al. 2001; Wenzl et al. 2007). In teenstelling met SNP-merkersisteme is DArT 'n tegnologie wat goed werk in poliploïede spesies soos broodkoring (Akbari et al. 2006; Wenzl et al. 2007)

### ***1.6.3.1 Restriksie-ensiem-fragmentlengte-polimorfisme (RFLPs)***

Die tegniek is gebaseer op die vertering van gDNS met een of meer endonukleases om DNS-fragmente te genereer. Die endonuklease wat vir die vertering gebruik word, word geselekteer op grond van die koste en effektiwiteit vir opsporing van variasie (Phillips & Vasil, 1994). Die gevormde fragmente word op grond van molekulêre gewig geskei (jel elektroforese) en gevisualiseer met behulp van chemiese (ethidiumbromied- of silwer-) of radioaktiewe (<sup>32</sup>P- of <sup>35</sup>S-) kleuring. Waargenome verskille tussen individue of populasies in hierdie “verteringsprofiel” dui op polimorfismes as gevolg van basis-substitusie binne 'n verteringssetel,

invoegings/delesies van DNS tussen verteringssetels of volgorde-herrangskikking wat natuurlik voorkom en Mendelies oorgeërf word (Avisé, 1994; Phillips & Vasil, 1994).

Die snyding van gDNS met 'n endonuklease produseer egter 'n groot aantal DNS-fragmente afhangend hoe gereeld die spesifieke restriksiesetel in die genoom voorkom. Om die aantal fragmente wat ontleed moet word te verminder, kan gebruik gemaak word van enkelstring, radioaktief-gemerkte peilers wat met spesifieke fragmente kan hibridiseer. Net fragmente wat gehibridiseer het met die peiler word met behulp van outoradiografie gevisualiseer. Polimorfismes tussen individue word gereflekteer in die verskil in hul bandpatrone (Avisé, 1994). Enkel- of lae-kopiegetal-volgorde peilers word verkies om die aantal fragmente wat daaraan hibridiseer te minimiseer en sodoende die analise te vergemaklik (Phillips & Vasil, 1994).

RFLP-merkers het die basis gevorm vir baie van die kartering-werk wat met koring en ander spesies gedoen is (Langridge et al. 2001) en daar is gevolglik verskeie gedetailleerde genetiese en fisiese RFLP-kaarte beskikbaar vir al sewe homeoloë groepe koringchromosome (Gao et al. 2004).

Die gebruik van RFLP-merkers om tussen koring-variëteite te onderskei word beperk deur 'n lae vlak van intraspesifieke polimorfisme (Röder et al. 1995; Bryan et al. 1999). RFLP-analise word verder beperk deur die hoë arbeids-insette betrokke, die groot hoeveelheid DNS benodig vir restriksie-vertering en hibridisasie, asook al die vereistes en kostes verbonde aan radioaktiewe isotope en outoradiografie (Phillips & Vasil, 1994; Powell et al. 1997; Gupta et al. 1999). Hierdie tegnologie word gevolglik stelselmatig vervang met nuwer, PKR-gebaseerde merkersisteme wat klein hoeveelhede DNS gebruik, vinniger en goedkoper as RFLPs is, en wat nie radioaktiewe deteksie vereis nie (Merdinoglu et al. 2000; Langridge et al. 2001).

### ***1.6.3.2 DiversiteitsreeksTegnologie (DArT)***

DArT is 'n hibridisasie-gebaseerde alternatief vir die meerderheid jel-gebaseerde merkersisteme. Die tegniek is deur Dr. Andrzej Kilian ontwikkel wat die DNS-mikroreeks ("microarray") konsep aangepas het na 'n DNS-polimorfisme analise wat duisende polimorfiese loci, verspreid oor die genoom, gelyktydig kan tipeer (Jaccoud et al. 2001; Mace et al. 2008). Dit bied dus 'n lae-koste,



hoë-deurset, robuuste sisteem wat klein hoeveelhede DNS benodig maar genoomwye dekking bied sonder enige vooraf-kennis van die genoom (Jaccoud et al. 2001; Huttner et al. 2005; Semagn et al. 2006). DArT-genotipering is aanvanklik vir rys ontwikkel (Jaccoud et al. 2001) maar die beginsel is sedertdien oorgedra na verskeie ander spesies, onder andere rys, gars, koring, appel, cassava, sorghum, *Arabidopsis*, muis, bees en skaap (Huttner et al. 2005; Mace et al. 2008; <http://www.DiversityArrays.com>).

Die prosedure vir die ontwikkeling van 'n DArT-merkersisteem vir 'n spesifieke organisme/toepassing (bv. broodkoring) verloop breedweg soos volg. 'n Groot aantal polimorfiese loci wat verspreid voorkom oor die “metagenoom” van die spesie, word eers opgespoor. Die metagenoom word gesimuleer met gebruik van 'n verteenwoordigende monster van die genome binne die totale kiemplasma-poel (in hierdie geval *T. aestivum*). Hierdie DNS-poel word eers aan 'n kompleksiteitsvermindering prosedure onderwerp. Die proses maak gebruik van restriksie-endonukleases en die ligering van passtukke aan die verkreë sny punte om 'n herhaalbare, gedefinieerde fraksie van gDNS te amplifiseer. Hierdie fragmente staan bekend as die ‘genomiese verteenwoordiging’ (‘genomic representation’). 'n Genomiese verteenwoordiging met 'n gemiddelde fragmentlengte van 300 tot 700 bp werk goed op die mikroreeks platform. Fragmente word nou in *E. coli* gekloneer waarna individuele klone op 'n ‘ontdekkings DArT-reeks’ (‘discovery array’) geheg word (Kilian et al. 2005; Huttner et al. 2005; Mace et al. 2008).

Individuele genome wat ingesluit is in die (metagenoom-) poel word onderwerp aan die kompleksiteits-vermindering prosedure. Hul ‘genomiese verteenwoordiging’ word met fluoresserende merkers gemerk en dan op die bogenoemde ‘ontdekkings DArT-reeks’ geïbridiseer om sodoende polimorfismes tussen die verskillende monsters te identifiseer. Die sein-intensiteite van elke kloon word geanaliseer met DArTsoft-sagteware wat dit in 'n binêre data-formaat, naamlik teenwoordig (“1”) of afwesig (“0”), stoor. DArT-merkers is dus dominant. Deur die relatiewe sein-intensiteite te vergelyk kan ko-dominante merkers ook genotipeer word. Polimorfiese klone (DArT-merkers) word geïdentifiseer as daardie klone wat variasie toon tussen verskillende individue op grond van die hibridisasie-sein intensiteite. Al die polimorfiese klone word dan geneem en op 'n ‘genotiperende DArT-reeks’ (‘genotyping array’) geheg. Laasgenoemde kan nou geïbridiseer word met die monsters wat geanaliseer moet word deur die gebruiker (Kilian et al. 2005; Huttner et al. 2005; Mace et al. 2008). Klone en volgorde-inligting

is beskikbaar vir elke DArT-merker, gevolglik kan enige polimorfisme wat nou koppeling toon met 'n nuttige geen boonop die basis vorm vir omskakeling na 'n SCAR-merker (Volgorde gekarakteriseerde geamplifiseerde area).

Mace et al. (2008) het getoon dat DArT eweredig-verspreide, hoë-kwaliteit merkers bied wat gebruik kan word vir diversiteitsanalise en die konstruksie van 'n medium-digtheids genetiese koppelingskaart. Die groot aantal DArT-merkers wat in 'n enkele reeks gegenereer word maak dit ook moontlik om 'n presiese skatting van die genetiese verwantskap tussen verskillende genotipes te maak.

### ***Koring DArT***

As gevolg van die grootte en poliploïede aard van die koring-genoom is dit moeilik om dit met molekulêre merkers te bestudeer. 'n Genotiperende DArT-reeks is deur 'Triticarte® Genotyping Services' ([www.triticarte.com.au](http://www.triticarte.com.au)) ontwikkel en DNS-monsters kan met gebruik hiervan ontleed word. Daar is bewys dat die tegnologie effektief toegepas kan word vir die genotipering van poliploïede spesies met groot genome soos die van broodkoring (Kilian et al. 2005; Akbari et al. 2006). Die DArT-datastel wat in koring gegenereer kan word is vergelykbaar met die huidige-beskikbare, gekombineerde datastelle van koring RFLPs, SSRs en AFLP-merkers (Akbari et al. 2006; Semagn et al. 2006). Verder is getoon dat DArT-merkers, net soos SSR- en AFLP-merkers, oorwegend in die geen-ryke telomeriese areas karteer (Akbari et al. 2006).

## **AMPLIFIKASIE GEBASEERDE METODES**

### ***1.6.3.3 Lukraak-geamplifiseerde-polimorfiese-DNS (RAPD)***

RAPDs (Williams et al. 1990) is 'n DNS-polimorfisme-toets wat berus op die amplifikasie van lukrake DNS-segmente met enkel-inleiers (gebaseer op lukrake nukleotied-volgordes). Die merkersisteem spoor polimorfismes op in die afwesigheid van spesifieke nukleotied-volgorde-inligting. Die lukrake inleier-volgordes is opgemaak uit 9-10 nukleotiede met 'n G/C-inhoud van tussen 50 % - 80 %. Vir 'n mutasie om die RAPD-patroon te verander, moet dit in die inleier bindingsarea voorkom of moet dit die DNS-lengte tussen die inleier bindingsetels verander.

Polimorfismes word opgespoor deur die gevisualiseerde, geamplifiseerde produkte van verskillende individue na elektroforese te vergelyk (Williams et al. 1990; Forster et al. 2000). RAPD-polimorfismes is dominant en word Mendelies oorgeërf (Williams et al. 1990).

RAPD-merkers kan in 'n verskeidenheid plant genetiese studies gebruik word, nl: (i) genetiese diversiteit-, variasie- en verwantskap-studies; (ii) opsporing, identifikasie en/of kartering van molekulêre merkers gekoppel aan 'n spesifieke kenmerk; (iii) bevestiging van kruisingshibriede; (iv) genetiese kartering asook (v) somaklonale variasie-analise (Williams et al. 1990; Salem et al. 2007). In koring word RAPDs hoofsaaklik gebruik vir die merk en opsporing van teikengene; identifisering en merk van fragmente afkomstig van vreemde chromosome; bepaling van genetiese verwantskap tussen *Triticum* sp. en verwante spesies asook die ontleding van die diversiteit van koring-variëteite (Salem et al. 2007).

Verskeie studies het die lae herhaalbaarheid van RAPDs uitgewys. Die lae herhaalbaarheid kan die gevolg wees van nie-spesifieke paring vanweë die lae hegtingstemperatuur wat in die PCR-kondisies gebruik word (Welsh & McClelland, 1990; Salem et al. 2007). RAPD-merkers kan egter na meer spesifieke en betroubare volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde-area (SCAR-) merkers omgeskakel word (Myburg et al. 1997). 'n SCAR-merker word verkry indien 'n RAPD-merkerfragment gekloneer word; die volgorde daarvan bepaal word en inleiers spesifiek vir die fragment ontwerp word. Hierdie inleiers sal dan lokus-spesifiek wees (Weising et al. 2005)

Alhoewel AFLP-analise meer effektief en herhaalbaar is, kan RAPDs steeds nuttig aangewend word in minder volledig toegeruste laboratoriums (Salem et al. 2007).

#### **1.6.3.4 Mikrosatelliet merkers**

Mikrosatelliet- of SSR- (eenvoudige volgorde herhaling = “simple sequence repeat”) ontleding is 'n PCR- (polimerase-kettingreaksie-) gebaseerde merkertegniek waar klein tandem-herhaalde eenhede van 2-6 nukleotiede, met 'n maksimum lengte van 60 bp, geamplifiseer word. Hierdie herhaalde, gekonserveerde DNA-volgordes in die genoom word ook beskryf as VNTRe. Die herhalende gedeelte word begrens deur unieke nukleotiedvolgordes, wat as inleiers gebruik kan word (Röder et al. 1998b). Die inleiers word ontwerp om die genomiese area te amplifiseer

waarbinne daar 'n goed-gedefinieerde herhalingsvolgorde (mikrosatelliet) voorkom. VNTR-streke word gekenmerk deur 'n hoë mate van herhalingslengte polimorfismes wat nuttig aangewend kan word in genetiese en karteringsstudies (Goldstein & Pollock, 1997). PCR is 'n kragtige en sensitiewe tegniek wat slegs klein hoeveelhede DNS benodig en 'n eenvoudige DNS-ekstraksie protokol gebruik (Li et al. 2002).

Hierdie klein herhaalde eenhede kom in die meeste eukariotiese genome voor en stel merkers daar wat baie nuttig aangewend kan word vir genetiese studies asook merkerbemiddelde seleksie. Mikrosatelliete word wydverspreid in die genome van hoër organismes aangetref, en is al in elke organisme wat vir die teenwoordigheid daarvan getoets is, gevind. Die frekwensie en tipe van SSRs varieer egter grootliks tussen spesies. SSRs word algemeen beskryf as evolusionêr-neutrale DNA-merkers. Dinukleotied-herhalings is die mees algemene SSR en maak sowat 48 – 67% van alle SSRs uit (Goldstein & Pollock, 1997; Gupta et al. 1999; Hayden et al. 2001; Li et al. 2002). Die merkers is volop, ko-dominant, hoogs polimorfies en kan met 'n eenvoudige PCR-reaksie geamplifiseer word. Röder et al. (1998a) het die eerste koring genetiese kaart wat op mikrosatellietmerkers gebaseer was bekendgestel. Hulle het die polimorfiese mikrosatellietmerkers by 'n bestaande RFLP genetiese raamwerk ge-integreer. Die aantal bruikbare merkers het bykans verdubbeld met hierdie inisiatief.

Die polimorfiese aard van mikrosatelliete kan toegeskryf word aan variasie in die aantal herhalings van die SSR tussen verskillende genotipes. Verskille in die aantal herhalings is die gevolg van die hoë mutasietempo ( $10^{-2} - 10^{-6}$  mutasies per lokus per generasie) van hierdie DNS-volgordes. Dit is aansienlik hoër as die voorkoms van puntmutasies by koderende loci. Twee mutasie-meganismes kan verduidelik waarom daar so 'n hoë tempo van mutasie voorkom, naamlik: DNS-glyding gedurende DNS-replikasie asook ongelyke rekombinasie tussen DNS-molekules. Die herhaalde motief, alleelgrootte, chromosoomposisie, GC-inhoud in aangrensende DNS, meiose en mitose, die geslag van die organisme, asook die genotipe van die organisme kan 'n vêrdere invloed op die mutasietempo hê (Li et al. 2002).

Mikrosatelliete is genetiese merkers wat 'n sterker diskriminerende vermoë het as enige ander merker-klas. Hierdie merkers is van groot nut vir die genetiese analise van organismes met 'n

nuwe genetiese basis, soos broodkoring. 'n Groot gedeelte van die nie-koderende genomiese-DNS bestaan uit SSR's vergeleke met 'n klein fraksie in proteïen-koderende streke. Morgante et al. (2002) het gevind dat alle SSR-tipes, behalwe tri- en heksanukleotied-herhalings, teen 'n laer frekwensie voorkom in die 25 762 voorspelde proteïen-koderende volgordes in ses plantspesies (insluitend sojabone, rys, koring, mielies en *Arabidopsis*). Die verskynsel mag die gevolg wees van seleksie teen leesraam-verskuiwing-mutasies in koderende areas. Morgante et al. (2002) het verder gevind dat trinukleotied-SSR's twee maal meer gereeld voorkom in die koderende gedeeltes vergeleke met die nie-koderende streke van die ses plantspesies. Dit kan toegeskryf word aan moontlike positiewe seleksiedruk vir spesifieke enkel aminosuur-herhalings in 'n proteïen, aangesien trinukleotied (kodon) herhalings in 'n proteïen-koderende area 'n ekstra aminosuur invoeg (Li et al. 2002; Morgante et al. 2002).

Mikrosatelliete is baie kragtige genetiese merkers vir hoë-resolusie genetiese kartering vanweë hul polimorfiese aard, hoë digtheid van voorkoms in die eukariotiese genoom en maklike evaluering. Die koring mikrosatellietmerkers se inleiervolgordes amplifiseer dikwels nie net die mikrosatelliet-lokus nie maar ook addisionele fragmente wat op ander chromosome mag voorkom (Plaschke et al. 1996). Vir hierdie rede moet die PCR-produkte op 'n jel geskei word wat redelike hoë resolusie resultate bied. 'n Ses persent PAA (poli-akriëlamied) jel word normaalweg vir hierdie doel gebruik. Delesielyne word dikwels gebruik om mikrosatellietmerkers fisies te karteer en te bepaal of die mikrosatelliete ewekansig versprei is in die genoom en of dit in klosse ("clusters") op die chromosome voorkom (Gill et al. 1993a, 1993b).

### ***Mikrosatelliete in koring***

In plante is daar reeds bewys dat mikrosatelliete in baie spesies hoogs informatiewe, lokus-spesifieke merkers is (Röder et al. 1998). Mikrosatelliete kom algemeen en eweredig verspreid oor die koring-genoom voor; dit toon ook baie hoër vlakke van polimorfisme in heksaploïede broodkoring en is meer informatief vergeleke met ander merkersisteme (Röder et al. 1998). Verder is mikrosatelliete gesog aangesien dit effektief kan onderskei tussen naby-verwante koringlyne (Röder et al. 1995; Bryan et al. 1997). Inleier-volgordes vir koringmikrosatelliete is ook maklik bekombaar.

### ***1.6.3.5 Geamplifiseerde-Fragment-Lengte-Polimorfismes (AFLPs)***

AFLP-analise is deur Keygene BV, Wageningen, Nederland (Savelkoul et al. 1999) ontwikkel. Dit is 'n selektiewe, restriksie-fragment amplifikasie-tegniek wat gebaseer is op die ligasie van setel-spesifieke passtukke aan genomiese restriksie-fragmente gevolg deur PCR-amplifikasie van die fragmente met passtuk-spesifieke inleiers (Vos et al. 1995). Die restriksie-fragmente is die produk van gDNS wat met twee endonukleases, een met 'n gemiddelde snydings-frekwensie (*EcoRI*, *PstI*, *HindIII* of *ApaI*) en een met 'n hoër snydingsfrekwensie (*MseI* of *TaqI*), verteer is. *EcoRI* tesame met *MseI* word meesal gebruik vir plantgenome ([www.Appliedbiosystems.com](http://www.Appliedbiosystems.com)). Die analise is tegnies dieselfde as RFLPs behalwe dat slegs 'n substel van die restriksiefragmente ontleed word. Die aantal fragmente kan verder ingekort word deur inleier verlenging (Powell et al. 1997; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Savelkoul et al. 1999).

Om die aantal fragmente nog verder te verminder word 'n vêrdere PCR-amplifikasie met selektiewe inleiers gedoen. Hierdie inleiers is passtuk-spesifieke inleiers met hul 3'-ent verleng met 1 tot 3 nukleotiede. Met hoë-strengheid PCR-kondisies sal slegs fragmente wat komplementêr aan hierdie nukleotiede is, geamplifiseer word. Janssen et al. (1996) het gewys dat die keuse van restriksie-ensieme asook die lengte en keuse van selektiewe nukleotiede die uiteindelijke kompleksiteit van die AFLP-vingerafdruk bepaal. Vir eenvoudige genome soos swamme, bakterieë en sekere plante is die keuse van selektiewe inleiers met een of twee selektiewe nukleotiede aanvaarbaar terwyl meer komplekse genome soos koring twee tot drie selektiewe nukleotiede aan beide selektiewe inleiers moet besit (Vos et al. 1995; Abdel-Satar et al. 2003). 'n Verlenging van een nukleotied aan een van die inleiers sal veroorsaak dat slegs een uit vier fragmente geamplifiseer word terwyl 'n verlenging van drie nukleotiede aan beide inleiers slegs een uit 4096 fragmente sal amplifiseer (Savelkoul et al. 1999; Abdel-Satar et al. 2003).

AFLPs is hoofsaaklik dominante, genoom-wye merkers wat sonder volgorde-inligting aangewend kan word op enige organisme via die gebruik van selektiewe nukleotiede. Die ontleding kan binne 24 uur 'n groot hoeveelheid polimorfiese merkerdata genereer indien fluoresserend-gemerkte inleiers in 'n multipleksreaksie op 'n DNS-volgorde-bepaler

gevisualiseer word. AFLPs is bewys om 'n koste-effektiewe merkertipe te wees met wye toepassing, hoë herhaalbaarheid en diskrimineringsvermoë (Savelkoul et al. 1999; Forster et al. 2000; Huttner et al. 2005).

Savelkoul et al. (1999) som die toepassingsvelde van AFLP-analise in plantgenetika op as: (i) filogenetiese en diversiteitstudies, (ii) variëteits-identifikasie, (iii) kiemplasma bestuur, (iv) indirekte seleksie vir agonomies-belangrike eienskappe asook (v) terugkruisingsteling. Verder kan groot aantalle merkers gegenereer word vir hoë digtheids genetiese kaarte (Semagn et al. 2006).

## **VOLGORDE-SPESIFIEKE MERKERS**

### ***1.6.3.6 Enkel-nukleotied-polimorfismes (SNP)***

Die meeste variasie in 'n genoom is as gevolg van enkel-nukleotied-polimorfismes, wat nukleotied-substitusies/-invoegings of -delesies kan insluit. Die “International SNP Map Working Group” (2001) het die gemiddelde aantal verskille tussen twee homoloë chromosome in die mens geraam op 1 verskil per 1331 basispare. Vir so 'n basis-posisie polimorfisme om as 'n SNP oorweeg te word, moet die mins-bekende alleel 'n frekwensie van ten minste 1 % in die populasie handhaaf (Vignal et al. 2002). Hoewel daar nog net beperkte studies op plante uitgevoer is om die voorkoms van SNPs te bepaal, dui aanvanklike data daarop dat daar selfs meer SNPs in plante voorkom as in die mensgenoom (Langridge et al. 2001; Batley et al. 2003). As gevolg van die hoë voorkoms van SNPs in die genoom en die ko-dominante aard daarvan, het gebruik van hierdie merkersisteem die potensiaal om die hoogste resoluusie genetiese kaarte daar te stel (Vignal et al. 2002; Batley et al. 2003; Kwok, 2003).

Met die DNS-volgorde inligting beskikbaar is SNPs direkte merkers, met ander woorde die presiese aard van die alleliese variant is bekend. SNPs kan *in silico* geïdentifiseer word wanneer die volgordes van meer as een alleel van 'n spesifieke geen beskikbaar is. Die tegniek vereis die identifisering van enkel basispaar veranderinge by spesifieke areas tussen teiken-genome en ontwerpte PKR-gebaseerde amplifikasie-protokolle om die polimorfisme op te spoor. Die

grootste beperking van SNPs is egter die aanvangskoste vir die ontwikkeling daarvan (Langridge et al. 2001; Batley et al. 2003). Hierdie merkerklas word nog nie wyd aangewend in plante nie maar verteenwoordig 'n ryk bron van polimorfismes wat in die toekoms gebruik kan word.

## **1.7 *Lr56/Yr38*-TRANSLOKASIE AFKOMSTIG VAN *Ae. sharonensis***

*Ae. sharonensis* aanwys 174 is in 1979 vanaf Israel bekom en onderwerp aan saailing blaarroesweerstandstoets (Antonov & Marais, 1996). Dit is getoets met 'n inokulum-mengsel van vyf heersende Suid-Afrikaanse patotipes van *Puccinia triticina* en is gevind om weerstandbiedend te wees teen hierdie patotipes. Die lyn is vervolgens as die manlike ouer gekruis met die koringvariëteit Chinese Spring ('CS'). Bestande F<sub>1</sub>'s is ses maal teruggekruis na 'CS'. 'n Suiwertelende, bestande segregaat (lyn 8028 met stamboom: *Ae. sharonensis* – 174/7\*'CS') uit die finale kruising is daarna getoets teen 'n wye reeks Suid-Afrikaanse patotipes van blaar-, stam- en streeproes (Marais et al. 2003). Die materiaal was bestand teen die plaaslike blaar- en streeproes patogene maar vatbaar vir stamroes. Die lyn was ook bestand teen vier Australiese streeproes patotipes (104E137A<sup>+</sup>, 110E143A<sup>+</sup>, 238E143A<sup>+</sup> & 111E143A<sup>-</sup>). Uit die data kon afgelei word dat daar gekoppelde blaar- en streeproes weerstandsgene, wat vanuit *Ae. sharonensis* verhaal is, in lyn 8028 voorkom. Na verdere terugkruisings is 'n translokasie-homosigoot (lyn 0352-4) met stamboom: *Ae. sharonensis*/9\* 'CS'//3\* W84-17/3/'CS'/4/W84-17 geselekteer en verder gekarakteriseer. Die blaarroes en streeproes weerstandsgene is onderskeidelik as *Lr56* en *Yr38* in die Internasionale Koring Genekatalogus opgeneem. Monosomiese en telosomiese studies met *Lr56* en *Yr38* het getoon dat die weerstandsgene op chromosoom 6A ingevoeg is (Marais et al. 2006). Mikrosatelliet-analises is vervolgens uitgevoer om te bevestig dat die vreemde chromosoomsegment op chromosoom 6A voorkom. Die mikrosatelliet loci het *Xgwm334*, *Xcfd190*, *Xbarc37*, *Xwmc256*, *Xgwm570*, *Xgwm427* en *Xwmc59* ingesluit en het getoon dat die getranslokeerde gedeelte die hele 6AS chromosoom-arm asook die proksimale gedeelte van 6AL insluit (Marais et al. 2006).

Daar kan verwag word dat die translokasie-segment nie tydens meiose met ooreenstemmende 6A koring-chromatien sal paar en oorkruis nie. Die groot vreemde segment kan dus nie deur konvensionele kruisteling opgebreek word nie en sal as 'n enkele, groot koppelingsblok oorerf



(Marais, 2007). Gevolglik sal enige nadelige gene op die translokasie nie van die weerstandsgene losgemaak kan word nie. Dit beteken ook dat nuttige koring-gene in die geaffekteerde gebied nooit met *Lr56* en *Yr38* gekombineer sal kan word nie. Ten einde die benutbaarheid van die translokasie te verhoog is dit dus nodig om sommige van die oortollige spesiechromatien met koringchromatien te verplaas. Daar is dus besluit om die translokasie te probeer verkort maar op so 'n manier dat die weerstandsgene, *Lr56* en *Yr38*, behoue bly. Die lyn 0352-4 is gevolglik gekruis met, en teruggekruis na, die *ph1b*-mutant om homeoloë paring in die nageslag te induseer, en sodoende rekombinasie tussen die normale chromosoom 6A en die *Lr56/Yr38*-translokasie te laat geskied. Terugkruisings F<sub>1</sub>: 0352-4/2\* 'CS' *ph1b* mutant wat homosigoties is vir die *ph1b*-delesie, maar terselfdertyd heterosigoties is vir die *Lr56/Yr38*-translokasie, is geselekteer (Marais, 2007). Hierdie plante is getoetskruis met 'CS' nullisomies-6A-tetrasomies-6B/D plante. Dit is nodig dat die toetskruisouer nullisomies-6A moes wees omdat bestaande, gekarteerde mikrosatellietmerkers aangewend sou word in die soektog na rekombinante. Koring mikrosatellietloci is meesal genoom-spesifiek en word nie waargeneem op die *Ae. sharonensis* chromosoom-gedeelte nie.

Die oogmerke van hierdie studie was (a) die identifikasie van geskikte merkerloci op chromosoomarms 6AS en 6AL wat in 'n aanvanklike sifting gebruik kon word om potensiële rekombinante op te spoor in die toetskruisings-F<sub>1</sub>: 06M04 (= 0352-4/2\* 'CS' *ph1b*// W84-17). Die aanvanklike merkerloci moes so naby moontlik aan die eindpunte van die translokasiestreek geleë wees en op 'n gepaste toetspaneel getoets word om hul bruikbaarheid te bevestig. Indien die merkerloci bruikbaar was moes die bestaende plante in die F<sub>1</sub> toetskruispopulasie (06M04) gesif word vir potensiële rekombinante. (b) Verkrygte potensiële rekombinante kon dan verder gekarteer word om 'n meer volledige idee te kry van hul groottes en aard. Die verkreeë data kon ook gebruik word om 'n fisiese kaart van chromosoom 6A te skep met behulp van hierdie merkers en dit met bestaande konsensus-kaarte te vergelyk. (c) Uit die bogenoemde groep rekombinante kan die kortste en belowendste rekombinante geïdentifiseer word, wat nog steeds die *Lr56* (en *Yr38*) gene bevat. Indien betekenisvol-verkorte rekombinante gevind word, wat aan weerskante van die weerstandsgeenstreek oorkruising ondergaan het, kan sodanige rekombinante met mekaar gekruis word om nog verdere verkorting van die translokasie (deur gewone meiotiese rekombinasie) tot gevolg te hê.

Mikrosatellieten en AFLPs zijn uiteindelijk ingespannen om F<sub>1</sub>-nageslag met de kleinste hoeveelheid donor-specifieke chromosomen te identificeren.

---

## 2. MATERIAAL EN METODEDES

---

Kaarte van chromosoom 6A van *Triticum aestivum*, saamgestel deur Röder et al. (1998a) en Sourdille et al. (2004), is geraadpleeg om potensieël-buikbare mikrosatellietmerkers te vind om:

(a) 'n Inisiële sifting te doen en waarskynlike translokasie-rekombinante in die toetskruispopulasie, 06M04, op te spoor. Vir hierdie doel was dit nodig om mikrosatellietloci te vind wat (i) so naby as moontlik aan die 6AS telomeer geleë is, (ii) so naby moontlik aan die translokasie breekpunt op 6AL geleë is.

(b) Die potensieële rekombinante meer volledig te karakteriseer; fisiese kaarte van elk te produseer en die kortste rekombinante te identifiseer.

Nadat die nuttige, beskikbare mikrosatellietmerkers uitgeput was, was dit nodig om verdere merkersisteme te beproef in 'n poging om die kortste rekombinante verder te karakteriseer. Vir hierdie doel is AFLP -merkers beproef.

### 2.1 PLANT-MATERIAAL

F<sub>1</sub>-toetskruisnageslag (kruising 06M04) is deur Marais (2007) aan blaarroes saalingtoetse onderwerp. Honderd ses-en-vyftig hiervan was bestand (*Lr56*-draers) en is in hierdie karteringsstudie benut. Genomiese-DNS (gDNS) ekstraksies is uitgevoer op die bestande toetskruispopulasie, 06M04, asook 'n toetspaneel (Tabel 2-1) wat gebruik is om die mikrosatellietmerkers se chromosoomliggings te bevestig voordat hulle gebruik is. F<sub>1</sub>-verhaalde F<sub>2</sub>-nageslag van die tersaaklike plante is vir bestandheid getoets en bestande plante is gebruik vir DNS-ekstraksie. Alle plantmateriaal is in 'n glashuis op Welgevallen proefplaas, Stellenbosch Universiteit, gekweek.

**Tabel 2-1:** Koringgenotipes wat as mikrosatelliet toetspaneel benut is.

Naam/Kode	Beskrywing
'CS'	Koringkultivar Chinese Spring
'CS'-S	Naby-isogeniese lyn van 'CS' wat die <i>Rht1-B1b</i> dwerggeen dra
W227	'CS' ditelo 6AL ( $2n = 40 + 2t^{6AL}$ )
W486	'CS' nulli 6A tetra 6B
W487	'CS' nulli 6A tetra 6D
0352-4	<i>Lr56/Yr38</i> -translokasie homosigoot
W84-17	'n Blaarroes-vatbare lentekoring teelwyn wat as toetskruisouer benut is

## 2.2 DNS-ISOLERING

Die protokol wat gebruik is vir gDNS-ekstraksies is 'n afgeskaalde weergawe van die metode van Doyle & Doyle (1990). Hiervolgens is 100 µg blaarweefsel opgesny en in 2.2 ml eppendorf buisies (eppis) geplaas saam met drie 2.5mm vlekvrystaal-balletjies. Hierna is 800 µl ekstraksie-buffer en 1.6 µl beta merkopto-etanol (BME) bygevoeg en die blare met 'n Qiagen TissueLyser (Retsch) vir 3 X 90 sekondes teen 30 Hz fyngeslaan. Die mengsel is vir 60 minute by 60 °C geïnkubeer waarna 800 µl chloroform-isoamielalkohol (CI) (24:1) bygevoeg en versigtig gemeng is. Die mengsel is vir 8 minute teen 12 000 rpm gesentrifugeer en ongeveer 700 µl bostand is oorgedra na 'n skoon 2.2 ml eppi. Een volume fenol-chloroform-isoamielalkohol (PCI) (25:24:1) is by die mengsel gevoeg, goed gemeng en teen 12 000 rpm vir 3 min gesentrifugeer. Ses-honderd mikroliter van die bostand is hierna oorgedra na 'n skoon 2.2 ml eppi en 1 volume CI (24:1) is bygevoeg en teen 12 000 rpm vir 5 min gesentrifugeer. Ongeveer 500 µl bostand is oorgedra na 'n skoon 2.2 ml eppi en die DNS is gepresipiteer deur 1 volume isopropanol by te voeg, dit goed te meng en oornag te inkubeer by - 20 °C. Die volgende dag is die oplossing vir 10 min teen 12 000 rpm by 4 °C gesentrifugeer. Die bostand is weggegooi en 1 ml 70 % etanol is bygevoeg en vir 5 min teen 12 000 rpm by 4 °C gesentrifugeer. Die bostand is weggegooi en die sentrifugaat is gedroog waarna dit saam met 40 µg/ml RNase A opgelos is in 30 µl TE-oplossing. Die oplossing is vir 30 min by 37 °C geïnkubeer. Vyf mikroliter 3M natrium-asetaat (pH 5.0) en 110 µl 100 % etanol is bygevoeg en by 12 000 rpm gesentrifugeer vir 10 min. Die bostand is weggegooi en 1 ml 70 % etanol is bygevoeg en vir 5 min teen 12 000 rpm gesentrifugeer waarna die stap herhaal is. Die bostand is weggegooi en die sentrifugaat is toegelaat om winddroog te raak. Die sentrifugaat is opgelos in 50 µl gedistilleerde water waarna die kwaliteit en konsentrasie van die DNS bepaal is met 'n Nanodrop ND1000 spektrofotometer.

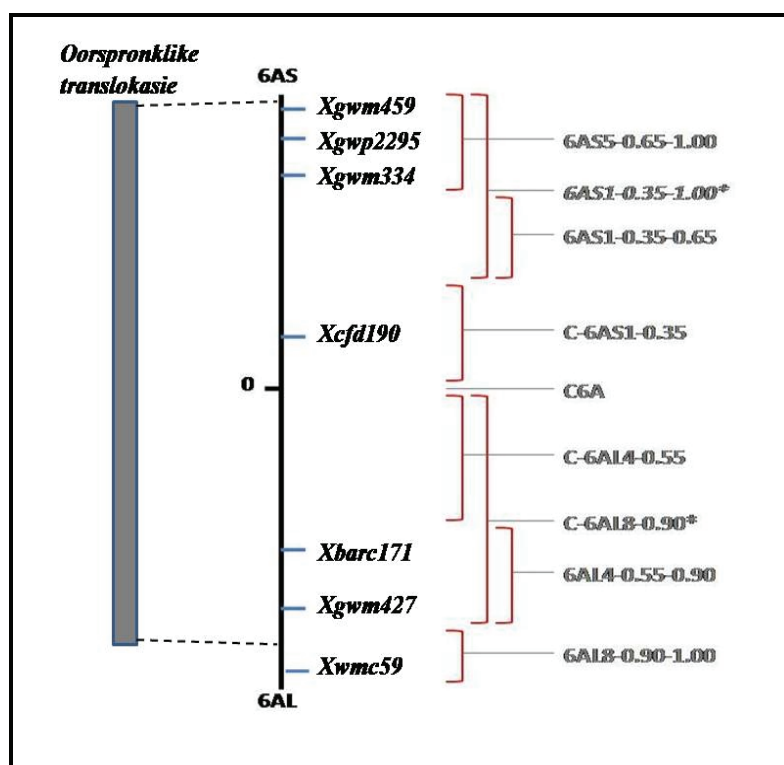
## 2.3 *Ph1*-DETEKSIE

*Ph1*-deteksie is uitgevoer met 'n "2720 Thermal Cycler" PKR masjien (Applied Biosystems) op die bestande plante uit die kruising 0352-4/2\* 'CS' *ph1b* mutant (wat deur Marais (2007) gebruik is om die toetskruis F<sub>1</sub>: 06M04 daar te stel) ten einde te bevestig dat hulle homosigoties was vir *ph1b*. Die teenwoordigheid/afwesigheid van die *Ph1*-lokus is bepaal met 'n gewysigde weergawe van die Gill & Gill (1996) protokol. Die PKR reaksie-mengsel het bestaan uit 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 X Boline PKR buffer, 50 µM van elke dNTP, 0.1 µg van die voorwaartse- (5'-GCC ACT TCC TAC CCA AAC CA-3') en terugwaartse (5'-TGC GAA CCA TAG GGC TGA AC-3') inleier, 200 ng gDNS en 1 U Boline BIOTAQ™ DNS-polimerase in 'n totale reaksie-volume van 50 µl. Die PKR reaksie-kondisies het bestaan uit 1 siklus teen 94 °C vir 5 min, 30 siklusse van 94 °C vir 1 min, 50 °C vir 1 min, 72 °C vir 90 s gevolg deur 1 siklus teen 72°C vir 5 min en afkoeling tot 4 °C. Die PKR-produk is vir 16 ure verteer met *Hinf* I (Roche) endonuklease. Die produkte is hierna geskei (35 min, 100 V) op 'n 2% (m/v) D1 LE (Hispanagar) agarose jel in 1 X TBE buffer (5 X TBE voorraad-oplossing: 0.5 M Tris, 0.5 M boorsuur, 0.5 M EDTA (pH 8.0)), saam met 'n pGEM® DNS-leer (Promega). Die jel is met 2.5 µl ethidium-bromied gekleur (Sambrook et al. 1989) en gevisualiseer onder ultraviolet-lig op 'n "Multi Genius Bio Imaging System" (UviTec).

## 2.4 MIKROSATELLIET ANALISE VAN DIE *Lr56/Yr38*-TRANSLOKASIE

Die volgorde-inligting van die inleierstelle (Tabel 2-2) wat ge-evalueer is vir mikrosatelliet-analise is verkry met behulp van CMap, die amptelike kaartstelsel van die 'GrainGenes' databasis, 'GrainGenes SQL' (<http://wheat.pw.usda.gov/index.shtml>) asook kaarte van chromosoom 6A van *Triticum aestivum*, saamgestel deur Röder et al. (1998a) en Sourdille et al. (2004). Die inleiers (uitgesonderd die GPW merkers) is deur Inqaba Biotec ([www.inqababiotec.co.za](http://www.inqababiotec.co.za)) vervaardig. Die *Xgpw* inleiervolgordes is nie algemeen beskikbaar nie en klein hoeveelhede inleier is goedgunstiglik deur dr. Sourdille (234 Avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France) verskaf. Die inleiers is eers getoets teen die paneel van genotipes wat in Tabel 2-1 gelys word ten einde hul liggings te bevestig asook hul bruikbaarheid vir hierdie studie (mikrosatelliete wat nul-allele toon in die terugkruisings-/toetskruisouers kan byvoorbeeld nie hier nuttig gebruik word nie). Die totale paneel van bestande toetskruisings-F<sub>1</sub> is met

*Xgwm427* en *Xgwm334* getoets. Die oorblywende mikrosatelliete (Figuur 2-1) is getoets op substelle van die materiaal waarbinne belowende rekombinante voorgekom het. Amplifikasie is uitgevoer in 0.2 ml PCR-buisies in 'n totale reaksie-volume van 20  $\mu$ l. Die reaksiemengsel het bestaan uit 100 ng gDNS, 200  $\mu$ M van elke dNTP, 1 U Bioline BIOTAQ™ DNS polimerase, 2 X Bioline PCR-buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol van elke inleier en gevul tot 20  $\mu$ l met ddH<sub>2</sub>O. Die PCR reaksie-kondisies vir die meeste mikrosatellietmerkers het bestaan uit 1 siklus teen 94 °C vir 3 min, 45 siklusse teen 94 °C vir 1 min, optimale hegtingstemperatuur vir 1 min, 72 °C vir 2 min gevolg deur 1 siklus teen 72°C vir 10 min. Die hegtingstemperature word aangegee in Tabel 2-2. Die PCR reaksie-kondisies vir *Xcfd190* het bestaan uit 1 siklus teen 94 °C vir 5 min, 30 siklusse teen 94 °C vir 30 s, 60 °C vir 30 s, 72 °C vir 30 s gevolg deur 1 siklus teen 72 °C vir 10 min.



**Figuur 2-1:** Relatiewe grootte van die oorspronklike *Lr56/Yr38* translokasie en relatiewe posisies van die gekose mikrosatellietloci soos verkry vanaf 'n gekombineerde fisiese/genetiese chromosoom 6A kaart wat op die GrainGenes webtuiste beskikbaar is (<http://wheat.pw.usda.gov/index.shtml>). Die delesie-bundels ('deletion bins') waarbinne die loci val word ook aangedui.

Die PKR-produkte is geskei (45 min, 100 V) op 'n 1.5 % (m/v) D1 LE (Hispanagar) agarose jel in 1 X TBE buffer (5 X TBE voorraad-oplossing: 0.5 M Tris, 0.5 M boorsuur, 0.5 M EDTA (pH 8.0)), saam met 'n pGEM<sup>®</sup> DNS-leer (Produk No. G174A) om te bevestig of enige produk gevorm het en of polimorfismes op die agarose jel gevisualiseer kan word. Die jel is met 2.5 µl ethidium-bromied gekleur (Sambrook et al. 1989) en gevisualiseer onder ultraviolet-lig op 'n "Multi Genius Bio Imaging System" (UviTec).

Die oorblywende PKR-produk is gedensureer deur 10 µl laaibuffer (98 % formaldehyd, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.05 % m/v bromo-fenol-blou, 0.05 % m/v xileen sianol FF) daarby te voeg waarna dit in 'n waterbad (5 min, 95 °C) geplaas is. Dit is uit die waterbad gehaal, onmiddellik op ys geplaas en 12 - 15 µl van elke monster is gelaai op 'n 0.8 mm 6 % m/v akriëlamied:bis-akriëlamied (19:1) denaturerende jel wat 6M urea en 1 X TBE bevat en geëlektroforeer (5 ure, 65 W). Die gel is voorberei deur 800 µl ammonium persulfaat (10 % m/v) en 160 µl N,N,N',N'-Tetrametileendiamien (TEMED) by 160 ml 6 % Poli-akriëlamied (PAA) voorraad-oplossing te voeg. Die oplossing is gegiet en toegelaat om vir 'n uur te set voordat dit op 'n Model S 2001 "sequencing electrophoresis apparatus" (Life-Technologies) geplaas is. Die jel is voor die laai van die monsters geëlektroforeer (30 min, 70 W).

#### ***2.4.1 Silwer-kleuringsprosedure***

Na elektroforese is die twee glasplate in 'n plastiek fotografie-bak geplaas, met die groter plaat na bo en met ys bedek. Na 5 min is dit uit die ys verwyder en is die twee plate van mekaar geskei. Die korter glasplaat waaraan die jel geheg is, is teruggeplaas in die fotografie-bak (jel-kant na bo). Vars fiksering-oplossing (2 L 10 % EtOH, 0.5 % asynsuur) is hierby gevoeg en geskud (20 min, kamer temp). Hierna is dit twee maal vir 5 min afgespoel deur elke keer die jel te skud in 2L dH<sub>2</sub>O. Die jel is oorgedra na 'n fotografie-bak wat 1 % silwernitrat-oplossing bevat en geskud (20 min, kamer temp). Die jel is hierna met dH<sub>2</sub>O afgespoel (10 sek) en in yskoue ontwikkelings-oplossing (375 mM NaOH, 0.41 % m/v 37 % formaldehyd) geplaas totdat duidelike bande gevorm het. Die ontwikkelingsreaksie is gestop deur die jel vir 5 min in dH<sub>2</sub>O af te spoel. Die glasplaat met die jel op is met plastiek oorgetrek om uitdroging te verhoed.

**Tabel 2-2:** Mikrosatellietinleiers wat geëvalueer is vir die opsporing en karakterisering van verkorte *Lr56/Yr38*-translokasies.

Mikrosatelliet lokus	Voorwaartse inleier-volgorde	Terugwaartse inleier-volgorde	(T <sub>m</sub> ) °C	Volgorde herhaling
<i>Xgwm459</i> (6AS)	5' - ATG GAG TGG TCA CAC ACT TTG AA - 3'	5' - AGC TTC TCT GAC CAA CTT CTC G - 3'	55	(GA)>28
<i>Xgwm334</i> (6AS)	5' - AAT TTC AAA AAG GAG AGA GA - 3'	5' - AAC ATG TGT TTT TAG CTA TC - 3'	50	(GA)19
<i>Xbarc3</i> (6AS)	5' - TTC CCT GTG TCT TTC TAA TTT TTT TT - 3'	5' - GCG AAC TCC CGA ACA TTT TTA T - 3'	52	(CCT)17
<i>Xbarc195</i> (6AS)	5' - CCC ACA TGT CAT TGG CTG TTT AA - 3'	5' - GCC CGG CCC AGA ACG ATT TAA ATG - 3'	50	(TTA)10(TTAA)7
<i>Xbarc206</i> (6AS)	5' - GCT TTG CCA GGT GAG CAC TCT - 3'	5' - TGG CCG GGT ATT TGA GTT GGA GTT T - 3'	52	(CT)10
<i>Xbarc23</i> (6AS)	5' - GCG TGA AAT AGT GCA AGC CAG AGA T - 3'	5' - GCG CTA ACA CCT CGG CAA GAC AA - 3'	56	(TAA)9
<i>Xwmc182</i> (6AS)	5' - GTA TCT CAC GAG CAT AAC ACA A - 3'	5' - GAA AGT GTA TGG ATC ATT AGG C - 3'	51	(CT)16
<i>Xcfd190</i> (6AS)	5' - CAA TCA GAA GCG CCA TTG TT - 3'	5' - CCC TGA TGT TTT CTT TTT CTC C - 3'	60	(CA)20
<i>Xbarc37</i> (6AL)	5' - CAG CGC TCC CCG ACT CAG ATC CTT - 3'	5' - GCG CCA TGT TTC TTT TAT TAC TCA CTT T - 3'	55	(TTA)8
<i>Xbarc171</i> (6AL)	5' - GCG GGG TCA TCT TAG TAA CTC AAA TA - 3'	5' - ACT GTC AAC GTT GGT TCA CAT TCA - 3'	50	(ATT)27
<i>Xgwm617</i> (6AL)	5' - GAT CTT GGC GCT GAG AGA GA - 3'	5' - CTC CGA TGG ATT ACT CGC AC - 3'	60	(GA)43
<i>Xgwm570</i> (6AL)	5' - TCG CCT TTT ACA GTC GGC - 3'	5' - ATG GGT AGC TGA GAG CCA AA - 3'	60	(CT)14(GT)18
<i>Xgwm427</i> (6AL)	5' - AAA CTT AGA ACT GTA ATT TCA GA - 3'	5' - AGT GTG TTC ATT TGA CAG TT - 3'	50	(CA)31(CA)22
<i>Xwmc256</i> (6AL)	5' - CCA AAT CTT CGA ACA AGA ACC C - 3'	5' - ACC GAT CGA TGG TGT ATA CTG A - 3'	61	(CA)>12
<i>Xwmc753</i> (6AS)	5' - AAG GTG AAG ATG ATG CTC GC - 3'	5' - TGA CTG ATC ATG GAT TGC CC - 3'	61	Nie beskikbaar
<i>Xwmc256</i> (6AL)	5' - CCA AAT CTT CGA ACA AGA ACC C - 3'	5' - ACC GAT CGA TGG TGT ATA CTG A - 3'	61	(CA)>12
<i>Xgwm570</i> (6AL)	5' - TCG CCT TTT ACA GTC GGC - 3'	5' - ATG GGT AGC TGA GAG CCA AA - 3'	60	(CT)14(GT)18
<i>Xgpw2295</i> (6AS)			50	
<i>Xgpw2093</i> (6AS)	Die <i>Xgpw</i> inleiervolgordes is nie algemeen beskikbaar nie en klein hoeveelhede inleier is goedgunstiglik deur dr. Sourdille (234 Avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France) verskaf.		60	Nie beskikbaar
<i>Xgpw3087</i> (6AS)			50	
<i>Xgpw2332</i> (6AS)			50	



## 2.5 GEAMPLIFISEERDE-FRAGMENTLENGTE-POLIMORFISMES (AFLPs)

Fluoressensie-gebaseerde, geoutomatiseerde AFLP-analise is gebruik in 'n poging om polimorfismes op te spoor in die ouerlyne en die verkorte translokasie-rekombinante. Die protokol van Vos et al. (1995), gewysig deur Donini et al. (1997), is gebruik met reagense en konsentrasies soos weergegee in die 'AFLP™ Plant Mapping Kit' (Applied Biosystems, 1997). Die tegniek is geoutomatiseer deur gebruik te maak van 'n multipleks, selektiewe PKR-reaksie met fluoresserend-gemerkte inleiers (Schwarz et al. 2000).

Vir die AFLP-analise is 11 selektiewe, ongemerkte *MseI*-inleiers (uitsluitend *MseI*-TGA) elkeen in 'n multipleks-reaksie met drie selektiewe *EcoRI*-inleiers gebruik. Die *EcoRI*-inleiers is elk gemerk met 'n verskillende fluoresserende kleurstof (6-FAM™, JOE™ en NED™) (Tabel 2-3). Hierdie inleierstelle is gekies op grond van vroeër studies (Visser, 2008) wat getoon het dat hulle hoogs polimorfies is in koring. Hierbenewens is 'n enkele *MseI/PstI* – inleier-kombinasie gebruik (Tabel 2-3) omdat dit 'n polimorfiese band produseer wat naby die telomeer van 6AS gekarteer is ('Wheat Composite-6A Map 2004' vanaf die 'Graingenes' webtuiste <http://wheat.pw.usda.gov/index.shtml>). In die huidige studie was dit baie moeilik om geskikte merkers te vind wat in die telomeergebied karteer. 'n Totaal van 33 *EcoRI/MseI* - en een *PstI/MseI* - inleierkombinasies is dus op die verkorte translokasie-rekombinante getoets.

Die AFLP-tegniek behels vier stappe: 1) restriksie-vertering van gDNS en die ligasie van die passtukke; 2) pre-amplifikasie reaksie; 3) selektiewe amplifikasie reaksie en 4) opsporing van geamplifiseerde produkte.

### 2.5.1 Restriksie-vertering van genomiese-DNS en ligering van passtukke

Vertering en ligering is in een reaksie uitgevoer (0.6 ml PKR-buisie met 'n totale reaksie-volume van 20 µl). Die reaksiemengsel is opgemaak uit 300 ng gDNS, 2 X "One-Phor-All" buffer (USB), 1 mM ATP, 5 pmol/µl *EcoRI/PstI* passtukke, 50 pmol/µl *MseI* passtukke (Applied

Biosystems), 5 U *EcoRI/PstI* endonuklease (Roche), 5 U *MseI* endonuklease (New England Biolabs), 0.1 µg/µl BSA (New England Biolabs), 1 U T4 DNS-Ligase (USB) en gevul tot 20 µl met ddH<sub>2</sub>O. Die oplossing is gemeng, vinnig gesentrifugeer en oornag by kamertemperatuur gelos.

Vyftien mikroliter van die restriksie-ligasie reaksie is verdun (1:9) met 135 µl 1 X TE<sub>0.1</sub> buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0). Die oorblywende 5 µl is by 6 µl Ficoll gevoeg en op 'n 1.5 % agarose jel (1 X TBE buffer) ge-elektroforeer (100 V, 45 min) om te bevestig dat restriksie/ligasie plaasgevind het.

### **2.5.2 Pre-amplifikasie reaksie (nie-fluoesserend)**

Pre-amplifisering is in 'n 0.2 ml dunwand PCR-buisie met 'n totale reaksie-volume van 20 µl uitgevoer. Die reaksiemengsel het bestaan uit 5.2 µl van die verdunde restriksie-ligasie produk, 1 X Bioline PCR NH<sub>4</sub>-buffer, 200 µM dNTPs, 1.5 µl preselektiewe inleiermengsel (E00/P00 & M00) 1.5 mM Bioline MgCl<sub>2</sub> en 1 U Bioline BIOTAQ™ DNS-polimerase. Die reaksie-volume is tot 20 µl aangevul met ddH<sub>2</sub>O.

Die PCR reaksie-kondisies vir hierdie inleiers het bestaan uit 1 siklus teen 72 °C vir 5 min, 30 siklusse teen 94 °C vir 30 s, 56 °C vir 1 min, 72 °C vir 1 min gevolg deur 1 siklus teen 72 °C vir 5 min waarna dit verkoel is tot 4 °C.

Vyftien mikroliter van die pre-amplifikasie reaksie is verdun (1:9) met 135 µl 1 X TE<sub>0.1</sub> buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0). Die oorblywende 5 µl is saam met 6 µl Ficoll op 'n 1.5 % agarose jel (1 X TBE buffer) ge-elektroforeer (100 V, 45 min) om te bevestig dat amplifikasie van die fragmente plaasgevind het.

### **2.5.3 Selektiewe-amplifikasie reaksie**

Selektiewe amplifikasie is in 'n 0.2 ml PCR-buisie met 'n totale reaksie-volume van 10 µl uitgevoer. Die reaksiemengsel het bestaan uit 2.5 µl van die verdunde pre-selektiewe DNS, 1 X Bioline PCR-buffer, 200 µM dNTPs, 0.5 µM ongemerkte *MseI* inleier (ABI), 0.05 µM gemerkte *EcoRI*-ACA inleier, 0.05 µM gemerkte *EcoRI*-AGG inleier en 0.05 µM gemerkte *EcoRI*-AAC

inleier, 1.5 mM Bioline  $MgCl_2$  en 0.25 U Bioline BIOTAQ™ DNS-polimerase. Die reaksie-volume is aangevul tot 10  $\mu$ l (ddH<sub>2</sub>O).

Die PCR reaksie-kondisies vir hierdie inleiers het bestaan uit 13 siklusse waartydens die “touch-down” hegtings-temperatuur met 0.7 °C gedaal het na elke siklus. Hierna het ’n verdere 23 siklusse gevolg. Die reaksie-kondisies was dus 13 siklusse teen 94 °C vir 30 s, 65 °C - 0.7 °C vir 30 s, 72 °C vir 1 min gevolg deur 23 siklusse teen 94 °C vir 30 s, 56 °C vir 30 s, 72 °C vir 1 min waarna dit verkoel is tot 4 °C en by 4 °C of - 20 °C gestoor is.

#### ***2.5.4 Opsporing van die geamplifiseerde produk en data analise***

Die finale amplifikasieproduk is gestuur (Sentrale Analitiese Fasiliteite, Stellenbosch Universiteit) vir ontleding met ’n ‘Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer’ met ’n 50 cm kapillêr. Die DNS grootte-standaard GeneScan™ - 500 ROX, met ’n grootte reeks van 75 - 500 bp, is by elke AFLP-monster gevoeg. Die verkreë resultate is met GeneMapper sagteware gevisualiseer en ontleed.

**Tabel 2-3:** AFLP-passtuk en -inleier inligting.

<b>Kode</b>	<b>Inleier</b>	<b>Nukleotied-volgorde</b>
	<i>MseI</i> voorwaartse passtuk	5' - GAC GAT GAG TCC TGA G - 3'
	<i>MseI</i> terugwaartse passtuk	5' - TAC TCA GGA CTC AT - 3'
	<i>EcoRI</i> voorwaartse passtuk	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3'
	<i>EcoRI</i> terugwaartse passtuk	5' - AAT TGG TAC GCA GTC - 3'
	<i>PstI</i> voorwaartse passtuk	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA - 3'
	<i>PstI</i> terugwaartse passtuk	5' - TGT ACG CAG TCT AC - 3'
M00	Universele <i>MseI</i> inleiers	5' - CAT GAG TCC TGA GTA A - 3'
E00	Universele <i>EcoRI</i> inleiers	5' - GAC TGC GTA CCA ATT C - 3'
P00	Universele <i>PstI</i> inleiers	5' - GAC TGC GTA CAT GCA G - 3'
M12	<i>MseI</i> -AC	5' - GAT GAG TCC TGA GTA AAC - 3'
M13	<i>MseI</i> -AG	5' - GAT GAG TCC TGA GTA AAG - 3'
M16	<i>MseI</i> -CC	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACC - 3'
M21	<i>MseI</i> -GG	5' - GAT GAG TCC TGA GTA AGG - 3'
M22	<i>MseI</i> -GT	5' - GAT GAG TCC TGA GTA AGT - 3'
M47	<i>MseI</i> -CAA	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACA A - 3'
M48	<i>MseI</i> -CAC	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACA C - 3'
M49	<i>MseI</i> -CAG	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACA G - 3'
M60	<i>MseI</i> -CTC	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACT C - 3'
M61	<i>MseI</i> -CTG	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACT G - 3'
M62	<i>MseI</i> -CTT	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACT T - 3'
E32	<i>EcoRI</i> -AAC [NED™]	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAA C - 3'
E35	<i>EcoRI</i> -ACA [6-FAM™]	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAC A - 3'
E41	<i>EcoRI</i> -AGG [JOE™]	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAG G - 3'
M87	<i>MseI</i> -TGA	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ATG A - 3'
P78	<i>PstI</i> -GTT [6-FAM™]	5' - GAC TGC GTA CAT GCA GGT T - 3'

---

## 3. RESULTATE EN BESPREGING

---

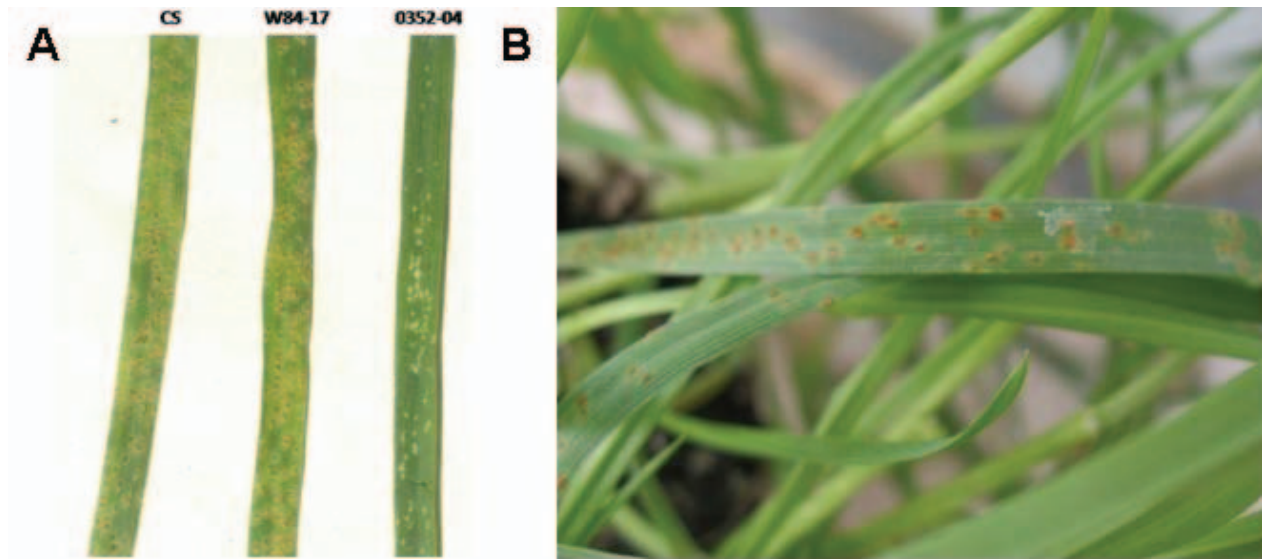
Die uiteindelijke doel van die projek was om plante uit die toetskruispopulasie, 06M04, te identifiseer met die kleinste moontlike hoeveelheid vreemde chromatien maar wat nog steeds die *Aegilops sharonensis* weerstandsgene bevat.

Molekulêre merkertegnologie maak dit moontlik om oorgedraagde, vreemde DNS te monitor. Gepaste merkers kan verkry word vanaf bestaande, gepubliseerde genetiese en fisiese kaarte en gebruik word in 'n aanvanklike poging om die kortste rekombinante wat steeds die weerstandsgene dra, op te spoor. 'n Merkersistiem soos AFLPs kan daarna gebruik word om bykomstige merkers te vind in chromosoomstreke wat swak gekarteer is.

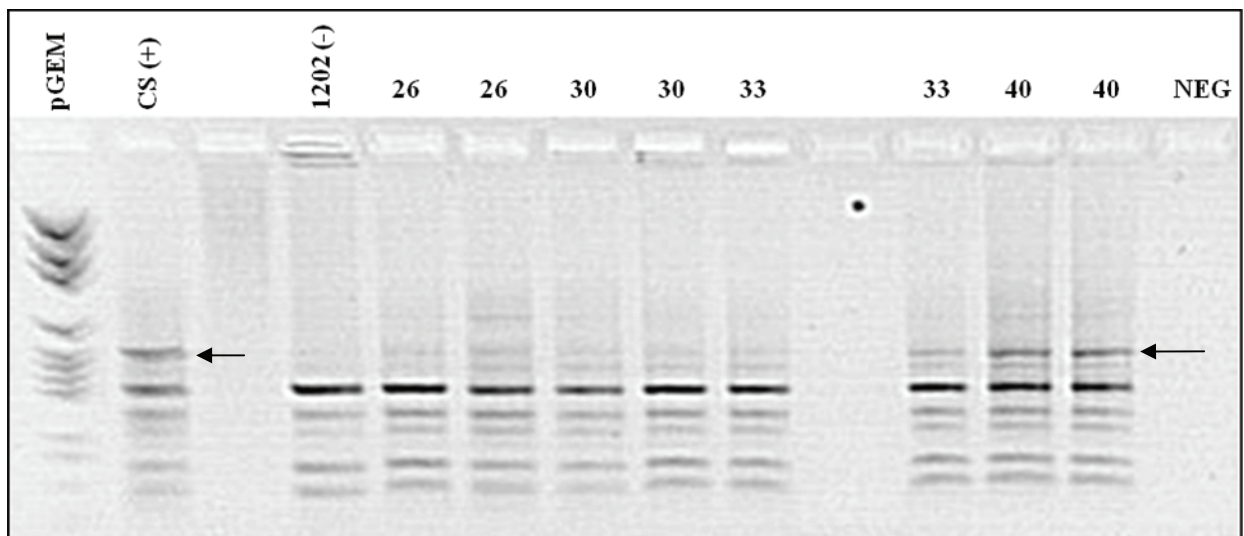
### 3.1 *ph1b*-SELEKSIE

Blaaroesweerstandsgeen *Lr56* produseer 'n ; (vlek) infeksietipe na besmetting met hierdie patoogen (Figuur 3-1). Bestande terugkruisings F<sub>1</sub>-plante (0352-4/2\* 'CS' *ph1b* mutant) wat vermoed was om homosigoties te wees vir die *ph1b*-delesie, maar terselfdertyd heterosigoties vir die *Lr56/Yr38*-translokasie (Marais, 2008), is bevestig met behulp van Gill & Gill (1996) se PKR-gebaseerde *ph1b*-merkermetode.

Vier terugkruisingsplante was bestand teen die blaaroespatotipe UVPrt8. DNS-ekstraksies is van die vier plante asook 'n negatiewe kontrole, 1202 (= *ph1bph1b*), en 'n positiewe kontrole, 'CS' (= *Ph1Ph1*), gemaak en getoets met die *ph1b*-merker. Die resultaat word in Figuur 3-2 getoon. Vergelyking met die pGEM DNS-leer toon dat 'CS' 'n 500 bp band besit wat nie in 1202 voorkom nie. Hierdie is die ampikon van die *Ph1*-lokus. Die merker is afwesig in monsters 26, 30 en 33 maar is teenwoordig in monster 40. Die 2<sup>de</sup> laan van monster 33 besit egter die 500 bp band, wat waarskynlik veroorsaak is deur die oorloop van die PKR-produk uit die aangrensende laan met die laai van die agarose jel. Die dowwe bande wat steeds in die *ph1b*-negatiewe lane sigbaar is, is die gevolg van onvolledige snyding van die PKR-amplifikasieproduk met *Hinf* I endonuklease.



**Figuur 3-1:** (a) ‘CS’, W84-17 en 0352-4 se saailingreaksies nadat dit geïnkuleer is met blaarroes patotipe UVPrt8. Slegs 0352-4 met die *Lr56/Yr38*-translokasie was bestand teen die swam. (b) Die roeskolonies op ‘CS’ 12 dae na die inokulasie met UVPrt8.



**Figuur 3-2:** Toetsing vir die afwesigheid van *Phl*. Plante 26, 30 en 33 is homosigoties (*ph1bph1b*) vir die deleisie. Die 5B-spesifieke PKR-fragment is met ’n pyltjie gemerk. ‘CS’ is as *Phl* positiewe kontrole ingesluit en lyn 1202 is as *Phl*-negatiewe kontrole, ingesluit.

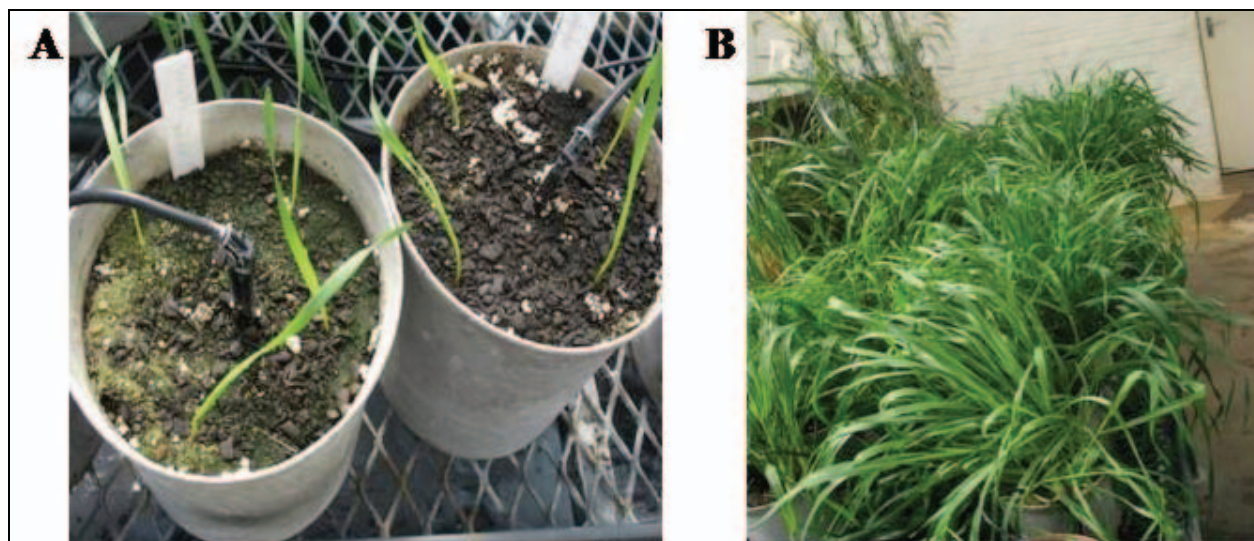
Drie plante is geïdentifiseer (Figuur 3-2) wat homosigoties was vir die *ph1b*-deleisie, maar terselfdertyd heterosigoties was vir die *Lr56/Yr38*-translokasie. Hierdie plante is getoetskruis met

'CS' nullisomies-6A-tetrasomies-6B/D plante (Marais, 2008). Die  $F_1$ -nageslag, 06M04, van hierdie kruising moes daarom hemisigoties wees vir chromosoom 6A. Bestande  $F_1$ 's sou dus die volledige translokasie besit of gerekombineerde vorms daarvan wat gevorm is na oorkruising tussen 'n normale chromosoom 6A en die *Lr56/Yr38*-translokasie. Bestaande, gekarteerde mikrosatellietmerkers is hierna aangewend om rekombinante te identifiseer en te karakteriseer.

Honderd sewe-en-sestig  $F_1$ -sade uit die toetskruising, 06M04, is geplant en na 2 weke se groei is die saailinge met blaarroes-patotipe UVPrt8 geïnkuleer. Figuur 3-1(a) toon die verskil tussen vatbare en bestande plante. Honderd ses-en-vyftig saailinge was bestand en is in 'n glashuis uitgeplant (4 plante per pot) sodat die plante individueel gemerk kon word (Figuur 3-3). gDNS is uit al 156 bestande plante geëkstraer waarna die DNS verdun is na 'n werks-oplossing van 100 ng/ $\mu$ l.

Die translokasie het dus sterk voorkeur-oordrag deur die vroulike gamete getoon (93% van die eiselle het die translokasie besit in plaas van 50% soos verwag word met normale Mendeliese segregasie). Omdat dit onbekend is of dit slegs gamete sonder die translokasie was wat geneig het om te aborteer, en of 'n proporsie van gamete met die translokasie ook geaborteer het, is dit nie duidelik tot watter mate voorkeur-segregasie afleidings omtrent rekombinasie-afstande kon beïnvloed het nie.





**Figuur 3-3:** Die 156 bestande plante is geplant en individueel gemerk vir DNS ekstraksies. (a) Vier plante per pot geplant vir maklike identifikasie/nommering van individuele plante, (b) die plante 7 weke nadat dit geplant is.

## 3.2 MIKROSATELLIETMERKERS

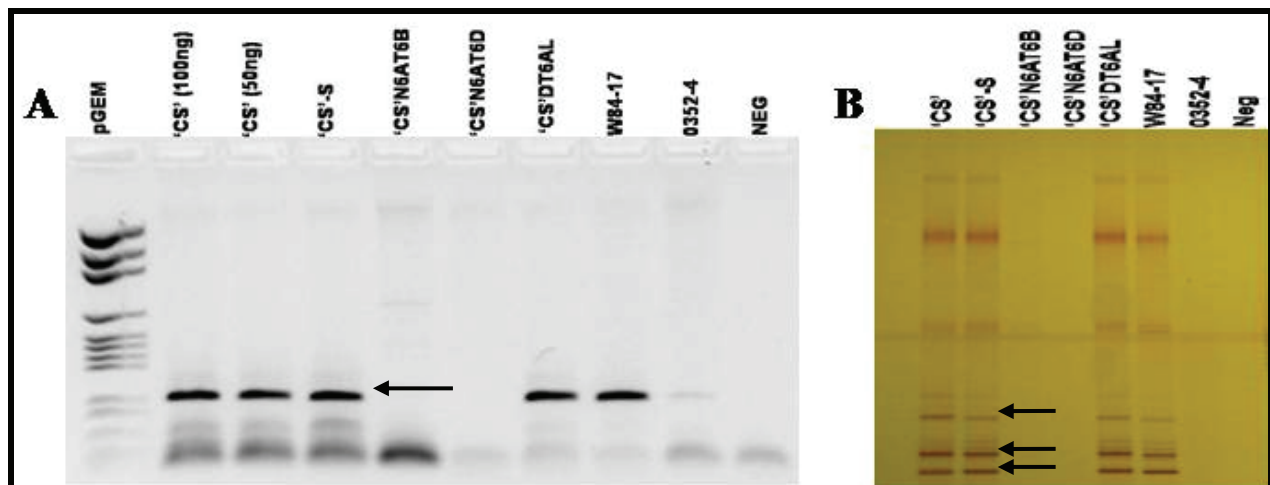
SSRe is as die inisiële merkersisteen gebruik omdat dit genoom-spesifiek is, 'n hoë vlak van polimorfismes in koring toon en ook goed verteenwoordig is op fisiese- en genetiese kaarte. Ten einde mikrosatellietloci te kan gebruik vir die opspoor van rekombinante was dit nodig om 'n  $F_1$  toetskruispopulasie, 06M04, te produseer wat hemisigoties is vir die chromosoom 6A loci. Die koring-allele van die mikrosatellietloci op 6A produseer genoomspesifieke bande terwyl die ooreenstemmende *Ae. sharonensis* loci nulallele besit. Die nulallele is slegs sigbaar in hemi- of homosigotiese plante.

Die mikrosatellietmerkers is ge-evalueer op 'n toetspaneel van ses monsters (Tabel 2-1) om hul bruikbaarheid vir hierdie studie te bepaal. Koringgenotipes 'CS', 'CS'-S en W84-17 is gebruik in die ontwikkeling van die materiaal en is daarom ingesluit om te sien watter mikrosatellietallele hulle besit en seker te maak dat die ouerlyne nie enige nulallele dra nie. Translokasielyn, 0352-4, is ingesluit om te bevestig dat die *Lr56/Yr38*-translokasie 'n nulalleel dra by die ooreenstemmende mikrosatellietloкус. 'CS'N6AT6B/D is gebruik om te bevestig dat die merker wel op chromosoom 6A voorkom en 'CS'DT6AL is gebruik om die chromosoomarm te bevestig.

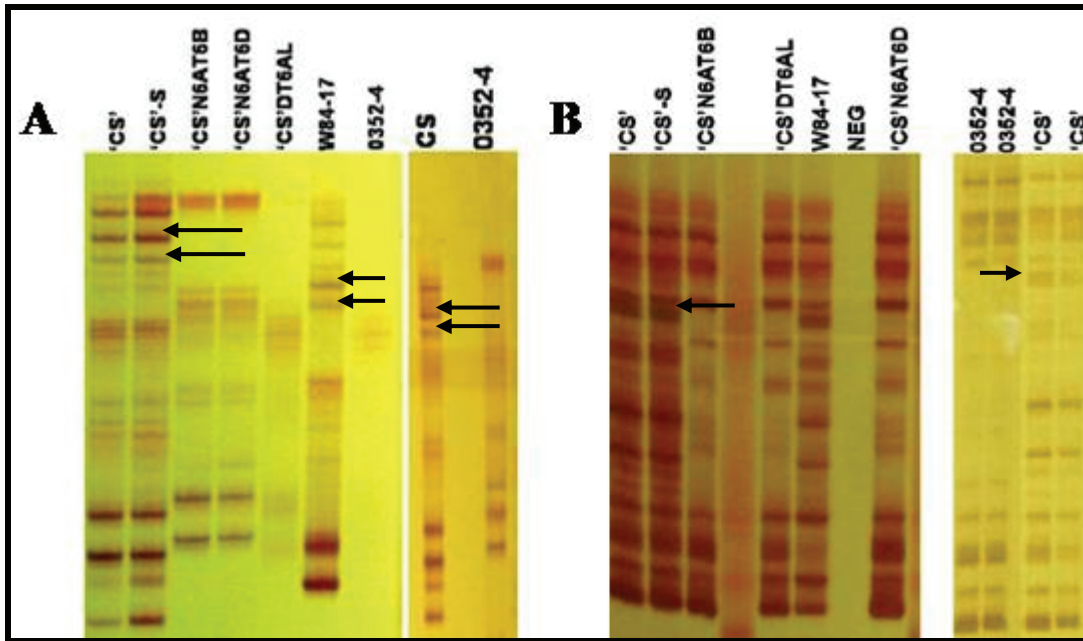


Een-en-twintig mikrosatellietmerkers (Tabel 2-2) is op die toetspaneel (Tabel 2-1) ge-evalueer. Ses mikrosatellietmerkers is uit die groep gekies op grond van hul ligging op chromosoom 6A; eenvoud en herhaalbaarheid. Die ses loci is: *Xgwm459*, *Xgpw2295*, *Xgwm334*, *Xcfd190*, *Xbarc171* & *Xgwm427* (Figuur 2-1). Figuur 2-1 is gebaseer op 'n gekombineerde fisiese/genetiese kaart wat in die GrainGenes webtuiste gevind kan word. Volgens hierdie kaart kan daar ses deleisie-intervalle op chromosoom 6A onderskei word (drie op elke arm).

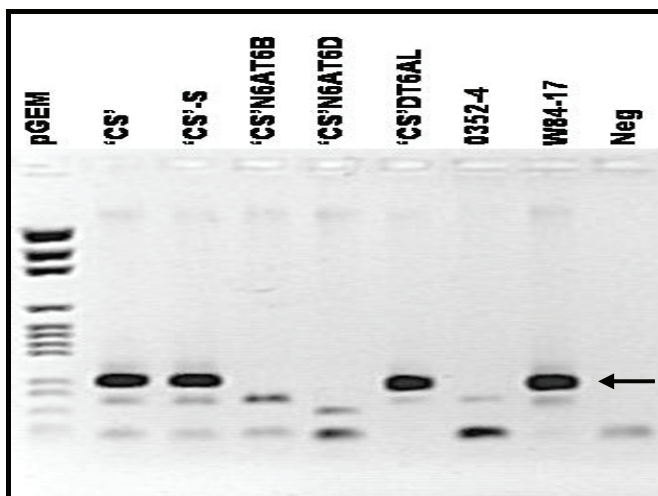
Die ses gekose mikrosatellietloci is vervolgens ge-evalueer ten einde te bepaal of ontleding op agarose jelle (ethidium-bromied visualisering) gedoen kan word en of dit nodig is om die meer omslagtige skeiding op poli-akriëlamied (met silwerkleuring) te doen. Daar is gevind dat twee van die mikrosatellietloci op agarose gevisualiseer kan word (Figure 3-4; 3-6) terwyl vier op poli-akriëlamied (Figure 3-5; 3-7) gedoen moet word. *Xgwm427* is op beide 'n agarose (Figuur 3-6a) en poli-akriëlamied jel (Figuur 3-6b) geëlektroforeer om te bevestig dat die polimorfismes op agarose gevisualiseer kan word.



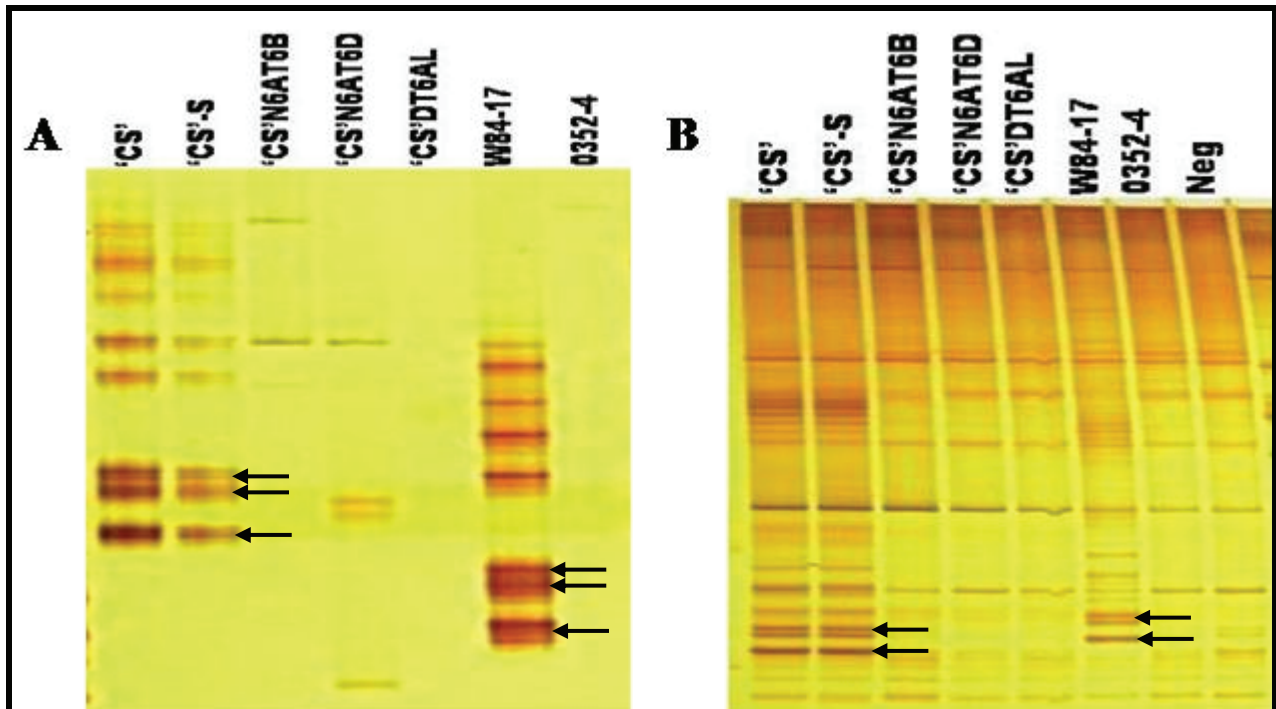
**Figuur 3-4:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte van die GWM427 mikrosatelliet inleierstel op die toetspaneel (Tabel 2-1) geëlektroforeer op (a) 1.5 % agarose jel teen 100 V vir 60 min & (b) 6 % denaturerende PAA jel teen 65 W vir 5-6 ure. Volgens die pGEM DNS-leer op die agarose jel is die polimorfiese band ongeveer 150 bp groot. Aanwesigheid van die polimorfiese band in 'CS'DT6AL bevestig dat die merker op chromosoom 6AL voorkom.



**Figuur 3-5:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte van die (a) GWM334 en (b) CFD190 mikrosatelliet inleiers op die toetspaneel (Tabel 2-1) (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5-6 ure). Afwesigheid van polimorfiese bande in 'CS'DT6AL bevestig dat beide merkers op chromosoomarm 6AS voorkom.



**Figuur 3-6:** Jel-foto van die produkte geamplifiseer op die toetspaneel by mikrosatellietlokus *Xbarc171* (Tabel 2-1) (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 60 min). 'n Amplifikasieproduk in 'CS'DT6AL bevestig dat die lokus op chromosoom 6AL voorkom.



**Figuur 3-7:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte van die (a) GWM459 en (b) GPW2295 mikrosatellietinleiers op die toetspaneel (Tabel 2-1) (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5-6 ure). Afwesigheid van die polimorfiese bande in 'CS'DT6AL dui daarop dat beide merkers op chromosoomarm 6AS voorkom.

Die ses gekose mikrosatellietloci is dus spesifiek vir chromosoom 6A van *Triticum aestivum* en is afwesig (verplaas) in die *Lr56/Yr38*-translokasiegedeelte van lyn 0352-4. Indien rekombinasie plaasgevind het tussen enige twee loci sal 'n produk van een van die twee loci waargeneem kan word. Hierdie merkers is dus geskik om die 156 bestande toetskruisplante te evalueer ten einde te bepaal of rekombinasie plaasgevind het in sommige van hierdie plante.

### ***3.2.1 Toets vir rekombinasie met behulp van mikrosatelliet merkers***

'n Inisiële sifting is op al 156 bestande toetskruispopulasie, 06M04, uitgevoer om waarskynlike translokasie-rekombinante op te spoor. Vir hierdie doel is twee mikrosatelliet-loci gebruik. Een (*Xgwm334*) wat naby aan die 6AS telomeer geleë is en een (*Xgwm427*) wat naby aan die translokasie breekpunt op 6AL geleë is. Merker GWM427 gee 'n eenvoudige profiel wat op agarose gevisualiseer kan word en is dus geskik vir die vinnige sifting van 'n groot aantal plante.

Jelfotos verkry na evaluasie van die F<sub>1</sub>-plante met die ses mikrosatelliet inleierstelle word in die addendum weergegee. In die inisiële sifting het vyf-en-dertig van die 156 bestande toetskruisplante rekombinasie (koringalleel teenwoordig) getoon by die *Xgwm427* lokus (Figure 6.1.1-1 tot 6.1.1-12) terwyl 41 plante rekombinasie getoon by die *Xgwm334* lokus (Figure 6.1.2-1 tot 6.1.2-4). Twee-en-vyftig plante het by een of beide van die *Xgwm427* en *Xgwm334* loci rekombinasie getoon.

Hierdie verkleinde paneel van 52 plante is vervolgens met die oorblywende vier mikrosatellietmerkers getoets. Van die 52 plante het 39 plante by *Xcdf190* (Figure 6.1.3-1 tot 6.1.3-2), 36 plante by *Xbarc171* (Figure 6.1.4-1 tot 6.1.4-5), 38 plante by *Xgwm459* (Figure 6.1.5-1 tot 6.1.5-2) en 42 plante by *Xgpw2295* (Figure 6.1.6-1 tot 6.1.6-2) rekombinasie getoon. Die rekombinasie-data vir die verskillende loci van die 52 plante word in Tabel 3-1 opgesom.

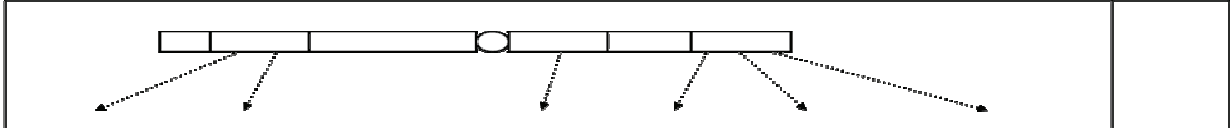
Die data van Tabel 3-1 dui daarop dat daar 40 oorkruisings geskied het in die chromosoom 6A gebied wat deur die loci *Xgwm427* en *Xgwm459* begrens word. Die allosindetiese rekombinasiefrekwensie tussen die twee loci kan dus beraam word as  $(40/156) = 0.256$ . Dit dui op 'n relatief hoë frekwensie van allosindetiese uitruiling (minstens een oorkruising per twee bivalente). Indien aangeneem word dat drie van die ses oorkruisings wat tussen *Xbarc171* en *Xcdf190* geskied het, tussen *Xbarc171* en die sentromeer geskied het; terwyl die orige drie tussen die sentromeer en *Xcdf190* geskied het, kan die volgende bereken word. Die groter proporsie oorkruisings ( $26/40 = 0.65$ ) het op die lang arm (tussen *Xgwm427* en die sentromeer) voorgekom. Slegs  $14/40 = 0.35$  van die oorkruisings het in die gebied tussen die sentromeer en *Xgwm459* plaasgevind. Die frekwensies kan verklaar word op grond daarvan dat meiotiese paring in koring vanaf die telomere geïnisieer word (Bass et al. 1997). Aangesien die lang arm van die translokasie-chromosoom 'n koring telomeer besit en die kort arm 'n *Ae. sharonensis* telomeer besit (Marais et al. 2006) sal die lang arms in so 'n translokasie-heterosigoot verag word om meer effektief as die kort arms te paar. Die algemeen verlaagde oorkruisingsfrekwensie van die kort arms word dan ook gereflekteer in baie kort geraamde rekombinasie-afstande vir loci op hierdie arm (Tabel 3-2).

Die proses wat hier gevolg is om allosindetiese (hoofsaaklik enkel-) oorkruisings binne 'n spesie-verhaalde translokasiesegment te induseer, rekombinante te verhaal en te karteer is vergelykbaar met 'n delesiekarteringsoefening en verskaf 'n onafhanklike volgordekartering van die ses loci,

gebaseer op die translokasiesegment. Ontleding van die rekombinasiedata weergegee in Tabel 3-1 het daarop gedui dat die gekarteerde volgordes van die ses loci waarskynlik korrek is (die aantalle individue in dubbeloorkruisingsklasse was proporsioneel laer as die aantalle in die enkeloorkruisingsklasse). Dit is ook duidelik dat daar 'n hoë graad van sintenie moet wees tussen die translokasiegebied en ooreenstemmende koringchromatien wat daardeur verplaas is, aangesien 'n relatief hoë frekwensie rekombinante verkry kon word en rekombinasie oënskynlik oor die chromosoomlengte geskied het.

Na sifting van die 156 plante met die ses mikrosatellietmerkers is daar gevind dat 14 plante rekombinasie getoon het by al ses loci (Tabel 3-1). Hierdie 14 plante besit almal die *Lr56* weerstandslokus en verteenwoordig daardie rekombinante wat die meeste spesiechromatien verruil het vir koringchromatien. Die moontlikheid dat *Lr56* tussen *Xgwm427* en *Xgwm459* voorkom kan uitgeskakel word omdat dit herhaalde (14 en meer) dubbeloorkruisings sou vereis en oorkruising boonop aan beide kante van *Lr56* sou moes plaasvind. Die lae voorkoms van enkeloorkruisings tussen pare van loci (Tabel 3-2) beteken dat die kans vir dubbeloorkruisings tussen aangrensende loci uiters gering is. Die data dui daarop dat die grootste verwagte kans vir 'n dubbel-oorkruising tussen enige twee naasliggende loci maar 2.15 % is (tussen *Xbarc171* & *Xgwm427*). Die kans dat daar dus 14 plus dubbel-oorkruisings tussen twee loci geskied het, is geweldig klein. Die *Lr56* lokus moet dus of binne die gebied tussen *Xgwm459* en die 6AS telomeer voorkom of op die lang arm in die gebied tussen *Xgwm427* en die distaal geleë translokasiebreekpunt.

**Tabel 3-1:** Data verkry na tipering van 156 bestande toetskruisings- $F_1$  plante met 6 mikrosatellietmerkers, spesifiek vir chromosoom 6A. ‘n “K” dui op teenwoordigheid van die *Triticum aestivum* alleel van die mikrosatellietlokus en ‘n “S” dui op teenwoordigheid van die *Aegilops sharonensis* nulalleel.

								
Lang (L-) arm			Kort (S-) arm					
<i>Ngwm427</i>	<i>Nbarc171</i>	Sentromeer	<i>Xcfd190</i>	<i>Ngwm334</i>	<i>Ngpw2295</i>	<i>Ngwm459</i>	Totale aantal plante	
K	K		K	K	K	K	14	a
K	K		K	K	K	S	3	
K	K		K	S	S	S	2	b
K	K		S	S	S	S	1	
K	S		S	S	S	S	8	
S	S		S	K	K	K	4	b
S	S		K	K	K	K	4	
S	K		K	K	K	K	14	
S	K		K	K	K	S	1	
K	K		S	S	K	K	1	b
S	-		-	S	-	-	104	

<sup>a</sup> Plante met die minste vreemde chromatiën

<sup>a+b</sup> Groep van 29 plante wat verder getoets is

**Tabel 3-2:** Relatiewe posisies van die bruikbare mikrosatelliet merkers op chromosoom 6A en geraamde allosindetiese rekombinasie-frekwensies tussen aangrensende loci, uitgewerk volgens die data in Tabel 3-1.

<b>6AS</b>	<b>Persentasie Rekombinasie</b>	<b>Verwagte kans vir dubbele oorkruisings</b>
<i>Xgwm459</i>	2.56%	0.06%
<i>Xgpw2295</i>	0.64%	0.00%
<i>Xgwm334</i>	3.84%	0.15%
<i>Xcfd190</i>	3.84%	0.15%
<i>Xbarc171</i>	14.74%	2.17%
<i>Xgwm427</i>		
<b>6AL</b>		

Ten einde te bepaal op watter een van die twee chromosoom 6A arms die *Lr56*-lokus waarskynlik voorkom, is die rekombinasiedata vir drie van die mikrosatellietmerkers as 'n 3-punt koppelingsdatastel geëkstraer (weergegee in Tabel 3-3A). Die drie merkers is bloot gekies vanweë hul verspreiding oor die chromosoom en dieselfde afleidings sou gemaak kon word met die keuse van 'n verskillende stel van drie verspreide merkers. Die volgorde van die drie mikrosatellietloci (gebaseer op die gepubliseerde mikrosatellietkaart) is: A = *Xgwm427* (6AL), B = *Xgwm334* (proksimaal 6AS) en C = *Xgwm459* (distaal 6AS).



Hierdie volgorde is vereenselwigbaar met die data van Tabel 3-3A waarin daar slegs een plant in elk van die twee moontlike dubbeloorkruisingsklasse voorgekom het. Onder aanname dat hierdie geenvolgorde korrek is, kan die (allosindetiese) afstande tussen die loci geraam word as  $A$  ( $Xgwm427$ ) na  $B$  ( $Xgwm334$ ) = 22 kaarteenhede;  $B$  ( $Xgwm334$ ) na  $C$  ( $Xgwm459$ ) = 3 kaarteenhede. Soos reeds aangedui val die weerstandslokus buite die chromosoomarea  $A-B-C$ . Die gevolgtrekking kan bevestig word deur modelle op die 3-puntdata van Tabel 3-3A te pas waarin onderskeidelik veronderstel word dat die weerstandslokus tussen  $A$  en  $B$  of tussen  $B$  en  $C$  geleë is. Vir beide veronderstellings pas die waargenome frekwensies dan glad nie op die geïmpliseerde enkel- en dubbeloorkruisingsklasse nie.

Daar kan vervolgens twee scenarios getoets word rakende die moontlike ligging van die weerstandslokus (simbool  $R$ ). Die lokus kan naamlik op die lang arm tussen die translokasiebreekpunt en  $Xgwm427$  lê; of dit kan distaal van  $Xgwm459$  op 6AS lê. Die data van Tabel 3-3A is vervolgens aangepas om die twee moontlikhede te weerspieel en word as Tabel 3-3B weergegee. Vergelyking van die waargenome frekwensies met die verwagte gameetgenotipes vir elk van die veronderstellings dui daarop dat die geen waarskynlik op 6AL geleë is. Volgens hierdie model word die hoogste frekwensie genotipes verwag om die resultaat te wees van 'n enkeloorkruising tussen loci  $A$  en  $B$ . In die model waar 6AS as die ligging veronderstel word, is die grootste aantal verwagte gameetgenotipes dubbeloorkruisingsprodukte; wat uiters onwaarskynlik is. Boonop veronderstel die 6AS model verder dat daar 'n hoë frekwensie rekombinasie tussen  $Xgwm459$  ( $C$ ) en die terminaal-geleë weerstandsgen moes geskied wat weereens baie onwaarskynlik is gesien die afname in rekombinasiefrekwensie in die rigting van die 6AS telomeer. Dit wil dus voorkom asof die mees waarskynlike ligging van  $Lr56$  distaal van  $Xgwm427$  op 6AL is. Die allosindetiese kaartafstand tussen die twee loci kan geraam word op 19 kaarteenhede. Hierdie bevinding dui dus daarop dat daar waarskynlik in 29 rekombinante oorkruising tussen  $Lr56$  en  $Xgwm427$  geskied het – hierdie rekombinante sal slegs met die gebruik van nuwe merkers verder georden kan word.



**Tabel 3-3A:** Allosindetiese oorkruisingsdata vir drie loci uit Tabel 3-1. Die alleelsimbole is gekodifiseer vir gerief van voorstelling; die dominante alleel by elke lokus verteenwoordig die koring-polimorfisme en die resessiewe alleel die *Ae. sharonensis*-verhaalde nul-alleel

<i>Xgwm427</i> ( <i>A</i> = lokus aanwesig; <i>a</i> = lokus afwesig)	<i>Xgwm334</i> ( <i>B</i> = lokus aanwesig; <i>b</i> = lokus afwesig)	<i>Xgwm459</i> ( <i>C</i> = lokus aanwesig; <i>c</i> = lokus afwesig)	Aantal gamete	Gameet-tipe <sup>1</sup>
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	104	OT
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	0	II
<i>a</i>	<i>B</i>	<i>c</i>	1	I, II
<i>a</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	22	I
<i>A</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	11	I
<i>A</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	1	I, II
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>c</i>	3	II
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	14	OT
			<b>156</b>	

<sup>1</sup> OT = ouertipe gameet; I = produk van oorkruising tussen *A* en *B*; II = produk van oorkruising tussen *B* en *C*.

**Tabel 3-3B:** Verwagte frekwensies van oorkruisingsprodukte indien die weerstandsgeen op die lang arm of die kort arm van chromosoom 6A voorkom.

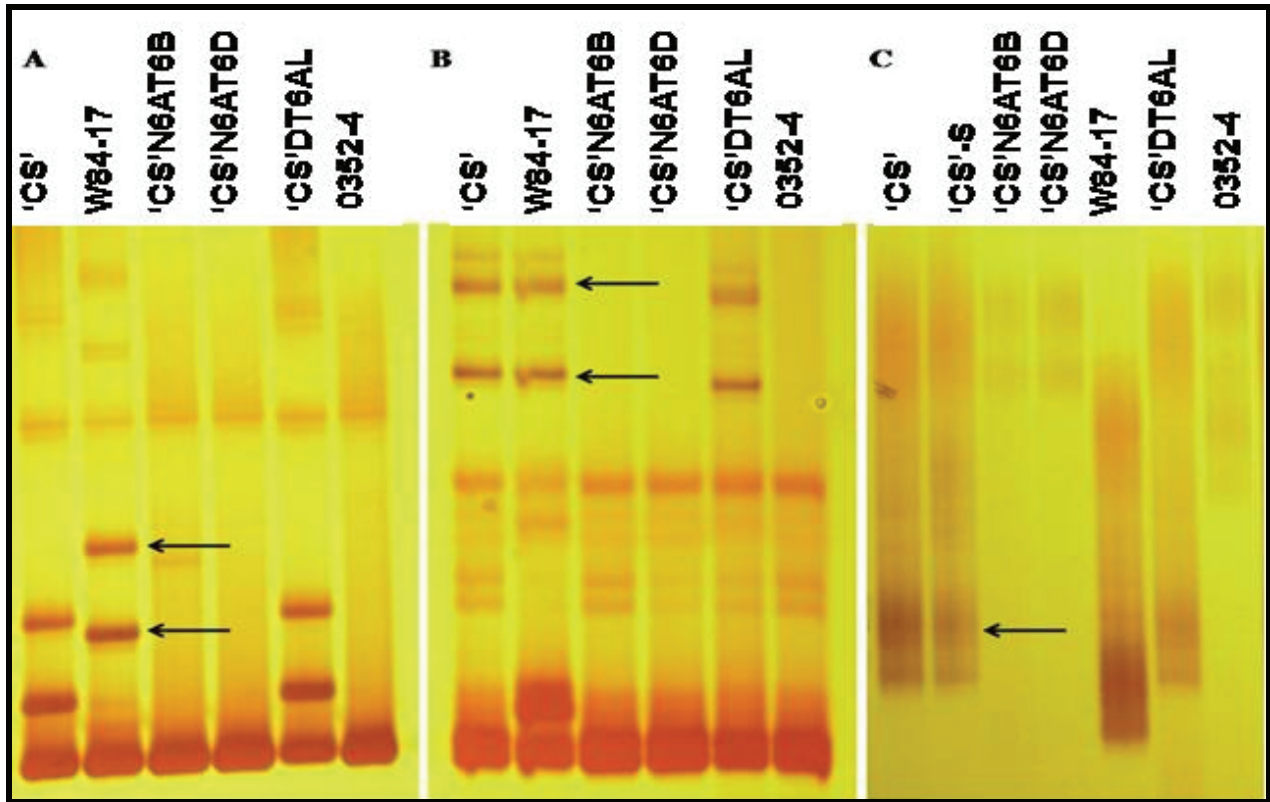
<b>Gameetgenotipe as die weerstandsgeen (R) op 6AL lë</b>	<b>Fre- kwensie</b>	<b>Gameettipe 1</b>	<b>Gameetgenotipe as die weerstandsgeen (R) op 6AS lë</b>	<b>Fre- kwensie</b>	<b>Gameettipe<sup>2</sup></b>
<i>Rabc</i>	104	OT	<i>abcR</i>	104	OT
<i>RabC</i>	0	III	<i>abCR</i>	0	II; III
<i>RaBc</i>	1	II; III	<i>aBcR</i>	1	I; II
<i>RaBC</i>	22	II	<i>aBCR</i>	22	I; III
<i>RAbc</i>	11	I; II	<i>AbcR</i>	11	I
<i>RAbC</i>	1	I; II; III	<i>AbCR</i>	1	I; II; III
<i>RABc</i>	3	I; III	<i>ABcR</i>	3	II
<i>RABC</i>	14	I	<i>ABCR</i>	14	III
	<b>156</b>			<b>156</b>	

<sup>1</sup> OT = ouertipe; I = produk van oorkruising tussen weerstandslokus en A; II = produk van oorkruising tussen A en B; III = produk van oorkruising tussen B en C.

<sup>2</sup> OT = ouertipe; I = produk van oorkruising tussen A en B; II = produk van oorkruising tussen B en C; III = produk van oorkruising tussen C en die weerstandslokus.

Die ses mikrosatelliet-loci wat gebruik was, was dus informatief in terme van die seleksie van plante met verkorte translokasies asook om 'n idee te gee waar die *Lr56* weerstandsgeen geleë is. Die mikrosatellietmerkers het die 156 bestande toetskruisplante, 06M04, verminder na slegs 29 bestande plante waaronder daardie rekombinante wat die kortste translokasies besit asook daardie rekombinante waarvan die breekpunt tussen *Lr56* en *Xgwm427* die naaste aan *Lr56* is (Tabel 3-1). In 'n poging om die geselekteerde groep verder te ontleed is daar gekyk na nog drie mikrosatellietloci (*Xgwm617*, *Xgwm570* en *Xwmc256*) wat in die tersaaklike gebied karter asook anonieme AFLP-merkers wat binne die ongekarteerde spesiechromatien mag voorkom.

Die drie mikrosatellietloci is onderskeidelik op die toetspaneel (Tabel 2-1) getoets om hul chromosoomligging asook bruikbaarheid te bepaal. Al drie merkers is op poli-akriëlamied geskei (Figuur 3-8).




**Figuur 3-8:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte van die (A) WMC256; (B) GWM570 en (C) GWM617 mikrosatellietinleiers op die toetspaneel (Tabel 2-1) (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5-6 ure). Teenwoordigheid van die polimorfiese bande in 'CS'DT6AL dui daarop dat hierdie merkers op chromosoomarm 6AL voorkom.

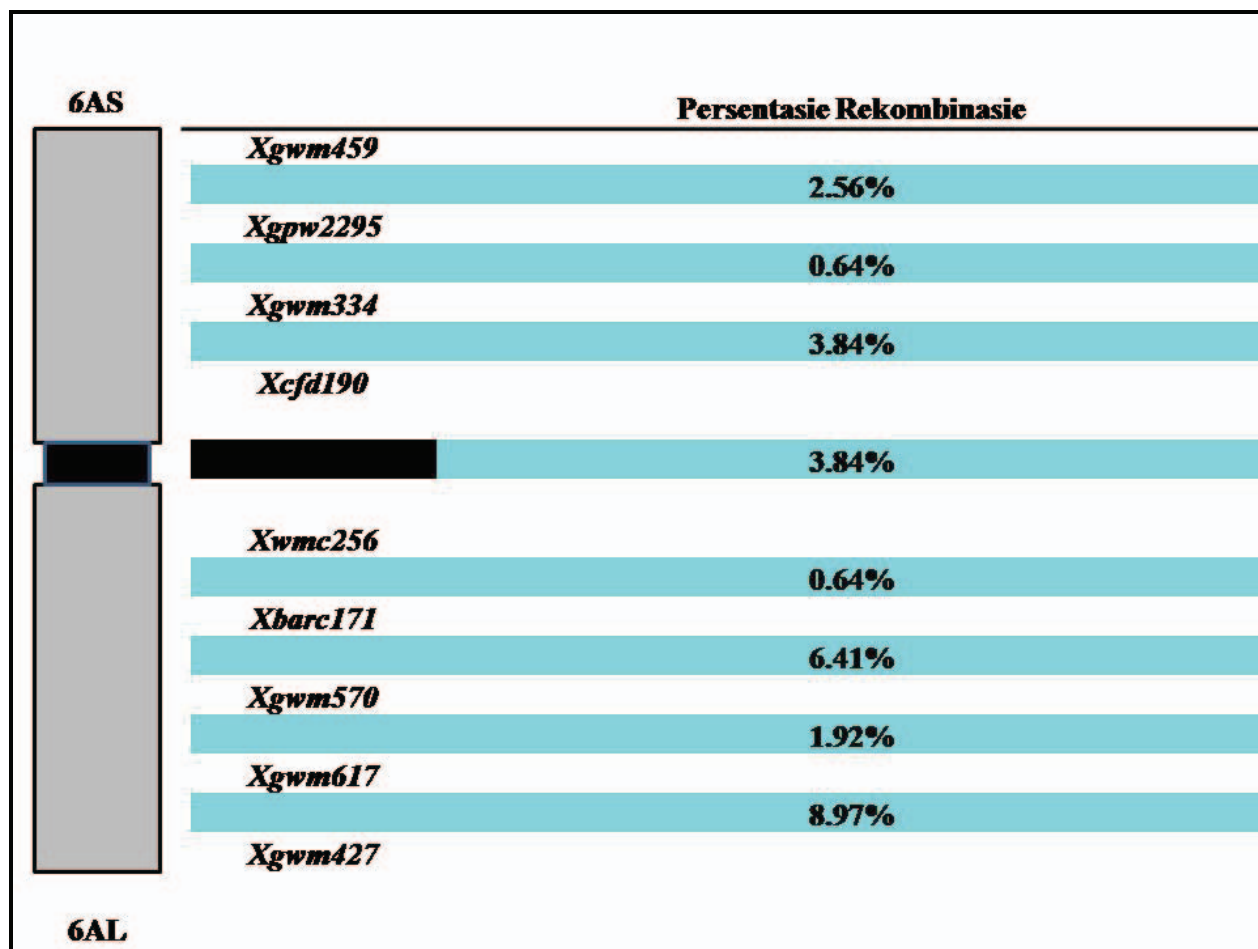
Hierdie drie merkers is op die volle stel van 52 verkorte rekombinante ge-evalueer sodat hulle verhoudelik tot die vorige ses mikrosatellietloci gekarteer kon word. Jelfotos verkry na die sifting van die 52 translokasie rekombinante word in die addendum weergegee. Twee-en-dertig plante het rekombinasie getoon by die *Xwmc256* lokus (Figure 6.1.7-1 tot 6.1.7-2); 34 plante het

rekombinasie getoon by die *Xgwm570* lokus (Figure 6.1.8-1 tot 6.1.8-2) terwyl 37 plante rekombinasie getoon het by die *Xgwm617* lokus (Figure 6.1.9-1 tot 6.1.9-4).

**Tabel 3-4:** Data verkry na tipering van 156 bestande toetskruisings- $F_1$  plante met die oorspronklike 6 mikrosatellietmerkers asook 'n verdere drie mikrosatellietmerkers. 'n "K" dui op teenwoordigheid van die *Triticum aestivum* alleel van die mikrosatellietlokus en 'n "S" dui op teenwoordigheid van die *Aegilops sharonensis* nul-alleel.

										
Lang(L-)arm					Centromeer	Kort(S-)arm				
<i>Xgwm427</i>	<i>Xgwm617</i>	<i>Xgwm570</i>	<i>Xbarc171</i>	<i>Xwmc256</i>		<i>Xcfd190</i>	<i>Xgwm334</i>	<i>Xgpw2295</i>	<i>Xgwm459</i>	Totale aantal plante
K	K	K	K	K		K	K	K	K	14
K	K	K	K	K		K	K	K	S	3
K	K	K	K	K		K	S	S	S	2
K	K	K	K	K		S	S	K	K	1
K	K	S	K	K		K	K	K	K	1
K	K	S	K	K		S	S	S	S	1
K	K	K	S	S		S	S	S	S	3
K	K	S	S	S		S	S	S	S	1
K	S	S	S	S		S	S	S	S	4
S	K	K	K	K		K	K	K	K	9
S	K	K	K	K		K	K	K	S	1
S	S	S	K	K		K	K	K	K	6
S	S	S	S	K		K	K	K	K	1
S	S	S	S	S		K	K	K	K	2
S	S	S	S	S		S	K	K	K	4
S	-	-	-	-		-	S	-	-	104

**Tabel 3-5:** Relatiewe posities van die bruikbare mikrosatellietmerkers op chromosoom 6A en geraamde allosindetiese rekombinasie-frekwensies tussen aangrensende loci, uitgewerk volgens die data in Tabel 3-4.



Ontleding van die rekombinasiedata van Tabel 3-4 (en die fisiese karteringsdata van die lokus uit die Graingenes webtuiste) het daarop gedui dat *Xwmc256* tussen die sentromeer en *Xbarc171* geleë is (Tabel 3-5). *Xgwm 617* en *Xgwm570* karteer tussen *Xbarc171* en *Xgwm427*. Nie een van die drie loci verskaf dus aanvullende inligting rakende die groottes van die oorblywende 29 rekombinante nie. In die afwesigheid van verdere nuttige (beskryfde) mikrosatellietloci wat distaal van *Xgwm427* geleë was, was dit dus nodig om ander merkertipes te evalueer.

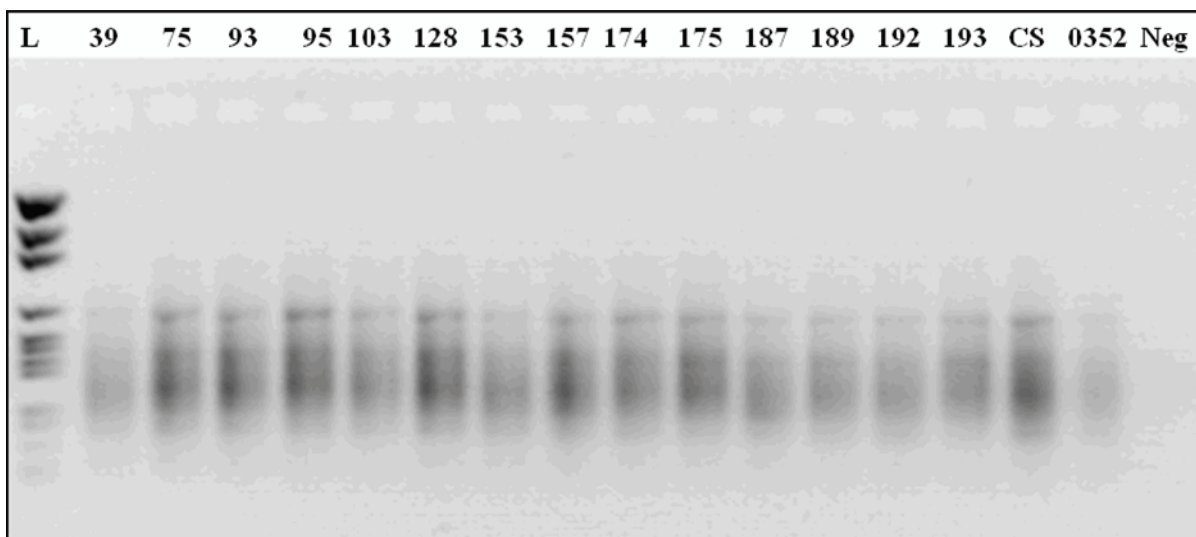
### 3.3 GEAMPLIFISEERDE-FRAGMENTLENGTE-POLIMORFISMES (AFLPs)

Die mikrosatellietmerkers het die 156 bestande toetskruisplante, 06M04, verminder na slegs 29 bestande plante waaronder daardie rekombinante wat die kortste translokasies besit asook daardie rekombinante waarvan die breekpunt tussen *Lr56* en *Xgwm427* die naaste aan *Lr56* is.

Die verkorte rekombinante is vir AFLP-analise gebruik in die hoop om verdere merkers op te spoor om die plante verder te karakteriseer. 'CS', W84-17 en 0352-4 is as kontroles gebruik om te bevestig dat die waargenome polimorfismes kan differensieër tussen koring- en translokasiechromatien.

#### 3.3.1 Restriksie-vertering en ligasie van passtukke

Elke monster is verteer deur gebruik te maak van *EcoRI/PstI* en *MseI* endonuklease. Die ligering van passtukke is in dieselfde reaksie uitgevoer. Die passtukke bind aan elke fragment wat gesny is deur die endonukleases. Nadat die reaksie oornag teen kamertemperatuur gelos is, is 'n gedeelte van die produkte op 'n 1.5 % agarose jel geëlektroforeer en gevisualiseer met ethidiumbromied.

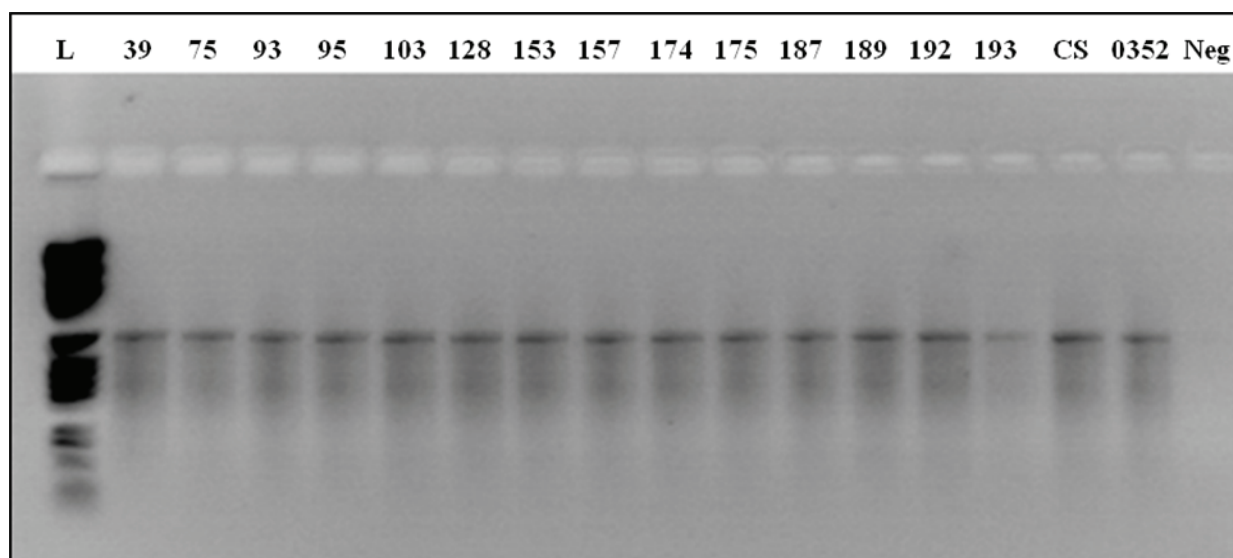


**Figuur 3-9:** Jel-foto van die produkte van die *MseI/EcoRI* restriksie-ligasie reaksies met *MseI/EcoRI* passtukke (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min).

Die gDNS word in hierdie restriksie-ligasie reaksies met 'n lae sny-frekwensie endonuklease (*EcoRI/PstI*) en 'n hoë frekwensie snyer (*MseI* endonuklease) gesny. Sodanige snyding genereer 'n groot aantal fragmente wat as 'n ligte smeer op die jel-foto vertoon (Figuur 3-9). Die oorblywende produk is 10 X met TE-buffer verdun waarna 'n gedeelte gebruik is vir die pre-selektiewe amplifikasie.

### 3.3.2 Pre-selektiewe amplifikasie

Pre-selektiewe amplifikasie maak gebruik van inleiers wat komplementêr is aan die passtukke wat aan al die restriksie-fragmente geheg het. Elke inleier het egter een addisionele nukleotied aan sy 3'-kant wat aan die oorspronklike DNS-volgorde langs die passtuk bind. Slegs 1 uit 16 fragmente sal gevolglik geamplifiseer word. 'n Proporsie van die amplifikasieprodukte is op 'n 1.5 % agarose jel (100 V, 45 min) geëlektroforeer en gevisualiseer met ethidium-bromied om te bevestig dat amplifikasie geskied het.



**Figuur 3-10:** Jel-foto wat die produkte van die pre-selektiewe PKR-reaksies aandui met *MseI* en *EcoRI* pre-selektiewe inleiers (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min).

Slegs 'n gedeelte van die restriksie-ligasie produkte word deur die pre-selektiewe PCR-reaksie geamplifiseer en dit gee aanleiding tot 'n band-patroon op die agarose jel (Figuur 3-10). Die pre-selektiewe produkte word weereens 10 X verdun in TE-buffer en 'n gedeelte van die verdunning word gebruik vir selektiewe amplifikasie.

### 3.3.3 Selektiewe amplifikasie

Die verdunde produk van die pre-selektiewe amplifikasie is as templaats-DNA gebruik vir die selektiewe PCR-reaksie.

- a. Die pre-selektiewe amplifikasieprodukte wat verkry is na vertering met *EcoRI*- en *MseI*-endonukleases; binding met *EcoRI*- en *MseI*-passtukke en amplifikasie met *EcoRI* en *MseI* pre-selektiewe inleiers, is in multipleksreaksies gebruik. Elke *MseI*-inleier (Tabel 2-3) behalwe *MseI*-TGA is afsonderlik met die drie *EcoRI*-inleiers (elk met sy eie fluoresserende verbinding) in 'n PCR-reaksie geamplifiseer.
- b. Pre-selektiewe amplifikasieprodukte wat verkry is deur met *PstI*- en *MseI*-endonukleases te verteer; *PstI*- en *MseI*-passtukke te bind, en met *PstI* en *MseI* pre-selektiewe inleiers te amplifiseer, is benut in selektiewe amplifikasie-reaksies met *MseI*-TGA en *PstI*-GTT inleiers. Hierdie reaksies is uitgevoer aangesien dit 'n polimorfisme genereer het wat op 6AS van koring, naby die telomeer gekarteer is (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical/groupe6v2.xls>).

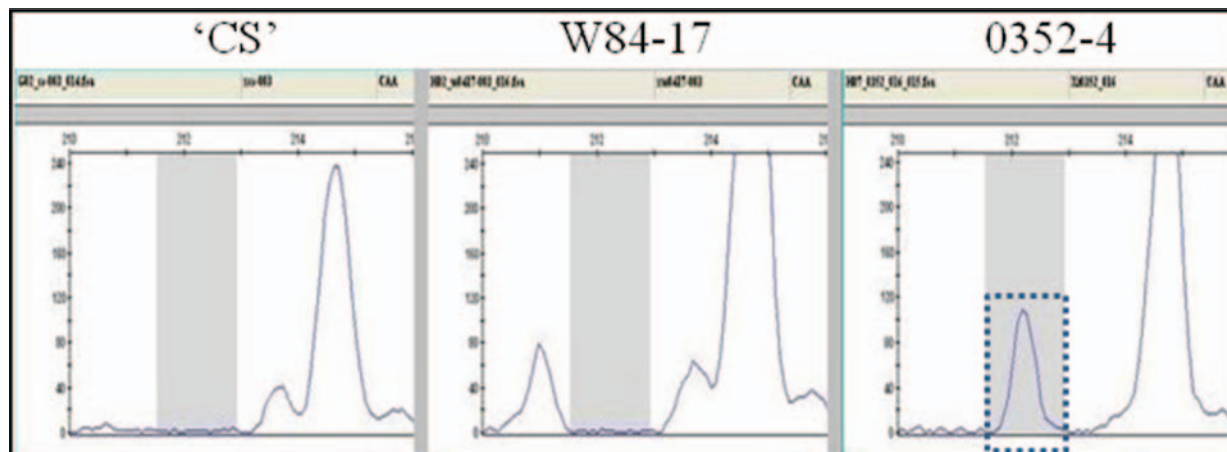
Dus is 'n totaal van 34 inleier-kombinasies getoets op die 29 verkorte rekombinante en die kontroles 'CS', W84-17 en 0352-4. Die inleiers se nukleotiedvolgordes is komplementêr aan die passtukke se volgordes maar bevat 2 tot 3 ekstra nukleotiede aan die 3'-ent van die inleier. Sodoende word die pre-selektiewe amplifikasie-fragmente verminder tot 'n meer analiseerbare getal. Die ekstra nukleotiede kan die pre-selektiewe amplifikasie-fragmente sodanig verminder dat slegs 1 uit 4096 fragmente geamplifiseer word indien beide inleiers 3 ekstra nukleotiede besit.



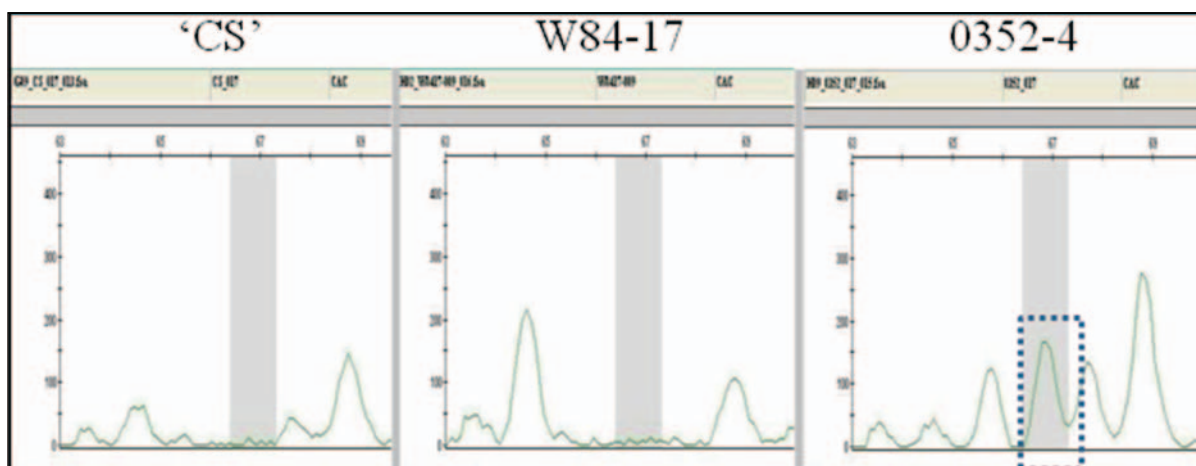
### 3.3.4 *Deteksie van die selektiewe amplifikasieprodukte en data-analise*

Die PCR-produkte is deur die Sentrale Analitiese Fasiliteite afdeling van Stellenbosch Universiteit op 'n 'Genetic Analyzer' geskei. 'n Interne grootte-standaard is by elke reaksie gevoeg ten einde laan-tot-laan of jel-tot-jel variasie te minimiseer. Die 'Genetic Analyzer' spoor fragmente met behulp van die fluoresserende kleurstowwe wat aan die *EcoRI*-inleiers geheg is, op. Omdat die verskillende *EcoRI*-inleiers verskillende kleurstowwe gebruik (FAM (blou), JOE (groen) en NED (geel)), kan die fragmente in 'n multipleksreaksie geskei word. Die resultate verkry na skeiding met die 'Genetic Analyzer' is vervolgens gevisualiseer en geanaliseer met gebruik van 'GeneMapper' sagteware. NED word egter in 'GeneMapper' as swart vertoon omdat dit makliker is om te visualiseer.

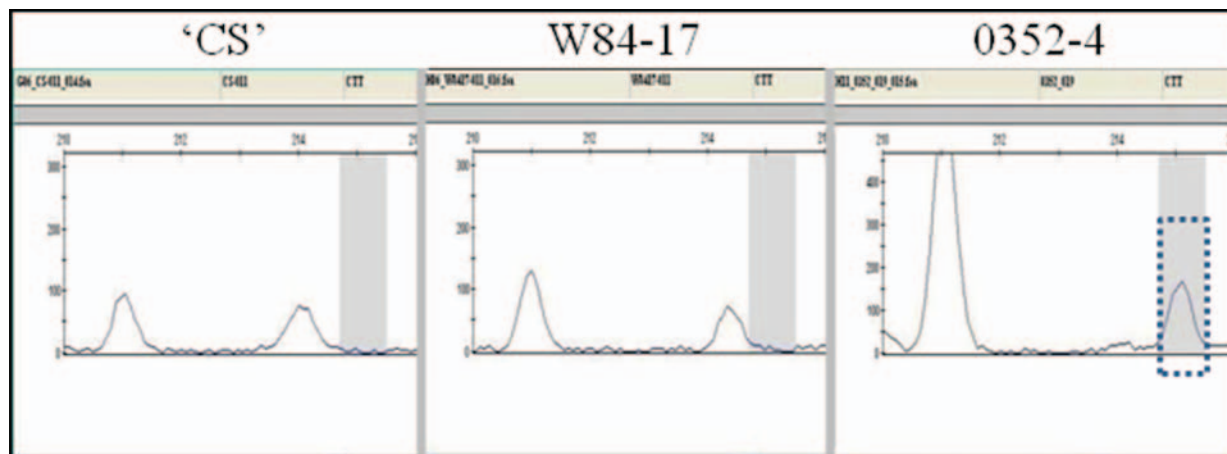
Die data wat met 'GeneMapper 2.0' verkry is, is visueel ontleed. Daar is gemiddeld 44 fragmente per inleierkombinasie geamplifiseer. Hoewel die AFLP data-analise talle polimorfismes gelewer het, is daar slegs gefokus op polimorfismes tussen 'CS' en 0352-4. Omdat 0352-4 die translokasie besit in 'n 'CS' genetiese agtergrond, bring hierdie vergelyking polimorfismes wat binne die translokasie geskied het na vore. Ses polimorfismes wat aan bogenoemde vereistes voldoen is uit die amplifikasieprodukte van die 34 verskillende inleierkombinasies geïdentifiseer. Figure 3-11 tot 3-16 dui die polimorfismes tussen 'CS', W84-17 en 0352-4 aan. Die ses polimorfismes kom uit vier inleierkombinasies naamlik *MseI*-CC/*EcoRI*-ACA (1 polimorfisme), *MseI*-CAA/*EcoRI*-ACA (1 polimorfisme), *MseI*-CAC/*EcoRI*-AAC (1 polimorfisme) en *MseI*-CTT/*EcoRI*-ACA (3 polimorfismes). In geen ander inleierkombinasies kon daar variasie tussen 'CS' en 0352-4 waargeneem word nie. Al ses polimorfismes toon amplifikasie in 0352-4, is afwesig in beide 'CS' en W84-17 en is dus spesifiek vir die translokasie. Die polimorfismes is dus dominant en is in binêre formaat (merker teenwoordig = "1" en merker afwesig = "0") ge-evalueer. "-" is gebruik indien die merker nie ondubbelsinnig ge-evalueer kon word nie of as 'n monster swak of geen amplifikasie getoon het nie.



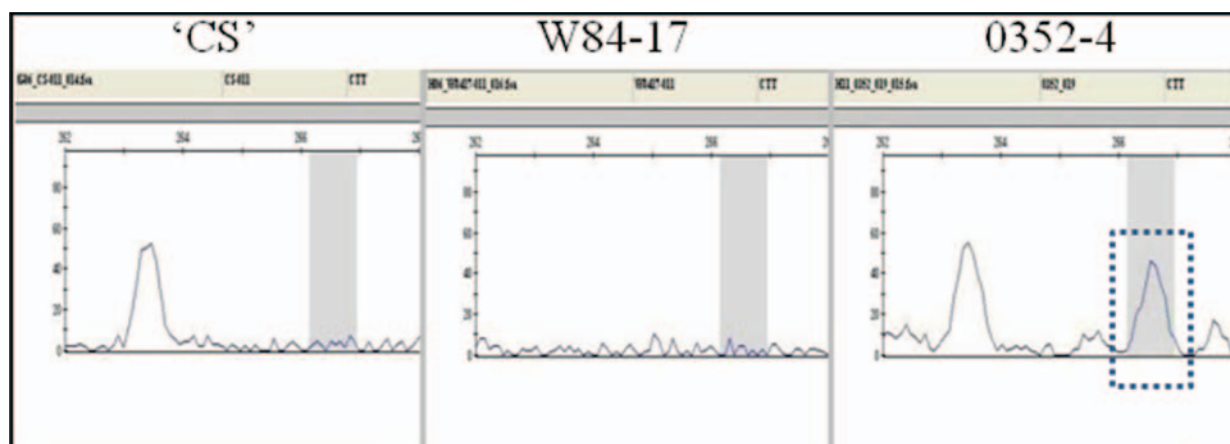
**Figuur 3-11:** *Aegilops sharonensis*-specifieke polymorfiese AFLP-fragment geamplifiseer met die *Mse*I-CAA & *Eco*RI-ACA inleier-kombinasie en gevisualiseer met ‘GeneMapper’ sagteware. Die polimorfisme (212 bp groot) kom in 0352-4 voor maar nie in ‘CS’ en W84-17 nie.



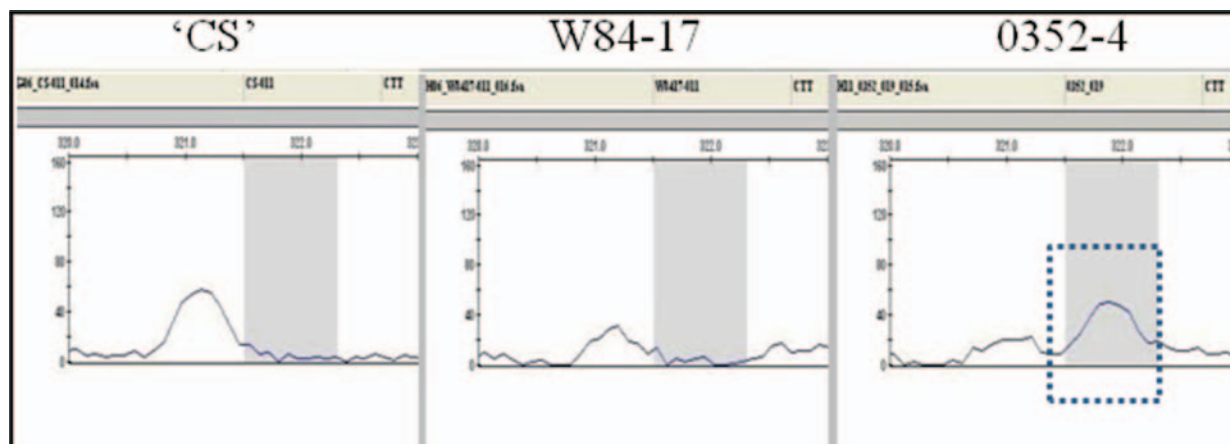
**Figuur 3-12:** *Aegilops sharonensis*-specifieke polymorfiese AFLP-fragment geamplifiseer met die *Mse*I-CAC & *Eco*RI-AAC inleier-kombinasie en gevisualiseer met ‘GeneMapper’ sagteware. Die polimorfisme (67 bp groot) kom in 0352-4 voor maar nie in ‘CS’ en W84-17 nie.



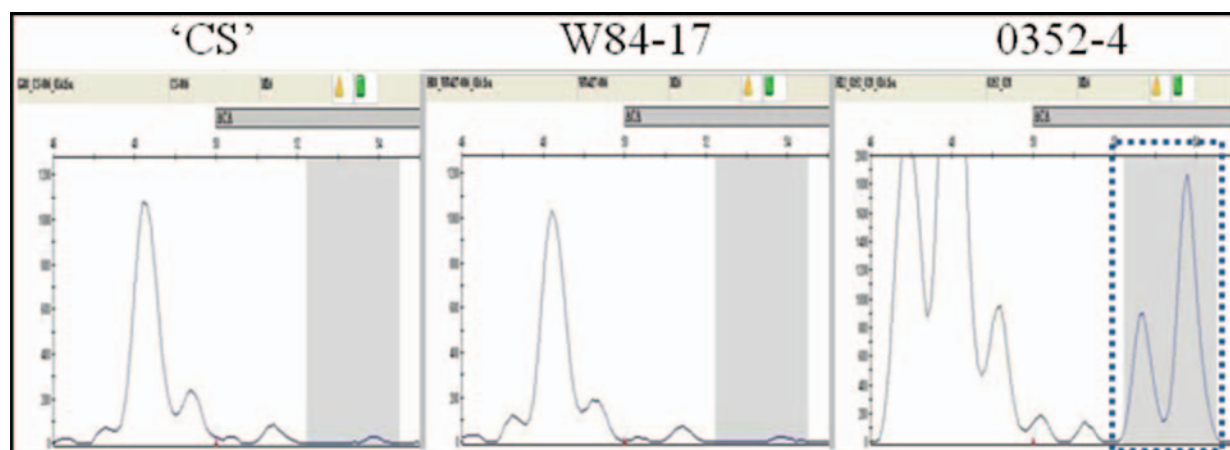
**Figuur 3-13:** *Aegilops sharonensis*-specifieke polymorfiese AFLP-fragment geamplifiseer met die *Mse*I-CTT & *Eco*RI-ACA inleier-kombinasie en gevisualiseer met ‘GeneMapper’ sagteware. Die polimorfisme (215 bp groot) kom in 0352-4 voor maar nie in ‘CS’ en W84-17 nie.



**Figuur 3-14:** *Aegilops sharonensis*-specifieke polymorfiese AFLP-fragment geamplifiseer met die *Mse*I-CTT & *Eco*RI-ACA inleier-kombinasie en gevisualiseer met ‘GeneMapper’ sagteware. Die polimorfisme (266.5 bp groot) kom in 0352-4 voor maar nie in ‘CS’ en W84-17 nie.



**Figuur 3-15:** *Aegilops sharonensis*-spesifieke polimorfiese AFLP-fragment geamplifiseer met die *Mse*I-CTT & *Eco*RI-ACA inleier-kombinasie en gevisualiseer met ‘GeneMapper’ sagteware. Die polimorfisme (322 bp groot) kom in 0352-4 voor maar nie in ‘CS’ en W84-17 nie.



**Figuur 3-16:** *Aegilops sharonensis*-spesifieke polimorfiese AFLP-fragment geamplifiseer met die *Mse*I-CC & *Eco*RI-ACA inleier-kombinasie en gevisualiseer met ‘GeneMapper’ sagteware. Die polimorfisme (53 bp groot) kom in 0352-4 voor maar nie in ‘CS’ en W84-17 nie.

Soos blyk uit Figure 3-11 tot 3-16 is die intensiteite van die polimorfiese bande (aangedui op die Y-asse van die ‘GeneMapper’ geproduseerde grafieke) meesal laag. Die Y-as gebruik relatiewe fluorisierende intensiteit as eenheid om die intensiteit van fluoressensie te meet. Die intensiteit word bepaal deur die hoeveelheid fluoresserende kleurstof geassosieerd met daardie bandgrootte.

Een moontlike rede vir die lae intensiteite kan wees omdat die geamplifiseerde fragment 'n enkel-kopie fragment is. Die koring-genoom bestaan uit meer as 80 % herhaalde volgordes. Indien restriksie-fragmente dus selektief geamplifiseer word, kan daar verhoudelik meer kopie van dieselfde/verwante fragmente geamplifiseer word. Hierdie verhoging in die hoeveelheid van 'n fragment sal dus reflekteer in 'n verhoogde band-intensiteit. Daar teenoor sal 'n enkel-kopie fragment lei tot 'n lae intensiteit band. 'n Verdere moontlike rede vir die lae band-intensiteite wat in sommige gevalle gevind is mag wees dat die amplifikasie gewoon nie altyd dieselfde hoeveelheid totale produk opgelewer het nie, m.a.w. dit kan teruggevoer word na eksperimentele variasie.

Die volle groep van 29 oënskynlik-kortste rekombinante is vervolgens gekarakteriseer vir die teenwoordigheid van die ses AFLP loci (Figure 6.2-1 tot 6.2-29). Die data van die ses loci is toe geïntegreer met die data van die gekarteerde mikrosatellietmerkers om die relatiewe posisies van die ongekarteerde AFLP-merkers te vind (Tabel 3-6). Vir die doel is 'n fisiese karteringsbenadering gevolg waarin daar bloot gepoog is om die rekombinante so te plaas dat hul chromatien-verspreidingspatrone inpas by die van die geneties-gekarteerde loci. Uit die data blyk dit dat al die AFLP-merkers waarskynlik tussen die *Lr56* translokasie en die *Xgwm427* lokus (Tabel 3-6) karteer. Die rede waarom hierdie merkers in dieselfde area gekonsentreer is, mag toe te skryf wees aan die feit dat die een inleier by al die merkers konstant bly of met slegs een basispaar verskil. Die inleierkombinasies mag dus verwante volgordes in die betrokke chromosoomgebied opspoor.

Die AFLP merkers het dus drie van die 29 verkorte rekombinante geïdentifiseer wat die heel kleinste translokasies besit (Tabel 3-6). Een van die rekombinante plante, 167, is nie volledig ge-evalueer nie (onvoldoende DNA).

**Tabel 3-6:** Samevatting van al die mikrosatelliet- en AFLP-data ingesamel ten opsigte van 52 gerekombineerde vorms van die *Lr56/Yr38* translokasie (K = koring chromatiem; S = *Ae. sharonensis* chromatiem).

6AL telomer	LrS12	Mkr1-CC & Ezo RL-ACA	Mkr1-CNA & Ezo RL-AC	Mkr1-CTT & Ezo RL-AC	Mkr1-CMC & Ezo RL-AC	Xgwm47	Xgwm67	Xgwm50	Xtrac171	Xuwm256	Xgfl100	Xgwm334	Xgwm2205	Xgwm69	Rekombinante#	# ontfermings
K	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	39	1
K	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	157	1
K	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	175	1
K	S					K	K	K	K	K	K	K	K	K	167	1
K	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	S	66	2
K	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	S	101	2
K	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	S	165	2
K	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	S	S	S	S	122	2
K	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	S	S	S	S	40	2
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	75	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	93	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	95	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	103	1
K	S	S	S	-	-	K	K	K	K	K	K	K	K	K	128	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	153	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	174	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	187	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	189	1
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	192	1
K	S	S	S	S	S	K	K	S	K	K	K	K	K	K	193	3
K	S	S	S	S	S	K	K	S	K	K	S	S	S	S	114-1	4
K	S	S	S	S	S	K	K	K	S	S	S	S	S	S	47	2
K	S	S	S	S	S	K	K	K	S	S	S	S	S	S	100	2
K	S	S	S	S	S	K	K	K	S	S	S	S	S	S	105	2
K	S	S	S	S	S	K	S	S	S	S	S	S	S	S	44	2
K	S	S	S	S	S	K	S	S	S	S	S	S	S	S	52	2
K	S	S	S	S	S	K	S	S	S	S	S	S	S	S	53	2
K	S	S	S	S	S	K	S	S	S	S	S	S	S	S	123	2
K	S	S	-	S	S	K	K	S	S	S	S	S	S	S	182	2
K	S	S	S	S	S	K	K	K	K	K	S	S	K	K	120	3
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	72	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	84	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	94	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	149	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	162	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	166	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	107	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	168	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	131	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	K	143	1
K	S					S	K	K	K	K	K	K	K	S	126	2
K	S					S	S	S	K	K	K	K	K	K	121	1
K	S					S	S	S	K	K	K	K	K	K	127	1
K	S					S	S	S	K	K	K	K	K	K	135	1
K	S					S	S	S	K	K	K	K	K	K	147	1
K	S					S	S	S	K	K	K	K	K	K	81	1
K	S					S	S	S	S	K	K	K	K	K	109	1
K	S					S	S	S	S	S	K	K	K	K	169	1
K	S					S	S	S	S	S	K	K	K	K	170	1
K	S					S	S	S	S	S	S	K	K	K	171	1
K	S					S	S	S	S	S	S	K	K	K	65	1
K	S					S	S	S	S	S	S	K	K	K	79	1
K	S					S	S	S	S	S	S	K	K	K	91	1

Ten einde die herhaalbaarheid van die AFLP-data te toets, is die eksperiment gedeeltelik herhaal. Vir elk van die 14 rekombinante plante wat by al die mikrosatellietloci rekombinasie getoon het (groep a in Tabel 3-1) is daar F<sub>1</sub>-verhaalde F<sub>2</sub>-sade geplant (20 sade per familie) en met UVPrt8 geïnokuleer. Die saailing blaarroesweerstand wat hierdie plante getoon het word in Tabel 3-7 opgesom. DNS is geëkstraer uit 'n bestande plant van elk van die 14 F<sub>1</sub>-verhaalde F<sub>2</sub>-families. AFLP-analise is uitgevoer op 'n substel van die veertien rekombinante wat die volgende ingesluit het: vyf monsters (93, 95, 103, 187 en 193) wat in die eerste lopie geen rekombinasie vir die vier AFLP-loci getoon het nie; die drie monsters (39, 157 en 175) wat wel rekombinasie getoon het asook 'CS' (Figuur 6.2-30 tot Figuur 6.2-40). Hierdie F<sub>2</sub>-nageslag kon dus dien as 'n onafhanklike bevestiging.

**Tabel 3-7:** Saailing blaarroesdata verkry na inokulasie (UVPrt8) van die F<sub>1</sub>-verhaalde F<sub>2</sub>-nageslag van die 14 plante met die minste vreemde chromosom.

Rekombinant													
39	75	93	95	103	128	153	157	174	175	187	189	192	193
21p; 7p4	19p;	18p;	21p;	14p;	14p;	15p; 2p4	7p; 4p4	15p;	12p; 7p4	16p; 4p4	20p; 1p4	13p;	8p;

Die data verkry van die AFLP-analise op die F<sub>1</sub>-verhaalde F<sub>2</sub>-families was vergelykbaar met die eerste data wat verkry is (Figuur 6.2-1 tot Figuur 6.2-40). Die analise is dus herhaalbaar en verder is dit 'n bevestiging dat die geselekteerde plante die korrekte translokasies besit.

Hierdie studie het gefokus op die karakterisering van verkorte rekombinante wat steeds die *Lr56* lokus besit. *Yr38* is egter 'n ewe nuttige geen maar die studie werp geen lig op die relatiewe ligging van hierdie geen nie. Die groep rekombinante wat verhaal is stel egter uitstekende uitgangsmateriaal daar waarmee *Yr38* met relatief min addisionele insette ook gekarteer kan word en geskikte rekombinante wat hierdie lokus dra, herwin kan word.

---

## 4. SAMEVATTING

---

Die Planteteeltseksie van die Departement Genetika (Stellenbosch Universiteit) het 'n eksperiment uitgevoer wat daarop gemik was om 'n translokasie op chromosoom 6A van gewone koring te verkort. Die getranslokeerde segment is van *Aegilops sharonensis* afkomstig en dra gene vir blaarroes- (*Lr56*) en streeproes- (*Yr38*) weerstand. Omdat die translokasie baie groot is was dit nodig om dit te verkort voordat dit kommersiële aanwending kan vind. 'n Homoeoloë paringsinduksie eksperiment is uitgevoer en 'n groot aantal toetskruisnageslag is geproduseer waaronder daar moontlike rekombinante kon voorkom. Die doel van hierdie studie was om hierdie toetskruisnageslag te tipeer. Molekulêre merkers is ingespan om te bepaal of rekombinasie plaasgevind het, om die gerekombineerde plante te identifiseer en om sodanige rekombinante verder te karakteriseer.

Mikrosatellietmerkers is gebruik in die aanvanklike karakterisering. Mikrosatelliete is gekies omdat daar betreklike goeie genetiese kaarte in die literatuur beskikbaar is wat op die merkertipe gebaseer is. Nege mikrosatellietinleierstelle wat op chromosoom 6A gekarteer is en polimorf was op die ouerlyne is gebruik om die 156 bestande  $F_1$ 's te evalueer. Die merkers het dit moontlik gemaak om 29 plante te identifiseer wat die kleinste hoeveelhede spesiechromatien oorgehou het. Die data het bevestig dat die liggings van die nege loci in die translokasie ooreenstem met die inligting vervat in die 'GrainGenes' mikrosatellietkaarte. Die data het ook getoon dat die verkorte translokasie in die 29 plante nie binne die gebied voorkom wat deur die mikrosatellietloci gedek word nie maar eerder in die gebied tussen *Xgwm427* en die distaal geleë translokasiebreekpunt. Omdat daar nie verdere geskikte merkers beskikbaar was om laasgenoemde gebiede te ondersoek nie is 'n poging aangewend om AFLP-merkers te vind wat binne die streke voorkom.

Vier-en-dertig inleierkombinasies is gebruik vir die opsporing van merkers wat bruikbaar kon wees vir die verdere karakterisering van die 29 plante met die verkorte translokasies. Die translokasiehomosigoot, 0352-4, en koringkontroles 'CS' en W84-17 is gebruik om moontlike merkers te identifiseer. Ses bruikbare polimorfismes is geïdentifiseer met vier van die 34 inleierkombinasies. Hierdie polimorfismes is teenwoordig in 0352-4 maar afwesig in 'CS' en W84-17. Die ses merkers is vervolgens op die groep van 29 verkorte translokasies getoets en het drie plante uitgesonder wat vir al die AFLP-merkers rekombinasie toon. Die resultaat is vervolgens met 'n onafhanklike datastel bevestig. Hiervoor is die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van 'n



substel van 14 plante met verkorte translokasies gesif vir bestande segregate. DNS is uit die bestande plante geëkstraer en die AFLP-analise is daarop herhaal. Die AFLP-resultate wat voorheen verkry was, is wel herhaalbaar. Die gebruik van die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag het ook bevestig dat die oorspronklike plante korrek genommer en ontleed is. Die lae intensiteit van sommige van die AFLP polimorfiese merkers kan moontlik aan enkel-kopie amplifikasie en eksperimentele variasie toegeskryf word.

Die relatiewe posisie van die *Lr56* lokus blyk om tussen die oorspronklike 6AL breekpunt van die *Lr56/Yr38*-translokasie en die *MseI*-CC/*EcoRI*-ACA AFLP merker te lê. Geen merker is egter gekoppel aan die weerstandsgeen nie maar die translokasie is tot so 'n mate verklein dat dit waarskynlik kommersieel benutbaar sal wees. Die studie het gefokus op die ligging en herwinning van die *Lr56* lokus. Ten einde te bepaal of die *Yr38* lokus saam met *Lr56* behoue gebly het, sal dit nodig wees om die volle groep van 52 rekombinante ook vir streeproesweerstand te karakteriseer. Indien *Yr38* nie in die drie kortste rekombinante voorkom nie, sal die rekombinante waarin dit wel voorkom gebruik moet word vir vasstelling van 'n strategie om hierdie geen ook te herwin. Die drie kortste rekombinante sal vervolgens vir kommersiële bruikbaarheid geëvalueer moet word deur dit deur terugkruising in naby-isogeniese lyne in te bou. Sodanige lyne sal dan in gerepliseerde proewe vir opbrengs en kwaliteit getoets moet word. Dit sal waarskynlik moeilik wees om die groep van drie kortste rekombinante verder te karakteriseer. Die DArT-tegniek mag egter hier 'n uitkoms bied en die drie seleksies behoort ge-evalueer te word vir die teenwoordigheid van anonieme DArT-loci. Laastens sal dit nodig wees om 'n molekulêre merker vir die kortste rekombinant(e) te vind. Indien bruikbare DArT-loci wel opgespoor kan word mag dit moontlik 'n basis bied vir merkerontwikkeling.

---

## 5. BRONNELYS

---

Abdel-Satar MA, Khalil MS, Mohamed IN, Abd-Elsalam KA, Verreet JA (2003) Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *Afr J Biotechnol* 2: 51-55

Akbari M, Wenzl P, Caig V, Carling J, Xia L, Yang S, Uszynski G, Mohler V, Lehmsiek A, Kuchel H, Hayden MJ, Howes N, Sharp P, Vaughan P, Rathmell B, Huttner E, Kilian A (2006) Diversity array technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor Appl Genet* 113: 1409-1420

Akhunov ED, Akhunov AR, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Hummel D, Lazo G, Chao S, Anderson OD, David J, Qi L, Enchalier B, Gill BS, Miftahudin, Gustafson JP, La Rota M, Sorrells ME, Zhang D, Nguyen HT, Kalavacharla V, Hossain K, Kianian SF, Peng J, Lapitan NLV, Wennerlind EJ, Nduati V, Anderson JA, Sidku D, Gill KS, McGuire PE, Qualset CO, Dvorak J (2003) Synteny perturbation between wheat homoeologous chromosomes caused by locus duplications and deletions correlate with recombination rates. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 no. 19: 10836-10841

Antonov AI, Marais GF (1996) Identification of leaf rust resistance genes in *Triticum* species for the transfer to common wheat. *S Afr J Plant Soil* 13: 55-60

Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218

Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, One Penn Plaza, New York, NY 10119

Bass HW, Marshall WF, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ (1997) Telomeres cluster *de novo* before the initiation of synapsis: A three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *J Cell Biol* 137:5-18

Batley J, Barker G, O'Sullivan H, Edwards KJ, Edwards D (2003) Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data. *Plant Physiol* 132: 84-91

Borlaug NE (1953) New approach to the breeding of wheat varieties resistant to *Puccinia graminis tritici*. *Phytopathology* 43:467

Borlaug NE (1968) Wheat breeding and its impact on world food supply. *Australian Acad Sci* pp. 1- 36

Borlaug NE (1972) A cereal breeder and ex forester's evaluation of the progress and problems involved in breeding rust resistant forest trees. In "Moderator's Summary". *Biology of Rust Resistance in Forest Trees*. Proc. NATO-IUFRO Advanced Study Institute, 17-24 Aug. 1969, p. 615-642. USDA Forest Service Misc. Publication 1221

Borlaug NE (2005) Sounding the Alarm on Global Stem Rust: An Assessment of Race *Ug99* in Kenya and Ethiopia and the Potential for Impact in Neighboring Regions and Beyond ([http://www.cimmyt.org/english/wps/news/2005/aug/pdf/Expert\\_Panel\\_Report.pdf](http://www.cimmyt.org/english/wps/news/2005/aug/pdf/Expert_Panel_Report.pdf)) 29 June 2008

Bothmer R, Seberg O & Jacobsen N (1992) Genetic resources in *Triticeae*. *Hereditas* 116: 141-150

Botstein D, White R, Skolnick M, Davis R (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331

Bryan GJ, Collins AJ, Stephenson P, Orry A, Smith JB, Gale MD (1997) Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet* 94: 557-563

Bryan GJ, Stephenson P, Collins A, Kirby J, Smith JB, Gale MD (1999) Low levels of DNA sequence variation among adapted genotypes of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 99: 557-563

Caldwell RM (1968) Breeding for general and/or specific plant disease resistance. In Proc. 3rd Int. Wheat Genetics Symp. p. 263-272. Canberra, Australia

Ceoloni C, Forte P, Ciaffi M, Nenno M, Bitti A, De Vita P, D'Egidio MG (2005) Chromosomally engineered durum wheat: The potential of alien gene introgressions affecting disease resistance and quality. *Cytogenet Genome Res* 109: 328-334

Chai X (1994) Chromosome translocations in the common wheat variety “Amigo”. *Hereditas* 121: 199-202

Chen X, Moore M, Milus EA, Long DL, Line RF, Marshall D, Jackson L (2002) Wheat Stripe Rust Epidemics and Races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the United States in 2000. *Plant Dis* 86: 39-46

Donini P, Koebner RM, Elias ML, Bougourd SM (1997) AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome* 40(4):521-526

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

Duke JA (1983) Handbook of Energy Crops. Unpublished ([http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Triticum\\_aestivum.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Triticum_aestivum.html)) 24 September 2007

Dudnikov AJ (2003) Allozymes and growth habit of *Aegilops tauschii*: genetic control and linkage patterns. *Euphytica* 129: 89-97

Endo TR, Gill BS (1996) The Deletion Stocks of Common Wheat. *J Hered* 87: 295-307

Esquinas-Alcázar JT (1993) Plant genetic resources. *Plant breeding: Principles and prospects*. Edited by Hayward MD, Bosemark NO & Romagosa I, Chapman & Hall, London, pp. 33-51

Evaluating Genetic Analysis Systems: Microsatellite Analysis (2004) Applied Biosystems. ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) 2 Februarie 2008

Evans LT, Peacock WJ (1981) Wheat science – today and tomorrow. Cambridge University Press

Ezrati S, Millet E, Manisterski J, Ben-Yehuda P, Agami M, Anikster Y (2005) Characterization of *Aegilops sharonensis* populations ([www.pgrforum.org/Documents/Conference\\_posters/Ezrati\\_et\\_al.pdf](http://www.pgrforum.org/Documents/Conference_posters/Ezrati_et_al.pdf)) 12 September 2007

Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO) – Corporate Document Repository (2006) Crop Prospects and Food Situation – No. 2 July 2006 (<http://www.fao.org/>) 14 Julie 2008

Feldman M, Sears ER (1981) The wild gene resources of wheat. Scientific American 244: 102 – 112

Feldman M (1988) Cytogenetic and molecular approaches to alien gene transfer in wheat. Proc 7<sup>th</sup> Int Wheat Genet Symp Cambridge UK pp 23-32

Forster BP, Ellis RP, Thomas WTB, Newton AC, Tuberosa R, This D, El-Enein RA, Bahri MH, Ben Salam M (2000) The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. J Exp Bot 51 No. 342

Francki M, Appels R (2002) Wheat functional genomics and engineering crop improvement, *Genome Biol* 3(5): 1013.1-1013.5

Frankel OH (1970) Genetic conservation in perspective. *Genetic Resources in Plants – Their Exploration and Conservation*. Blackwell Scientific Publications. pp. 469-489

Gale MD, Miller TE (1987) The introduction of alien genetic variation in wheat. *Wheat breeding – its scientific basis*. Ed. Lupton, F.G.H. Chapman and Hall Ltd London pp. 173-210

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: 1392-1400

Gill BS, Appels R, Botha-Oberholser A, Buell CR, Bennetzen JL, Chalhoub B, Chumley F, Dvořák J, Iwanaga M, Keller B, Li W, McCombie WR, Ogihara Y, Quetier F, Sasaki T (2004) A Workshop Report on Wheat Genome Sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics* 168: 1087-1096

Gill BS, Browder LE, Hatchett GH, Harvey TL, Martin TJ, Raupp WJ, Sharma HC, Waines JG (1983) Disease and insect resistance in wild wheats. *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto 1983*. pp. 785-792

Gill KS, Gill BS, Endo TR (1993a) A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma* 102: 374-381

Gill KS, Gill BS, Endo TR, Mukai Y (1993b) Fine physical mapping of *Ph1*, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. *Genetics* 134: 1231-1236

Gill KS, Gill BS (1996) A PCR-Based Screening Assay of *Ph1*, the Chromosome Pairing Regulator Gene of Wheat. *Crop Sci* 6:719-722

Goldstein DB, Pollock DD (1997) Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *J Hered* 88: 335-342

Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramash B (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390

Hayden MJ, Sharp PJ 2001 Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. *Nucleic Acids Res* 29(e44):1-6

Huttner E, Wenzl P, Akbari M, Caig V, Carling J, Cayla C, Evers M, Jaccoud D, Peng K, Patarapuwadol S, Uszynski G, Xia L, Yang S, Kilian A (2005) Diversity Array Technology: A Novel Tool for Harnessing the Genetic Potential of Orphan Crops (<http://www.diversityarrays.com/pub/Huttneretal2005.pdf>) 14 Julie 2008

Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* 29(e4): 25



Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker H, Vos P, Zabeau M, Kersters K (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142: 1881-1893

Jauhar PP, Chibbar RN (1999) Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome* 42: 570-583

Jensen NF (1952) Intervarietal diversification in oat breeding. *Agron J* 44:30-34

Johnson R (1988) Durable resistance to yellow (stripe) rust in wheat and its implications in plant breeding. In N.W. Simmonds & S. Rajaram, eds. *Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat*. p. 63-75

Jones K (1978) Aspects of chromosome evolution in higher plants. *Advances in botanical research* 6: 119 - 193

Kilian A, Huttner E, Wenzl P, Jaccoud D, Carling J, Caug V, Evers M, Heller-Uszynska K, Uszynski G, Cayla C, Patarapuwadol S, Xia L, Yang S, Thomson B (2005) The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome profiling for crop improvement. In Tuberosa et al.: *Proceedings of the International Congress In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution*. Avenue Media, Bologna; pp 443-461 ([http://www.dista.agrsci.unibo.it/doublehelix/proceedings/SECTION\\_IV/HELIX%20pp%20443-461.pdf](http://www.dista.agrsci.unibo.it/doublehelix/proceedings/SECTION_IV/HELIX%20pp%20443-461.pdf)) 14 Julie 2008

Kilian B, Okzan H, Deusch O, Effgen S, Brandolini A, Kohl J, Martin W, Salamini F (2006) Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes.

Molecular Biology and Evolution, (<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/msl151v1>) 10 September 2007

Kimber G, Feldman M (1987) Wild wheat – An introduction. Special report 353, College of Agriculture, University of Missouri-Columbia, USA

Klug WS, Cummings MR (2003) Concepts of Genetics, Seventh Edition, Pearson Education, Inc. Upper Saddle River, New Jersey 07458

Knott DR (1987) Transferring alien genes to wheat. Wheat and wheat improvement. Second edition, Ed. Heyne, E.G., Madison, Wisconsin, USA. pp. 462-471

Kwok P (2003) Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols. Human Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208, Totowa, New Jersey 07512

Langridge P, Laqudah ES, Holton TA, Appels R, Sharp PJ, Chalmes KJ (2001) Trends in genetic and genomic analyses in wheat: a review. Aust J Agric Res 52: 1043-1077

Levy AA, Feldman M (2002) The impact of Polyploidy on Grass Genome Evolution. Plant Physiol 130: 1587-1593

Li H-J, Guo B-H, Li Y-W, Du L-Q, Jia X, Chu C-C (2000) Molecular cytogenetic analysis of intergeneric chromosomal translocations between wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Dasyphyrum villosum* arising from tissue culture. Genome 43: 756-762

Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11: 2453-2465

Mace ES, Xia L, Jordan DR, Halloran K, Parth DK, Huttner E, Wenzl P, Kilian A (2008) DArT markers: diversity analyses and mapping in *Sorghum bicolor*. *BMC Genomics* 9:26

Marais GF, Pretorius ZA, Marais AS, Wellings CR (2003) Transfer of rust resistance genes from *Triticum* species to common wheat. *S Afr J Plant Soil* 20: 193-198

Marais GF, McCallum B, Snyman JE, Pretorius ZA, Marais AS (2005) Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi*. *Plant Breeding* 124: 538-541

Marais GF, McCallum B, Marais AS (2006) Leaf rust and stripe rust resistance genes derived from *Aegilops sharonensis*. *Euphytica* 149: 373-380

Marais GF (2008) Persoonlike mededeling. Laboratorium 239, Departement van Genetika, Universiteit van Stellenbosch, RSA

Marshall DR, Langridge P, Appels R (2001) Wheat breeding in the new century – Preface. *Aust J Agr Res* 52 (11 & 12): i-iv

Martinez-Pérez E, Shaw P, Reader S, Aragón-Alcaide L, Miller TE, Moore G (1999) Homologous chromosome pairing in wheat. *J Cell Sci* 112: 1761-1769

Merdinoglu D, Butterlin G, Baur C, Balthazard J (2000) Comparison of RAPD, AFLP and SSR (Microsatellite) markers for genetic diversity analysis in *Vitis vinifera* L. *Acta Hort* 528

Meselson M, Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217: 1110-1114

Metha YR, Angra DC (2000) Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genet Mol Biol* 23(3): 617-622

Millet E (2006) Rescue collections of *Aegilops sharonensis* in Israel. Report submitted to IPGRI. Institute for Cereal Crops Improvement, Tel-Aviv University ([http://www.ecpgr.cgiar.org/Networks/Cereals/Aegilops\\_collectmission\\_report.pdf](http://www.ecpgr.cgiar.org/Networks/Cereals/Aegilops_collectmission_report.pdf)) 14 Julie 2008

Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30: 294-200

Mueller UG, Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol and Evol* 14: 389-394

Mujeeb-Kazi A, Rajaram S (2002) Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement. FAO Corporate Document Repository (<http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e0e.htm>) 15 September 2007

Mullis K, Faloona S, Schrf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain eaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51: 263-273

Murray TD, Parry DW, Cattlin ND (1998) A Colour Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops. Manson Publishing Ltd.

Montarroyos AVV, de Lima MAG, dos Santos EO, de Franca JGE (2003) Isozyme analysis of an active cassava germplasm bank collection. Euphytica 130: 101-106

Myburg AA, Botha AM, Wingfield BD, Wilding WJM (1997) Identification and Genetic Distance Analysis of Wheat Cultivars Using RAPD Fingerprinting. Cereal Research Communications, Cereal Research Institute.

Nilan RA (1981) Induced gene and chromosome mutants. Phil Trans R Soc Lond B 292: 457-466

Okamoto M (1957) Asynaptic effect of chromosome V. Wheat Inf Serv 5-6

Phillips RL, Vasil IK (1994) DNA-Based Markers in Plants. Kluwer Academic Publisher, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, the Netherlands

Plaschke J, Börner A, Wendehake K, Ganai MW, Röder MS (1996) The use of wheat aneuploids for the chromosomal assignment of microsatellite loci. *Euphytica* 89: 33-40

Powell W, Thomas WTB, Baird E, Lawrence P, Booth A, Harrower B, McNicol JW, Waugh R (1997) Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Heredity* 79: 48-59

Prescott JM, Burnett PA, Saari EE, Ranson J, Bowman J, de Milliano W, Singh RP, Bekele G (1986) *Wheat Disease and Pests: a guide for field identifications*. International Maize and Wheat Improvement Center. (<http://greengenes.cit.cornell.edu/wpest.html>) 29 Augustus 2007

Quisenberry KS, Reitz LP (1967) *Wheat and wheat improvement*. American Society of Agronomy

Rajaram S, van Ginkel M, Fischer RA (1993) CIMMYT's wheat breeding mega-environments (ME) In *Proceedings of the 8th International Wheat Genetics Symposium, 19-24 Jul 1993*. Beijing, China

Riley R, Champan V (1958) Genetic control of the cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. *Nature* 182: 713 - 715

Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246: 327–333

Röder MS, Korzan V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M, Leroy P, Ganal MW (1998a) A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149: 2007-2023

Röder MS, Korzun V, Gill BS, Ganal MW (1998b) The physical mapping of microsatellite markers in wheat. *Genome* 41: 278-283

Ruden B, McMullen M, Jin Y, Watkins J & Hein G (2003) Pest Management Strategic Plan For Northern Wheat (<http://www.ipmcenters.org/pmsp/pdf/NorthernWheatPMSP.pdf>) 21 Augustus 2007

Salem KK, Ali BA, Huang T, Qin D, Wang X, Xie Q (2007) Use of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis for Economically Important Food Crops. *J Integr Plant Biol* 49(12):1670-1680

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>o</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L, Lenstra JA (1999) Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *J Clin Microbiol* 10: 3083-3091

Schmidt R (2002) Plant genome evolution: lessons from comparative genomics at the DNA level. *Plant Mol Biol* 48: 21-37

Schubert I, Rieger R, Fuchs J (1995) Alteration of basic chromosome number by fusion-fission cycles. *Genome* 38: 1289-1292

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*. Vol 100 (3-4): 545-551

Scott DB (1990) Wheat diseases in South Africa. In: Technical Communications no. 220, Department of Agriculture, Pretoria, South Africa

Sears ER (1954) The aneuploids of common wheat. Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin 572: 1-59

Sears ER (1966) Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. *Chromosome Manipulation and Plant Genetics*. R Riley and KR Lewis. Edinburgh, Oliver & Boyd: 29-45

Sears ER (1972) Chromosome engineering in wheat. *Stadler Symp* 4: 23 – 38

Sears ER (1976) Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annu Rev Genet* 10: 31-51

Sears ER (1977) An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can J Genet Cytol* 19: 585-593



Sears ER (1981) A wheat mutation conditioning an intermediate level of homoeologous chromosome pairing. *Can J Genet Cytol* 24: 715-719

Sears ER (1983) The transfer to wheat of interstitial segments of alien chromosomes. *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp.*, Kyoto, 1983. pp. 5-12

Semagn K, Bjørnstad Å, Skinnes H, Marøy AG, Tarkegne Y, William M (2006) Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545-555

Sharma RK, Miska BK (2005) Gene pyramiding for disease resistance: A solution or illusion. *Curr Sci India* 88(5): 677-678

Singh RP, Rajaram S (2006) Breeding for disease resistance in wheat, FAO Corporate Document Repository ([www.fao.org/docrep/006/Y4011e/Y4011e0b.htm](http://www.fao.org/docrep/006/Y4011e/Y4011e0b.htm)) 21 Augustus 2007

Sourdille P, Singh S, Cadalen T, Brown-Guedira S, Gay G, Qi L, Gill BS, Dufour P, Murigneux A, Bernard M (2004) Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Functional Integr Genomics* 4: 12-25

Staples RC (2000) Research on the Rust Fungi During the Twentieth Century. *Annu Rev Phytopathol* 38: 49-69

Taketa S, Awayama T, Ichii M, Sunakawa M, Kawahara T, Murai K (2005) Molecular cytogenetic identification of nullisomy 5B induced homoeologous recombination between wheat chromosome 5D and barley chromosome 5H, Published on the NRC Research Press Web site (<http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/rp/rppdf/g04-096.pdf>) 22 Mei 2007

Tanksley SD (1983) Molecular markers in Plant Breeding. *Plant Mol Biol Rep* 1(1): 3 – 8

The International SNP Map Working Group (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933

Tsunewaki K (1991) A historical review of cytoplasmic studies in wheat. Nuclear and organellar genomes of wheat species pp. 16-30

Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34: 275-305

Visser HJ (2008) Molekulêre merking van *Thinopyrum distichum* chromosome betrokke by soutverdraagsaamheid, en karakterisering van trigeneriese (*Triticum/Secale/Thinopyrum*) sekondêre hibriede. Ongepubliseerde tesis, Universiteit van Stellenbosch, RSA

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414

Weber J, May P (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-396

Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* Vol. 18(24):7213-7218

Wenzl P, Huttner E, Caig V, Heller-Uszynska K, Carling J, Jaccoud D, Evers M, Xia L, Hok P, Risterucci AM, Uszynski G, Kilian A (2007) Diversity Arrays Technology (DArT): a rapid and cost-effective method for generating high-density genome fingerprints. Poster presented at the REDBIO 2007 meeting, Vina del Mar, Chile, 22-26 Oct. ([http://www.diversityarrays.com/pub/PAG\\_2007.pdf](http://www.diversityarrays.com/pub/PAG_2007.pdf)) 15 Julie 2008

Wiese MV (1987) *Compendium of Wheat Diseases*. Second Edition. The American Phytopathological Society Press

Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535

Worland AJ (1999) The importance of Italian wheats to worldwide varietal improvement. *J Genet Breed* 53: 165-173

Zang P, Friebe B, Lukaszewski, Gill BS (2001) The centromere structure in Robertsonian wheat-rye translocation chromosomes indicates that centric breakage-fusion can occur at different positions within the primary constriction. *Chromosoma* 110: 335-344

Zeidler M (2000) Electrophoretic analysis of Plant Isozymes. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium Biologica 38 ([http://publib.upol.cz/~obd/fulltext/Biologica38/Biologica38\\_1.pdf](http://publib.upol.cz/~obd/fulltext/Biologica38/Biologica38_1.pdf)) 14 Julie 2008

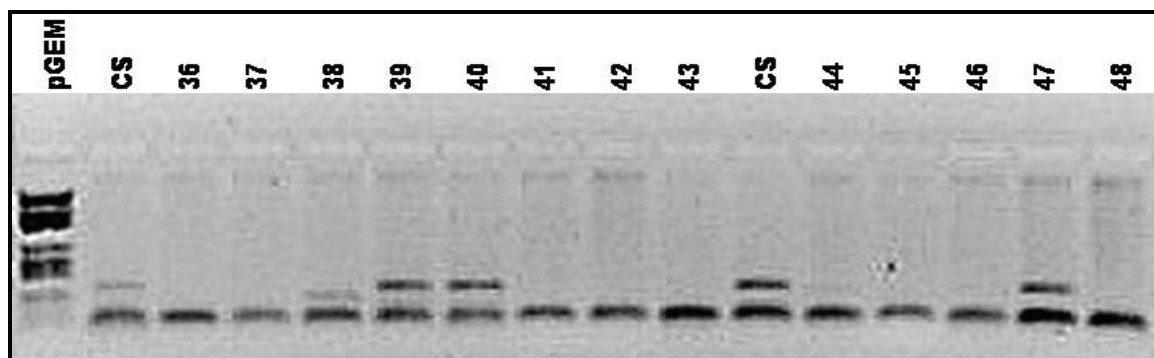
---

## 6. ADDENDUM

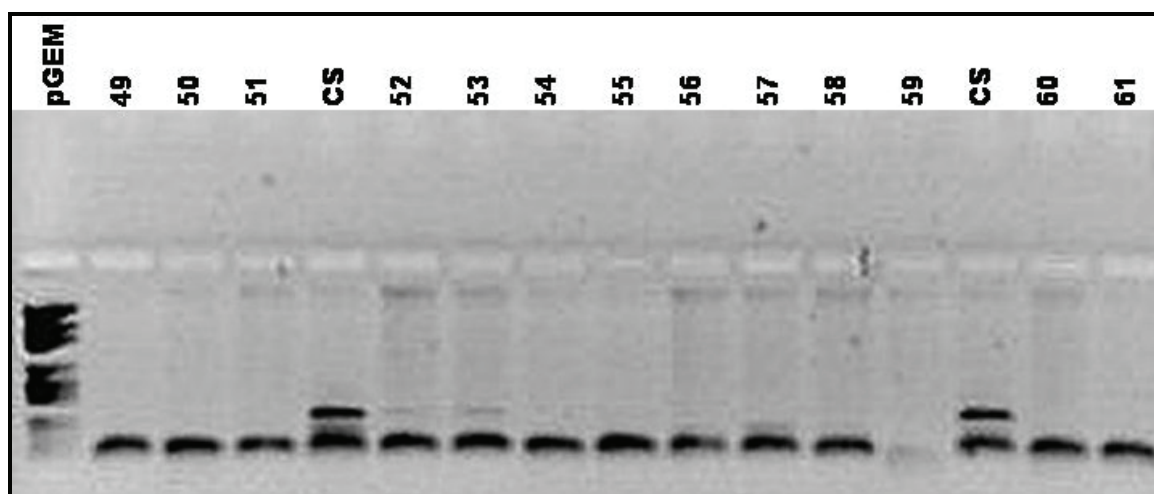
---

### 6.1 MIKROSATELLIET RESULTATE

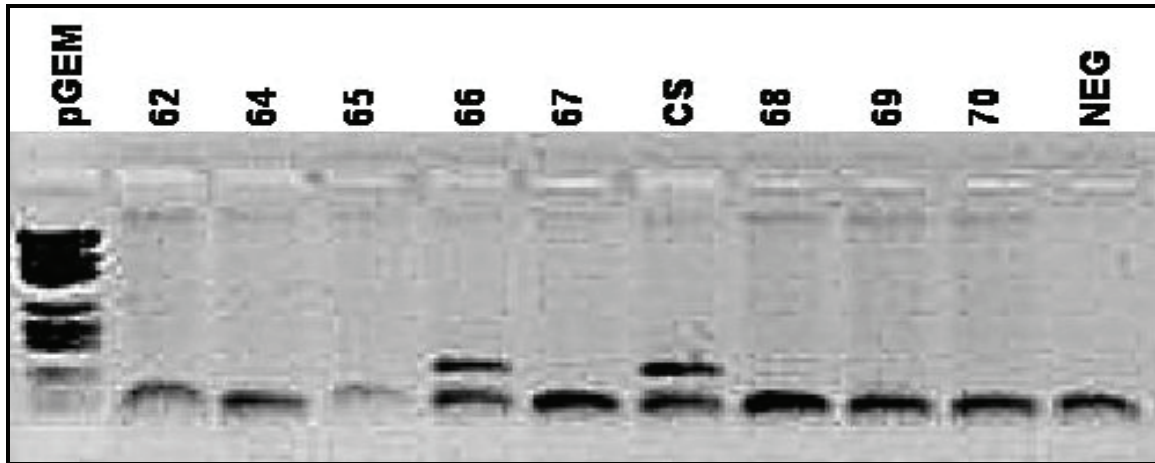
#### 6.1.1 *Xgwm427*



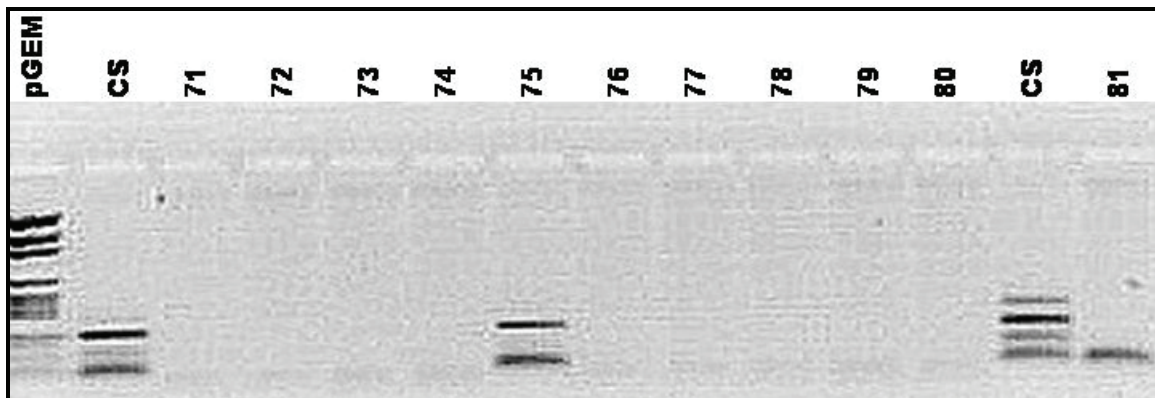
**Figuur 6.1.1 - 1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 36 - 48. Monsters 39, 40 en 47 toon rekombinasie by die lokus. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.



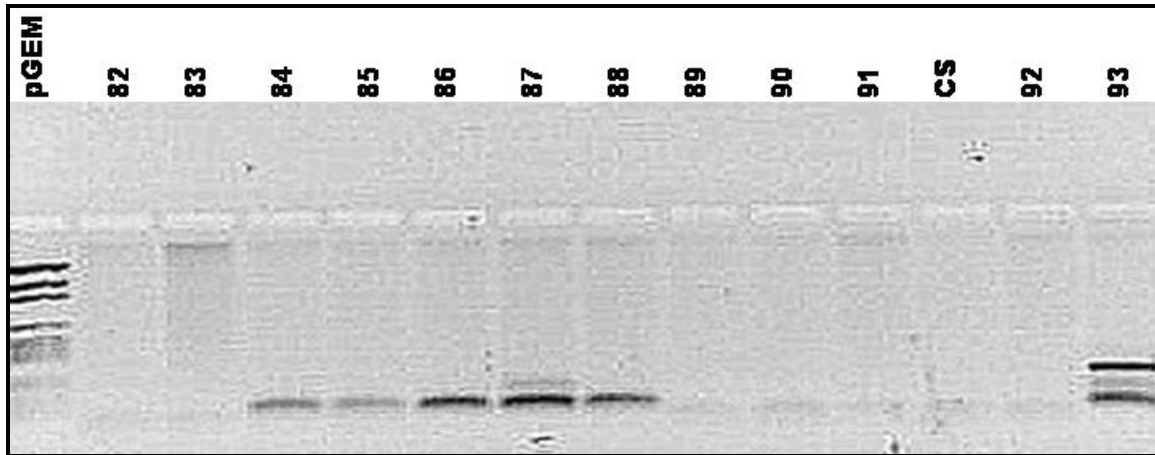
**Figuur 6.1.1 - 2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 49 - 61. Geen monsters toon rekombinasie by die lokus nie. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.



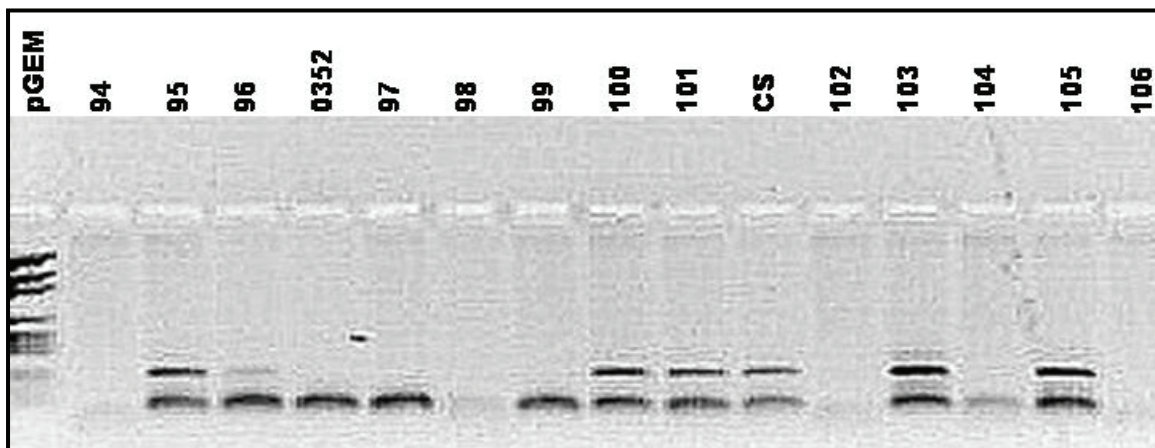
**Figuur 6.1.1 - 3:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 62 - 70. Monster 66 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.



**Figuur 6.1.1 - 4:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 71 - 81. Monster 75 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.

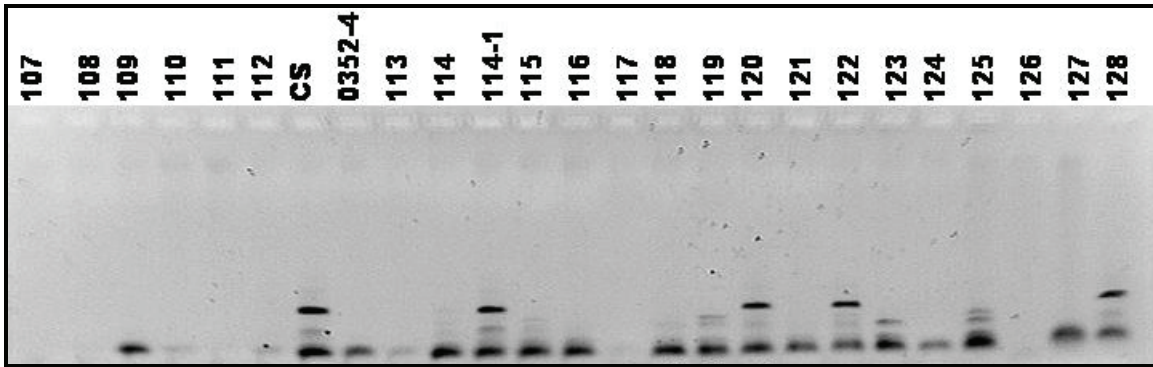


**Figuur 6.1.1 - 5:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte van lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 82 - 93. Monster 93 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.

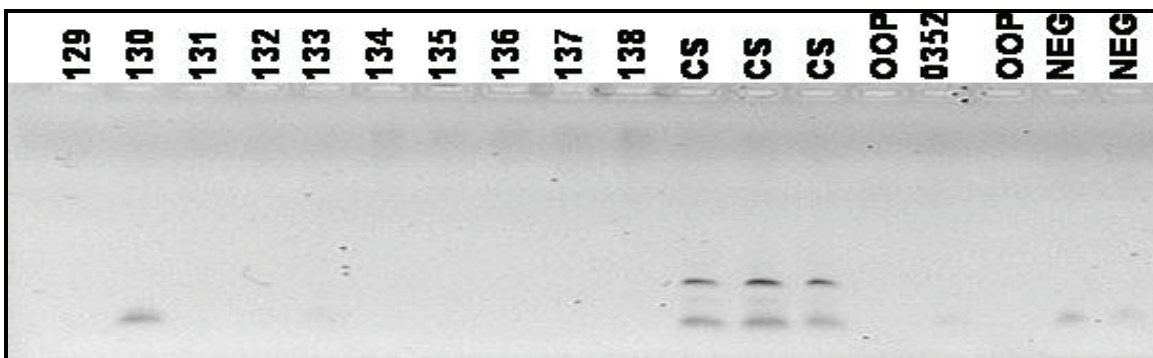


**Figuur 6.1.1 - 6:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 94 - 106. Monsters 95, 100, 101, 103 en 105 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.

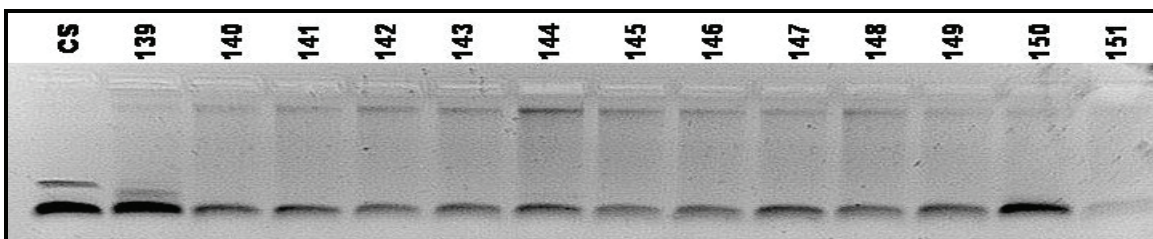




**Figuur 6.1.1 - 7:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 107 – 128. Monsters 114-1, 120, 122 en 128 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik.

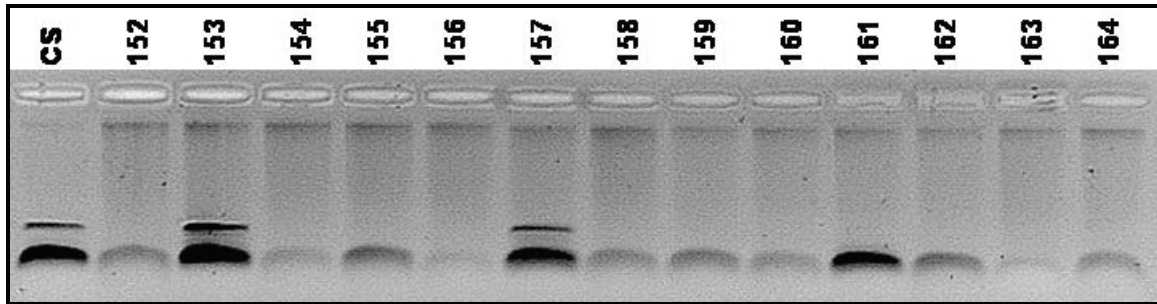


**Figuur 6.1.1 - 8:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 129 - 138. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik.

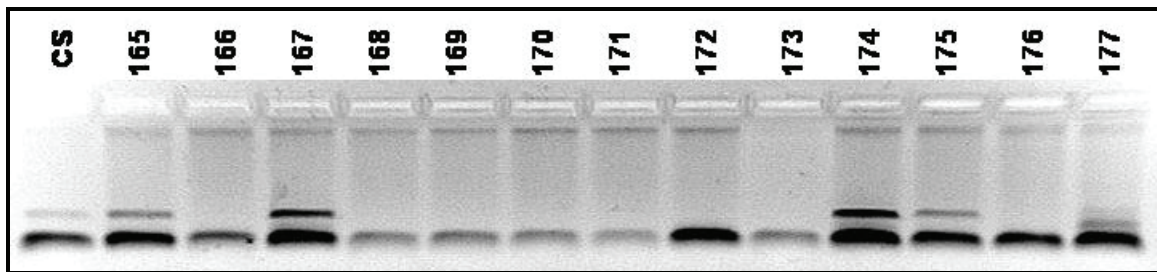


**Figuur 6.1.1 - 9:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 139 - 151. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik.

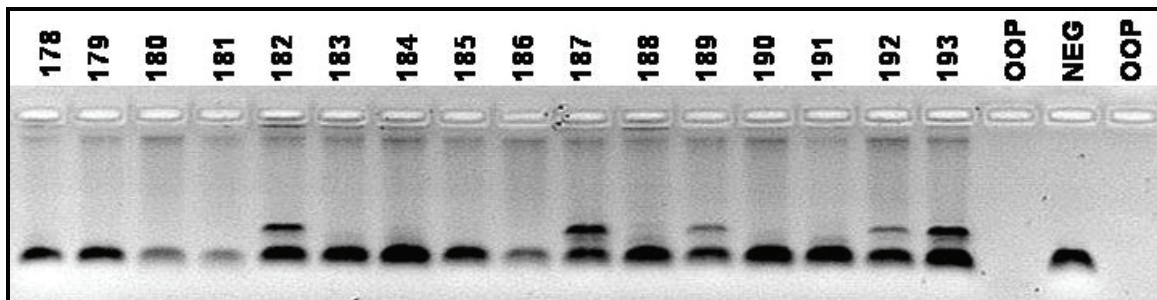




**Figuur 6.1.1 - 10:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 152 - 164. Monsters 153 en 157 toon rekombinasie by die lokus. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik.

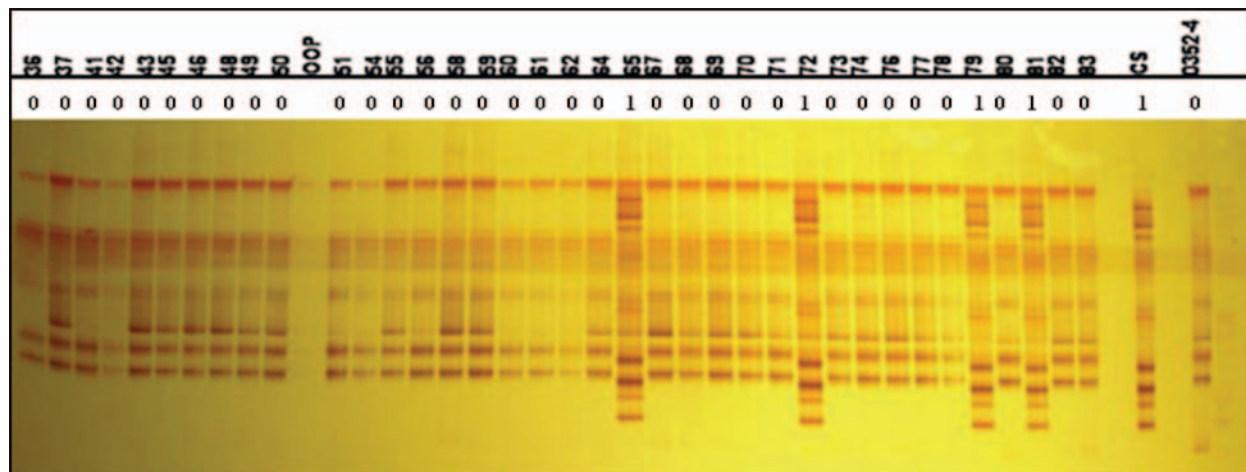


**Figuur 6.1.1 - 11:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 165 - 177. Monsters 165, 167, 174 en 175 toon rekombinasie by die lokus. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik.

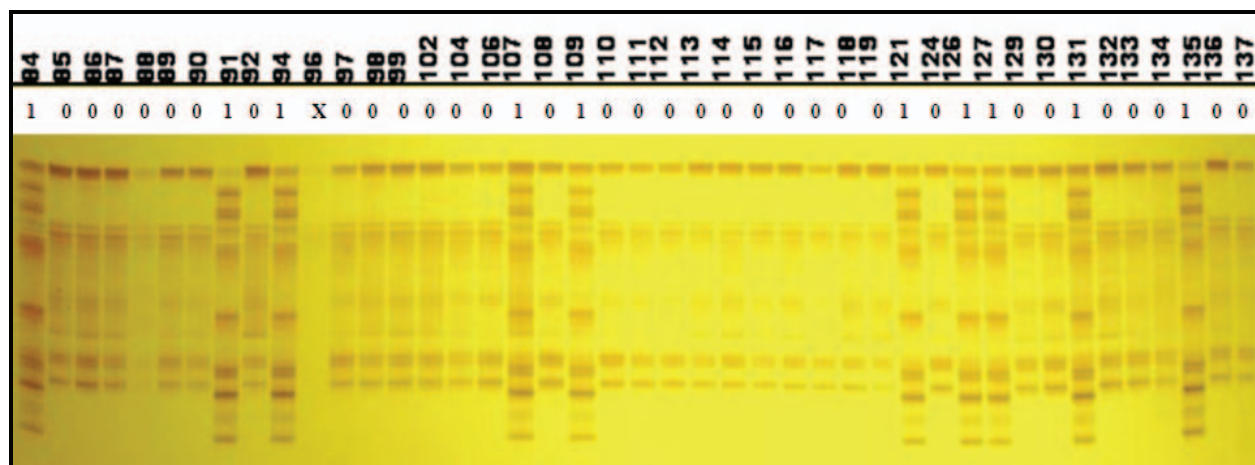


**Figuur 6.1.1 - 12:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm427* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) op monsters 178 – 193. Monsters 182, 187, 189, 192 en 193 toon rekombinasie by die lokus. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik.

### 6.1.2 *Xgwm334*



**Figuur 6.1.2 - 1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm334* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) op monsters 36 – 83. Monsters 65, 72, 79 en 81 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole.



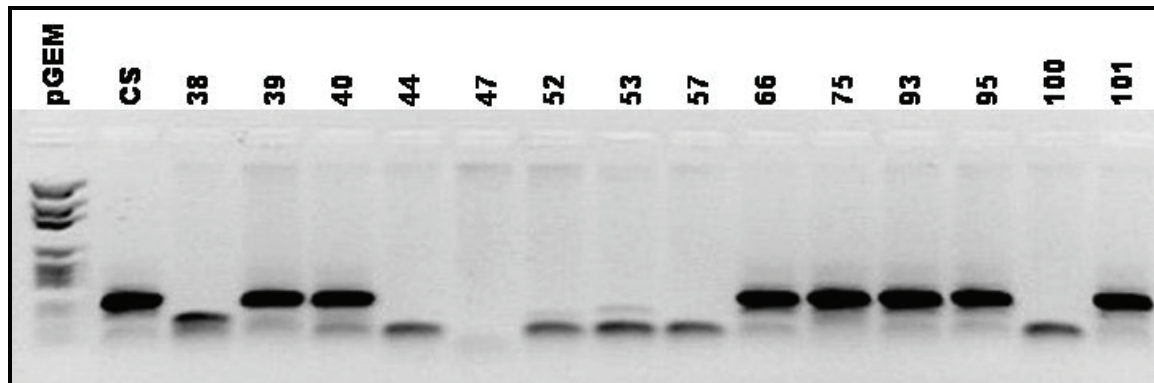
**Figuur 6.1.2 - 2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm334* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) op monsters 84 – 137. Monsters 84, 91, 94, 107, 109, 121, 126, 127, 131 en 135 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik.



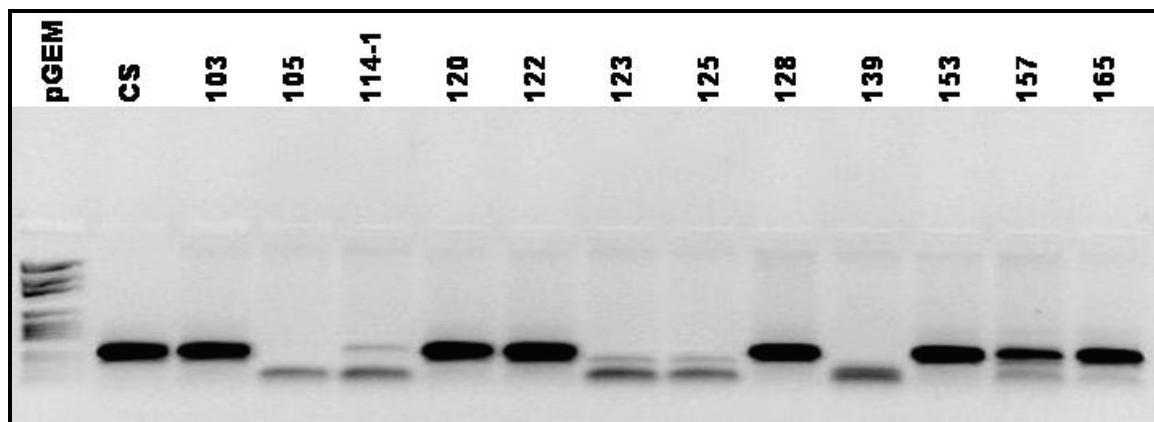




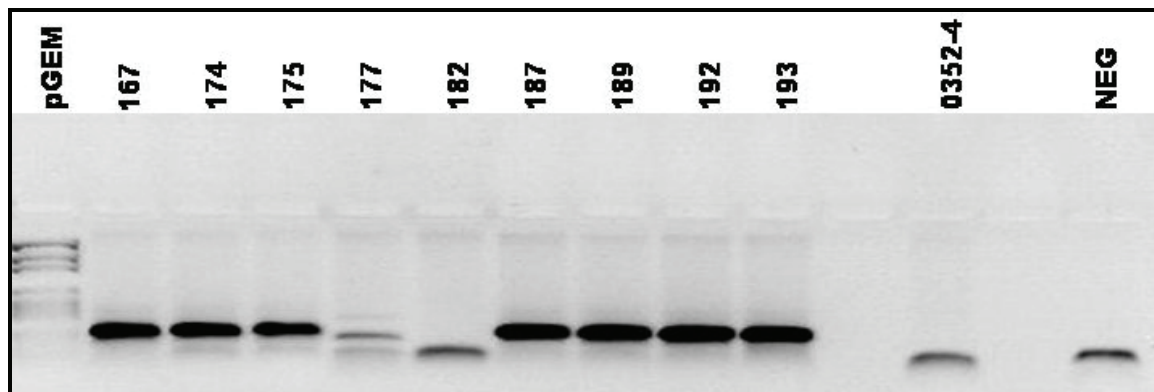
### 6.1.4 *Xbarc171*



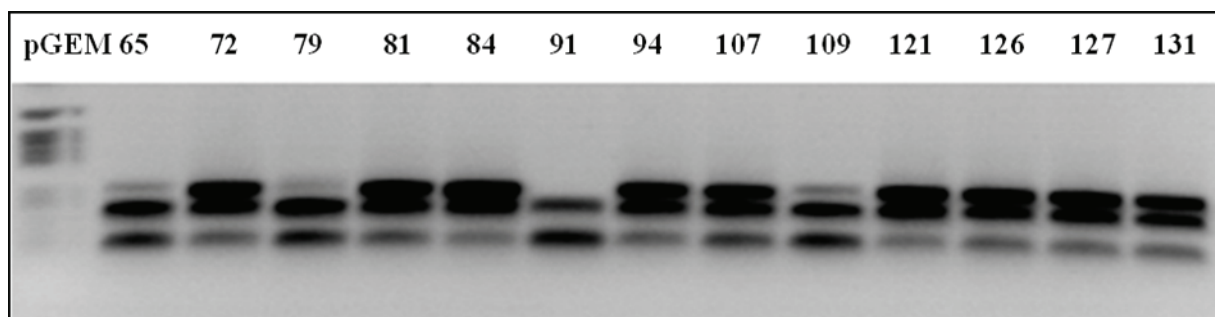
**Figuur 6.1.4 - 1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xbarc171* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 39, 40, 66, 75, 93, 95 en 101 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.



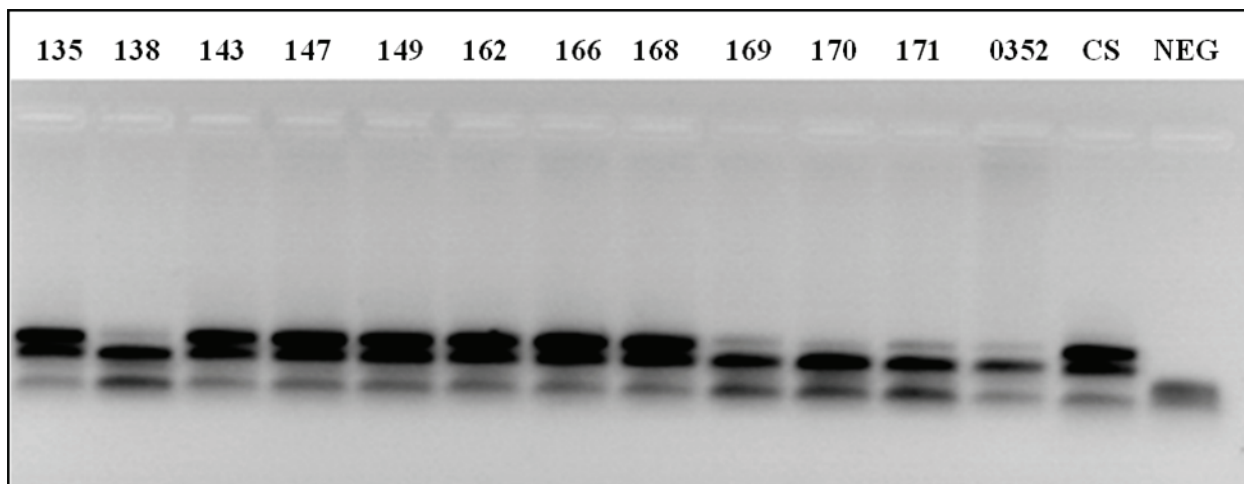
**Figuur 6.1.4 - 2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xbarc171* mikrosatelliet (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 103, 120, 122, 128, 153, 157 en 165 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.



**Figuur 6.1.4 - 3:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xbarc171* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 167, 174, 175, 187, 189, 192 en 193 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.

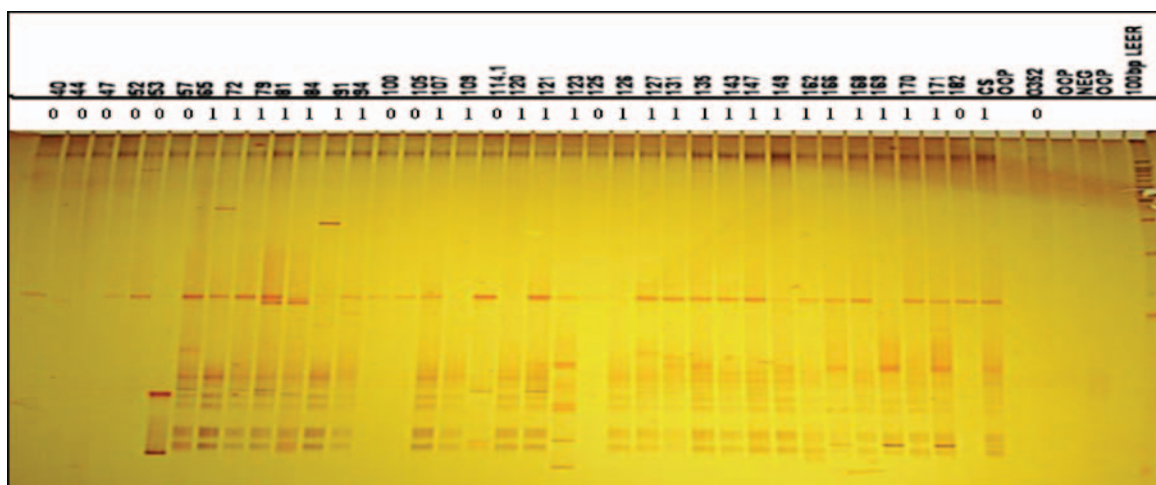


**Figuur 6.1.4 - 4:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xbarc171* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 72, 81, 84, 94, 107, 121, 126, 127 en 131 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.



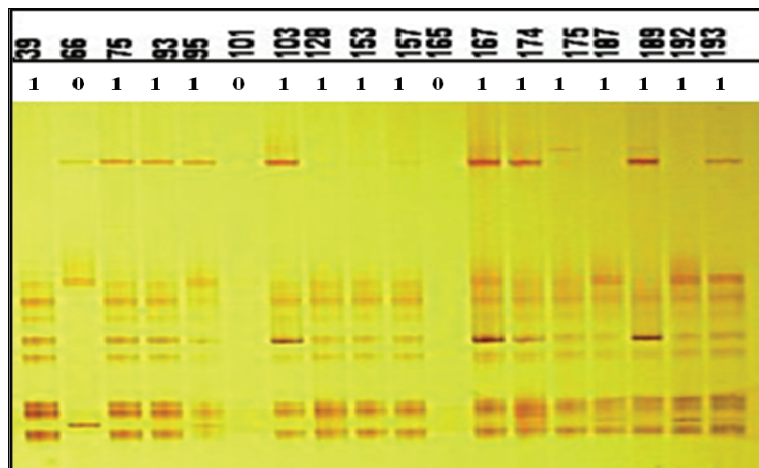
**Figuur 6.1.4 - 5:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xbarc171* (1.5 % agarose jel geëlektroforeer teen 100 V vir 45 min) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 135, 143, 147, 149, 162, 168 en 169 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole. pGEM is die molekulêre leer wat gebruik is.

### 6.1.5 *Xgwm459*



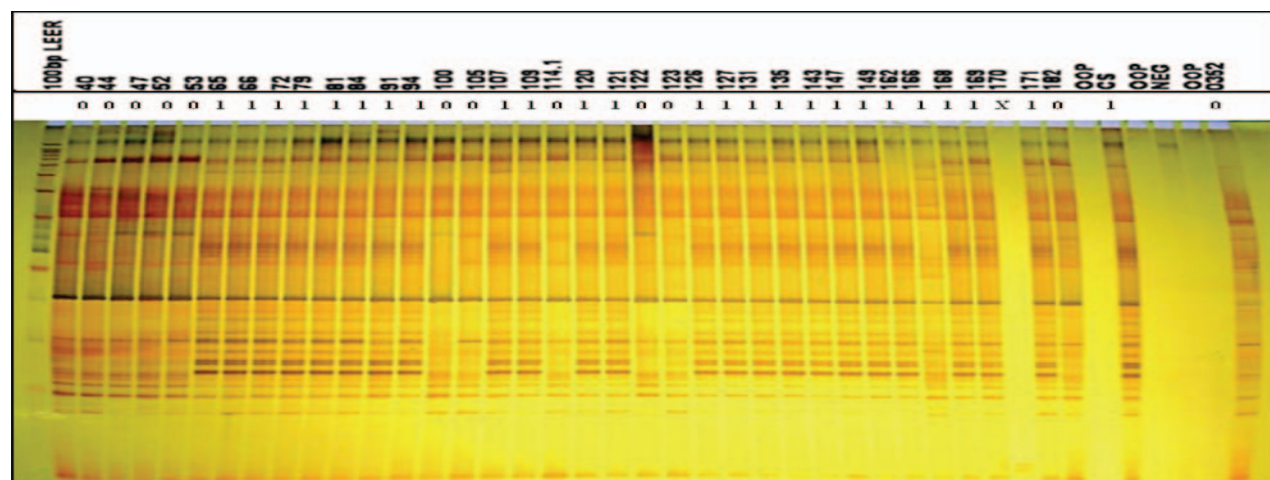
**Figuur 6.1.5 - 1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm459* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 66, 72, 79, 81, 84, 91, 94, 107, 109, 120, 121, 126, 127, 131, 135, 143, 147, 149, 162, 166, 168, 169, 170 en 171 toon rekombinasie by die lokus aan. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole. ’n 100 bp leer is gebruik.





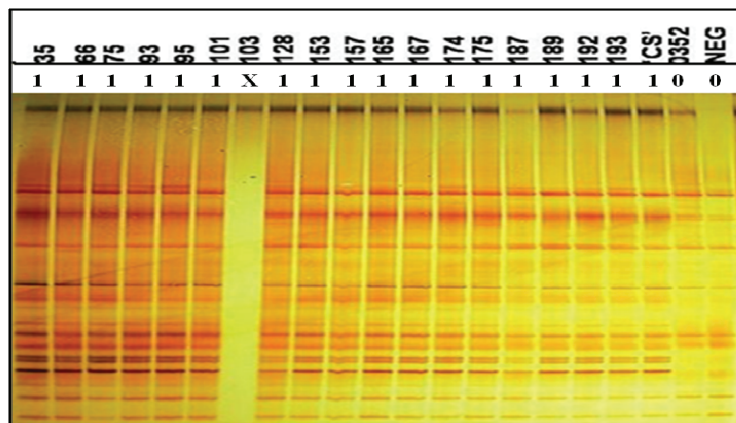
**Figuur 6.1.5 - 2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm459* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 39, 75, 93, 95, 103, 128, 157, 167, 174, 175, 187, 189, 192 en 193 toon rekombinasie by die lokus.

### 6.1.6 *Xgpw2295*



**Figuur 6.1.6 - 1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgpw2295* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 65, 66, 72, 79, 81, 84, 91, 94, 107, 109, 120, 121, 126, 127, 131, 135, 143, 147, 149, 162, 168, 169, en 171 toon rekombinasie by die lokus. ‘CS’ is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole. ’n 100 bp leer is gebruik.

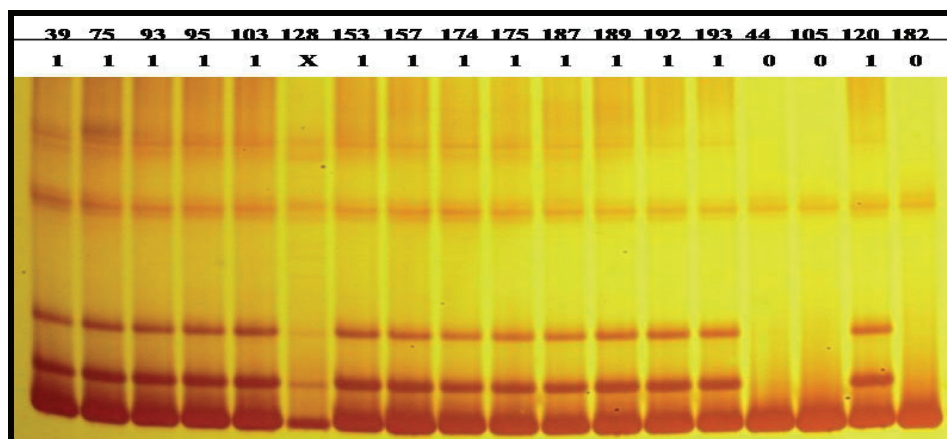




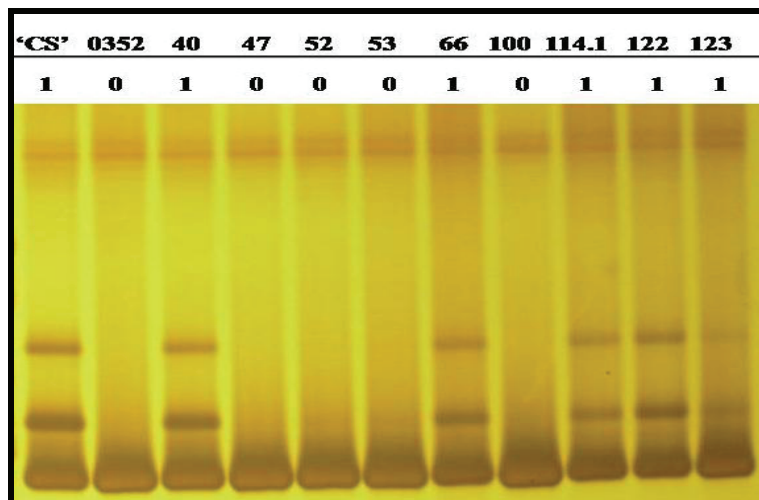
**Figuur 6.1.6 - 2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgpw2295* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Al die monsters toon rekombinasie by die lokus, behalwe vir monster 103 wat nie geamplifiseer het nie. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole. 'n 100 bp leer is gebruik.

### 6.1.7 *Xwmc256*

As gevolg van 'n tekort aan DNS van sekere monsters is die merker nie teen al 52 plante geskandeer nie.

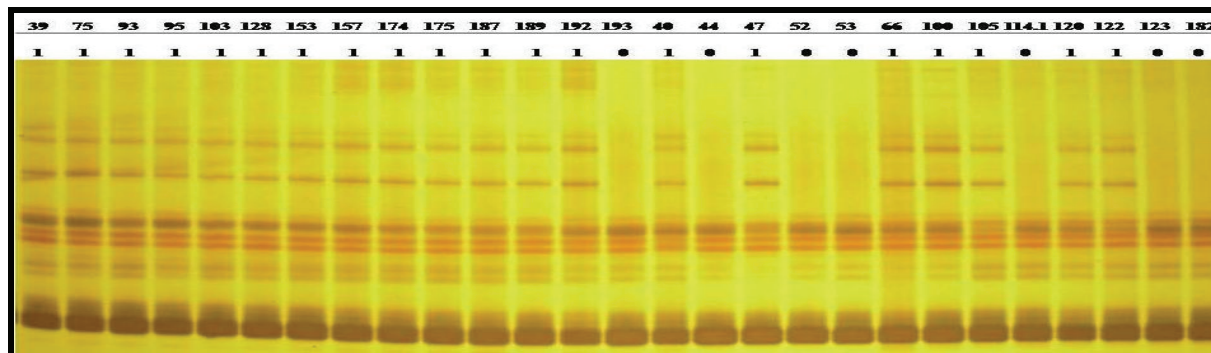


**Figuur 6.1.7-1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xwmc256* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van sekere van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Al die monsters toon rekombinasie by die lokus, behalwe vir monsters 44, 105 en 182.

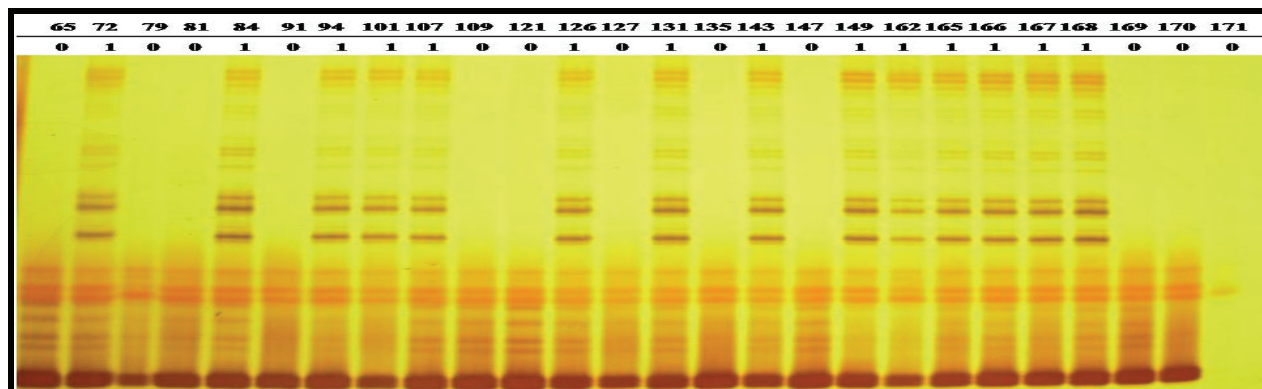


**Figuur 6.1.7-2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xwmc256* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van sekere van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 40, 66, 114.1, 122 asook 123 toon rekombinasie by die lokus. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole.

### 6.1.8 *Xgwm570*

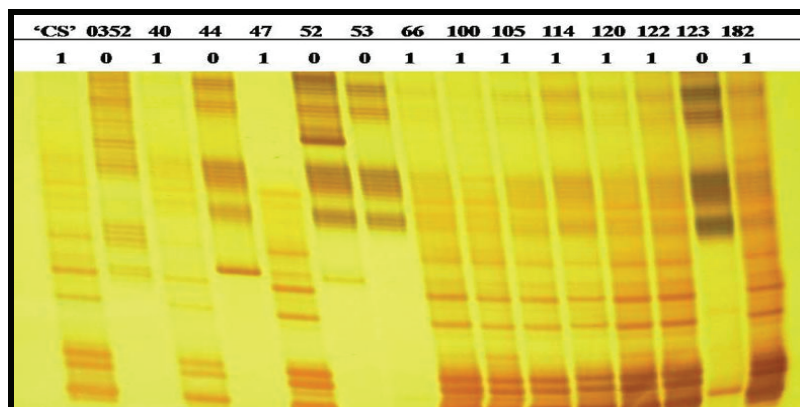


**Figuur 6.1.8-1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm570* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Al die monsters toon rekombinasie by die lokus, behalwe vir monsters 193, 44, 52, 53, 114.1, 123 asook 182.

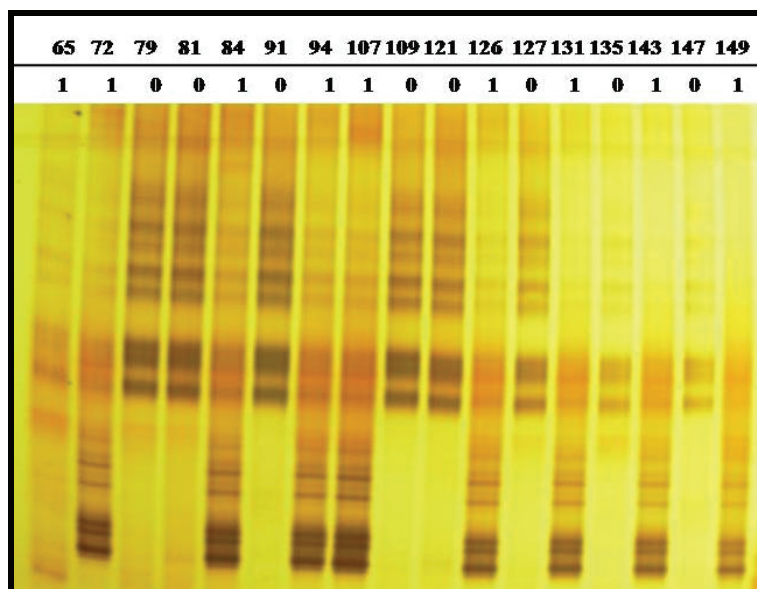


**Figuur 6.1.8-2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm570* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 72, 84, 94, 101, 107, 126, 131, 143, 149, 162, 165, 166, 167 asook 168 toon rekombinasie by die lokus.

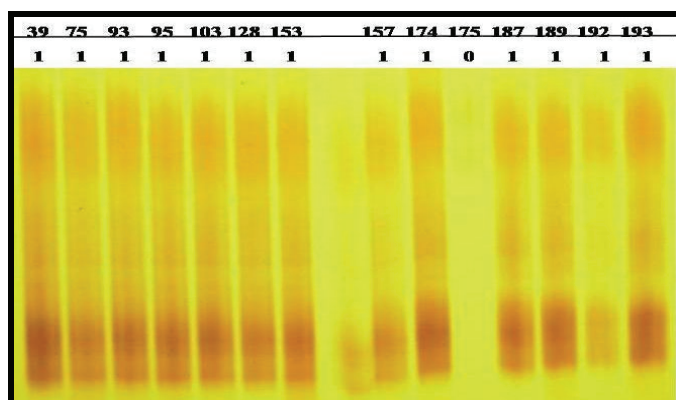
### 6.1.9 *Xgwm617*



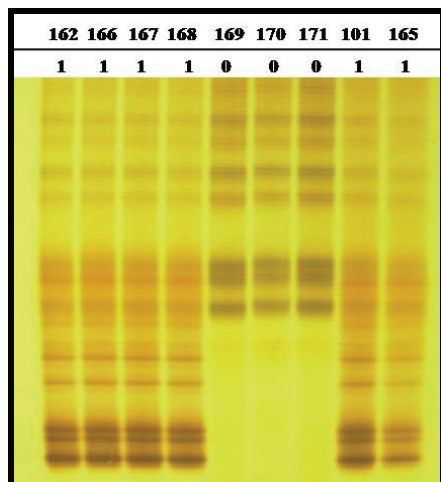
**Figuur 6.1.9-1:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm617* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Al die monsters toon rekombinasie by die lokus, behalwe vir monsters 44, 52, 53 en 123. 'CS' is as positiewe kontrole gebruik en 0352-4 as negatiewe kontrole.



**Figuur 6.1.9-2:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm617* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Monsters 65, 72, 84, 94, 107, 126, 131, 143 en 149 toon rekombinasie by die lokus.



**Figuur 6.1.9-3:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm617* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Al die monsters toon rekombinasie by die lokus, behalwe vir monster 175.



**Figuur 6.1.9-4:** Jel-foto van die amplifikasieprodukte by lokus *Xgwm617* (6 % denaturerende PAA jel geëlektroforeer teen 65 W vir 5 – 6 ure) van die 52 monsters wat rekombinasie getoon het by *Xgwm427* en/of *Xgwm334*. Al die monsters toon rekombinasie by die lokus, behalwe vir monsters 169, 170 en 171.

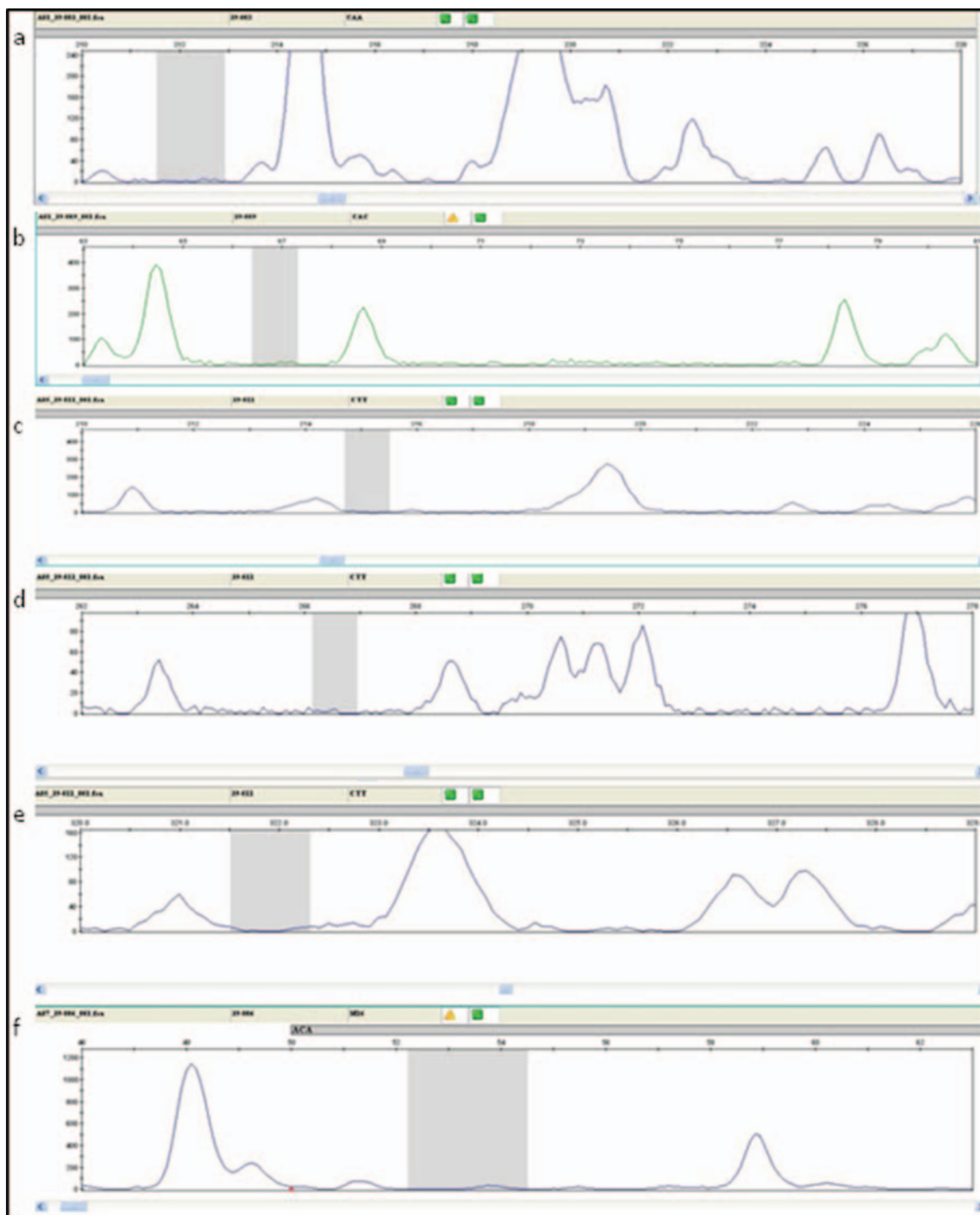
## 6.2 AFLP RESULTATE

Figure 6.2-1 tot 6.2-31 dui die resultate aan wat vir elke afsonderlike plant (die 14 bestande plante met die verkorte translokasies) verkry is. 'n Letter langs elke figuur dui aan watter inleier-kombinasie (Tabel 6.2-1) gebruik is.

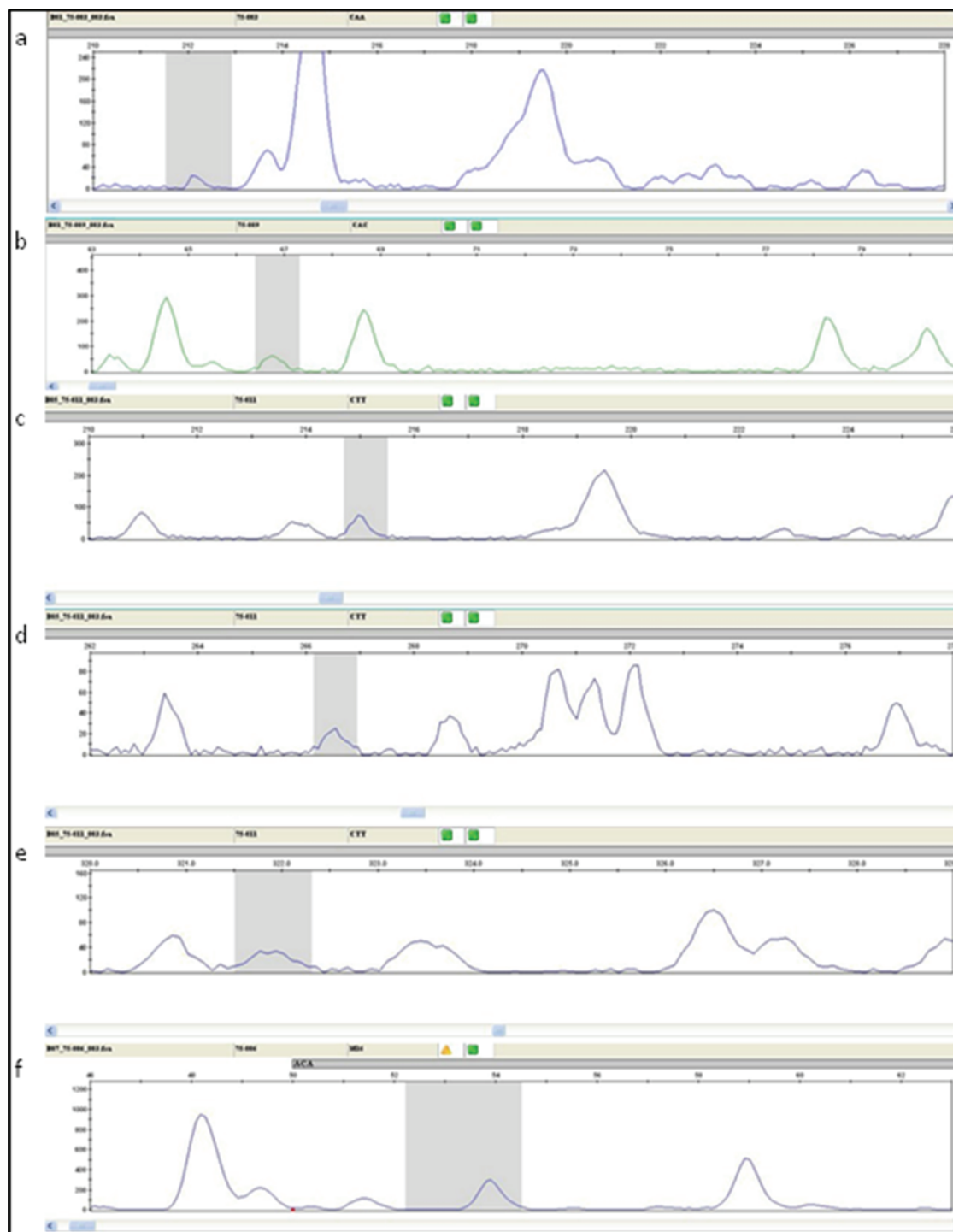
**Tabel 6.2-1:** AFLP inleier-kombinasies wat nuttige polimorfismes tussen 'CS' en 0352-04 gegenereer het.

	<b>Inleier-kombinasie en grootte van polimorfisme</b>
<b>a</b>	<i>MseI</i> -CAA & <i>EcoRI</i> -ACA (212 bp)
<b>b</b>	<i>MseI</i> -CAC & <i>EcoRI</i> -AAC (groen) (67 bp)
<b>c</b>	<i>MseI</i> -CTT & <i>EcoRI</i> -ACA (215 bp)
<b>d</b>	<i>MseI</i> -CTT & <i>EcoRI</i> -ACA (266)
<b>e</b>	<i>MseI</i> -CTT & <i>EcoRI</i> -ACA (322)
<b>f</b>	<i>MseI</i> -CC & <i>EcoRI</i> -ACA (54 bp)

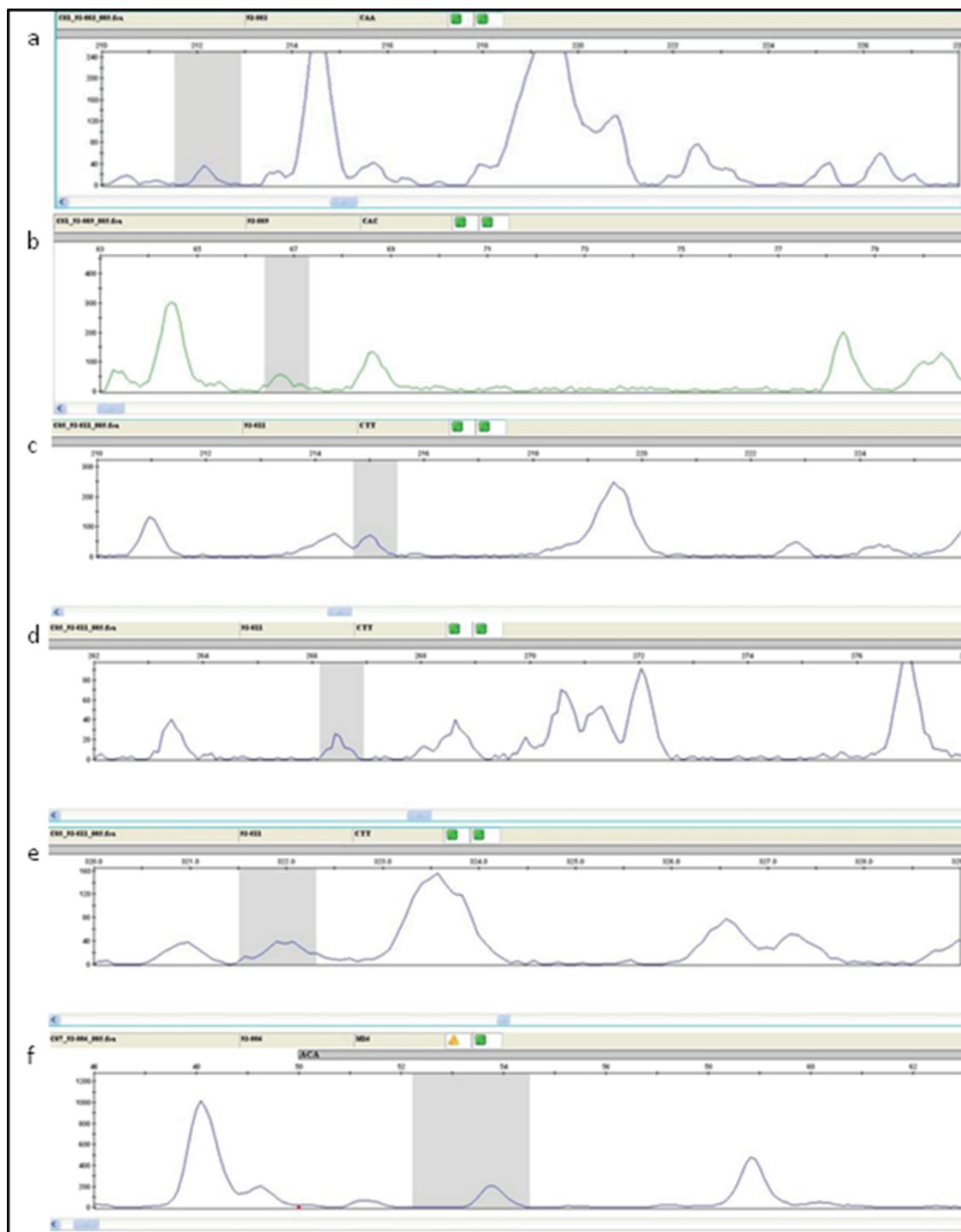




**Figuur 6.2-1:** Monster 39 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

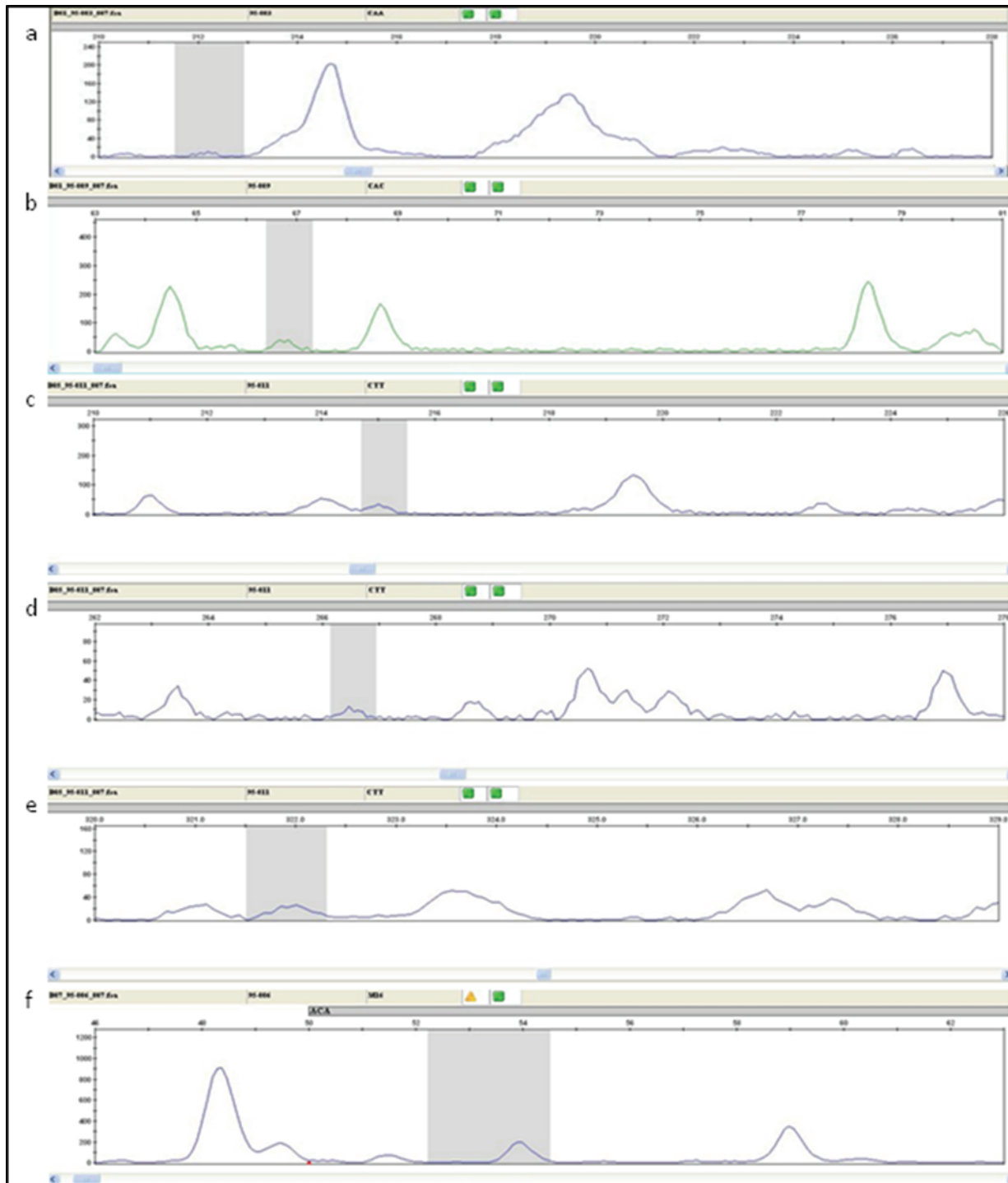


**Figuur 6.2-2:** Monster 75 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

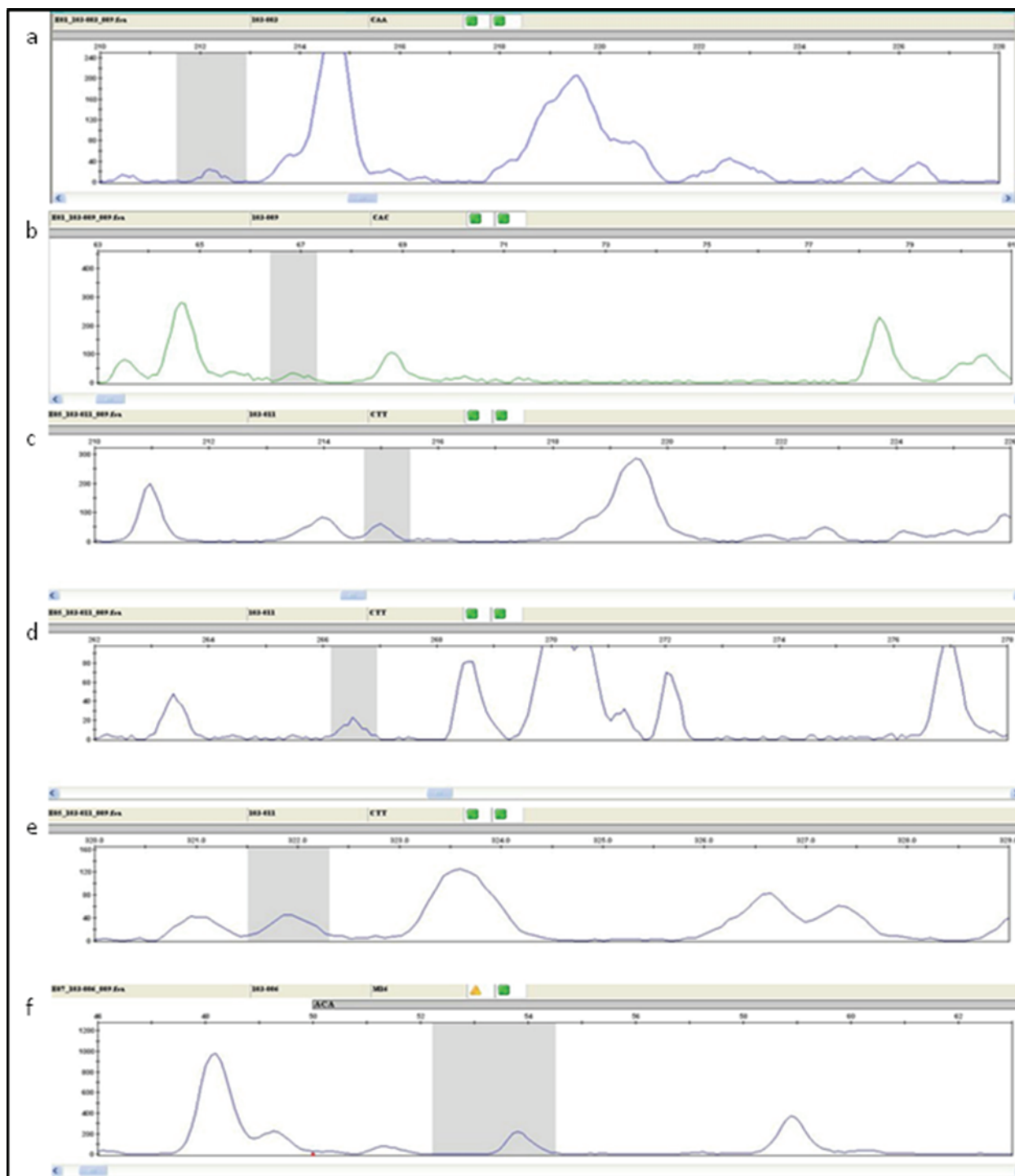


**Figuur 6.2-3:** Monster 93 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

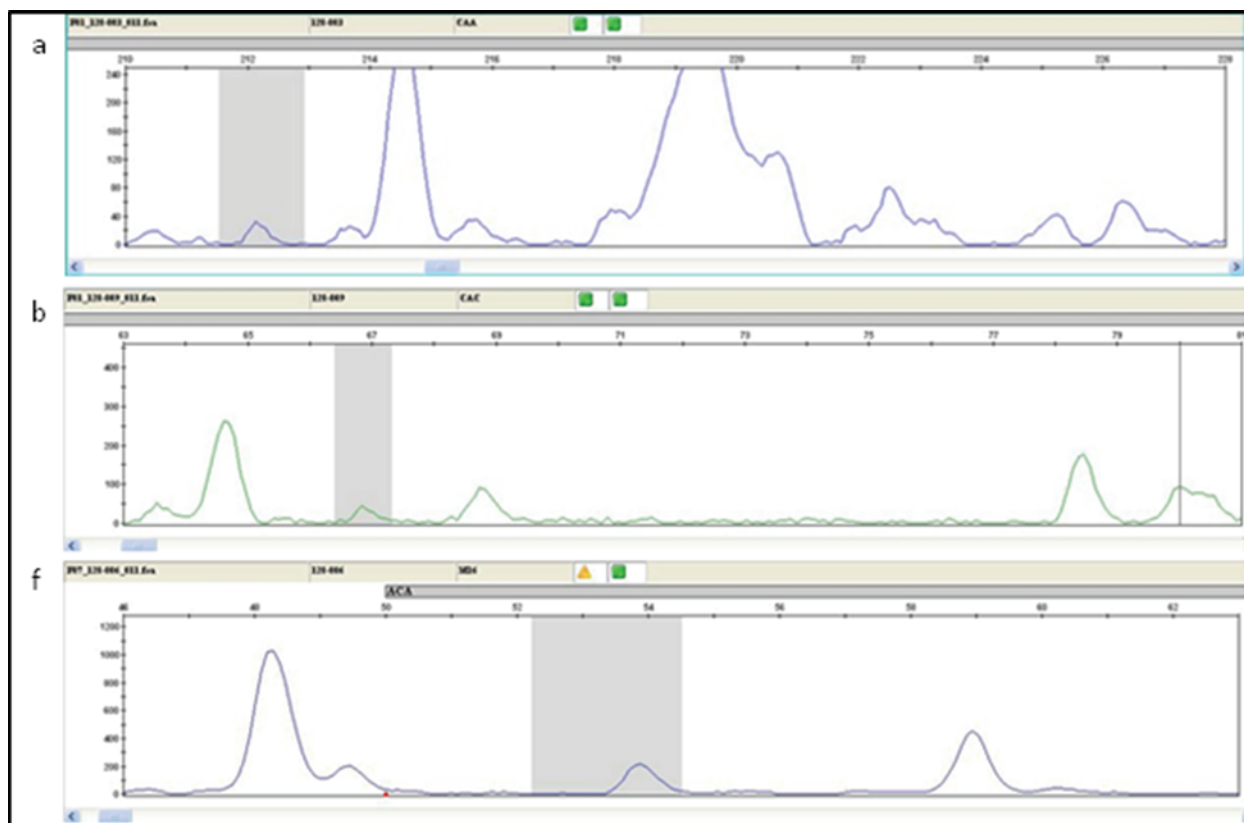




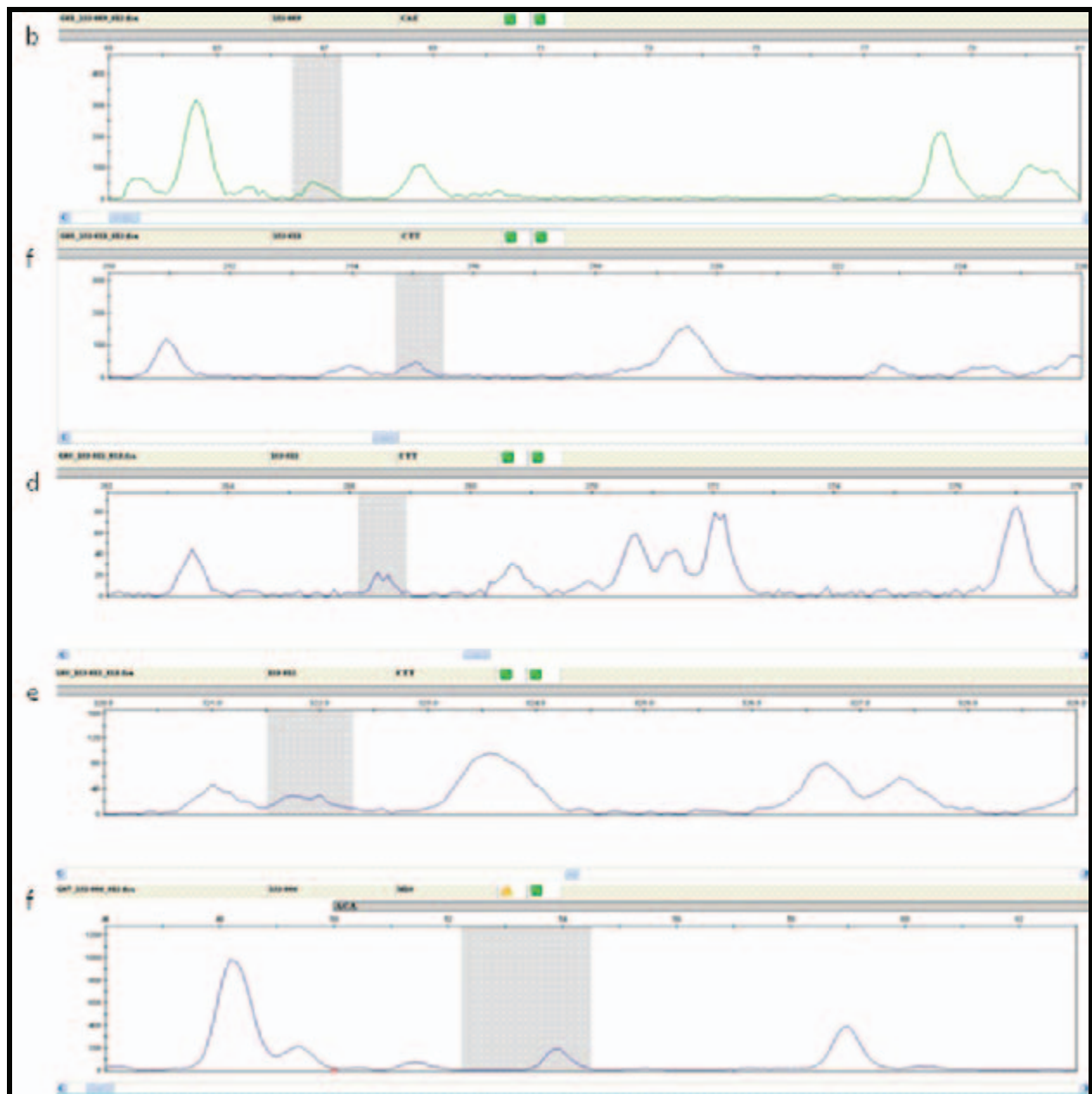
**Figuur 6.2-4:** Monster 95 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



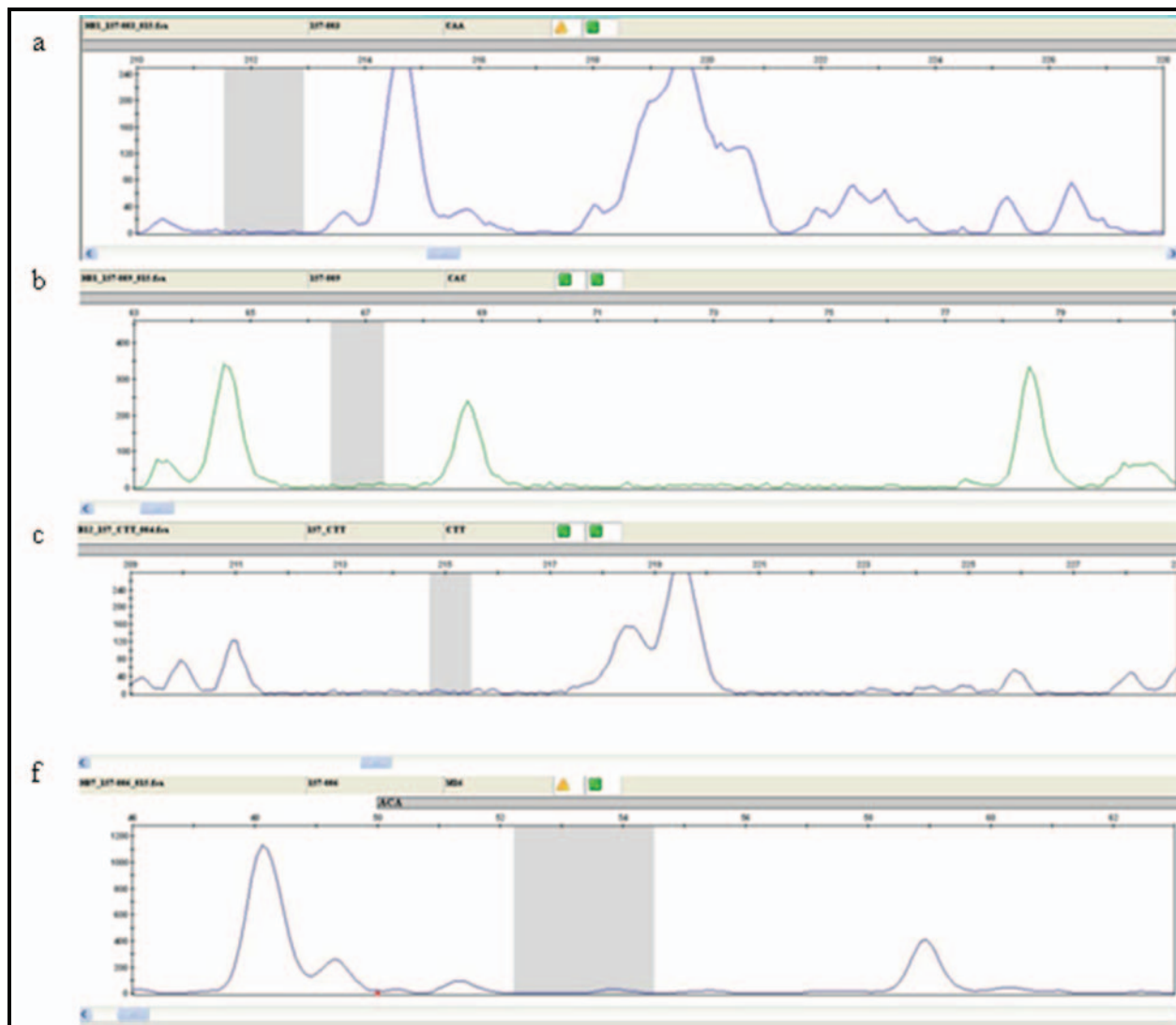
**Figuur 6.2-5:** Monster 103 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



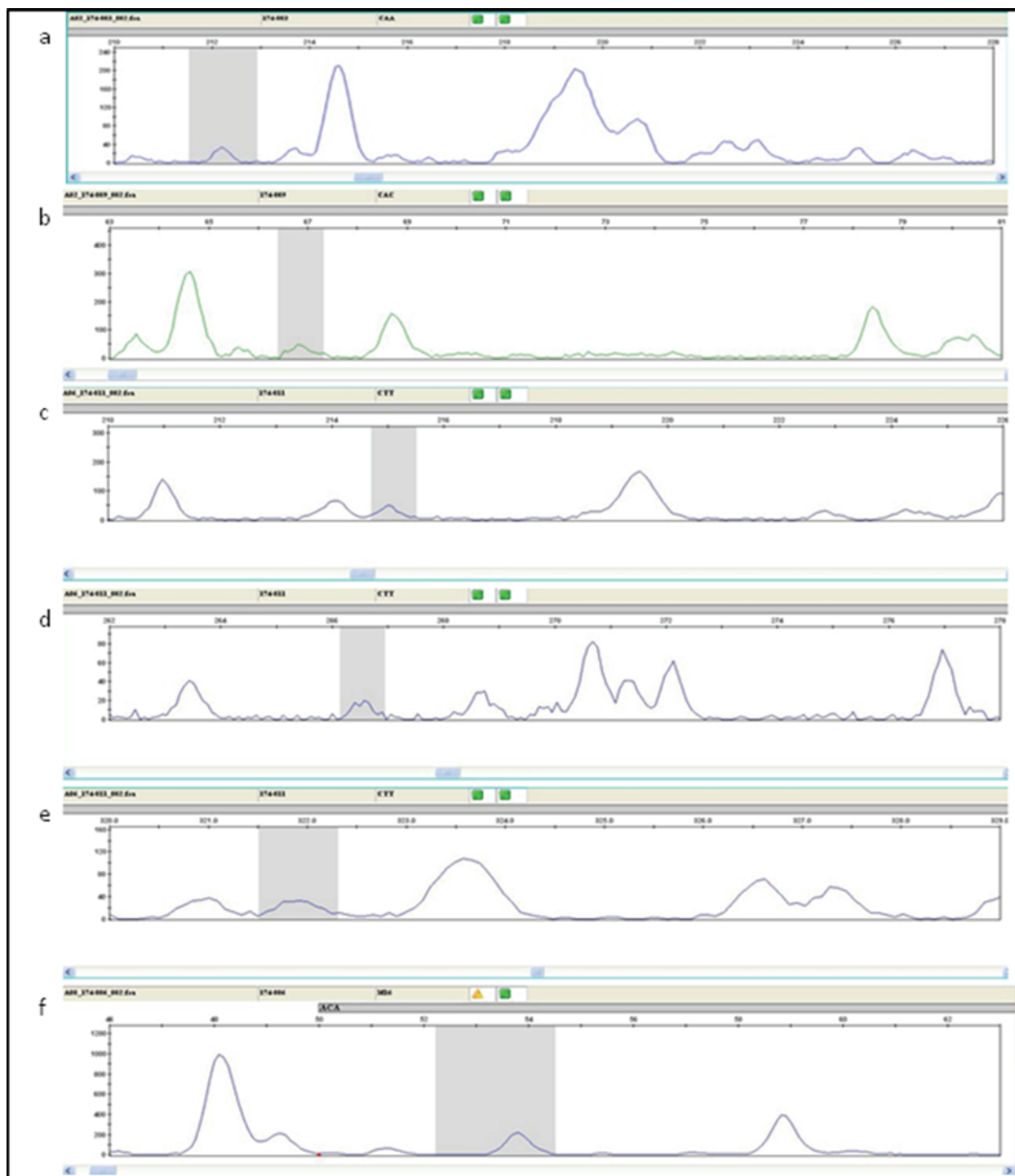
**Figuur 6.2-6:** Monster 128 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



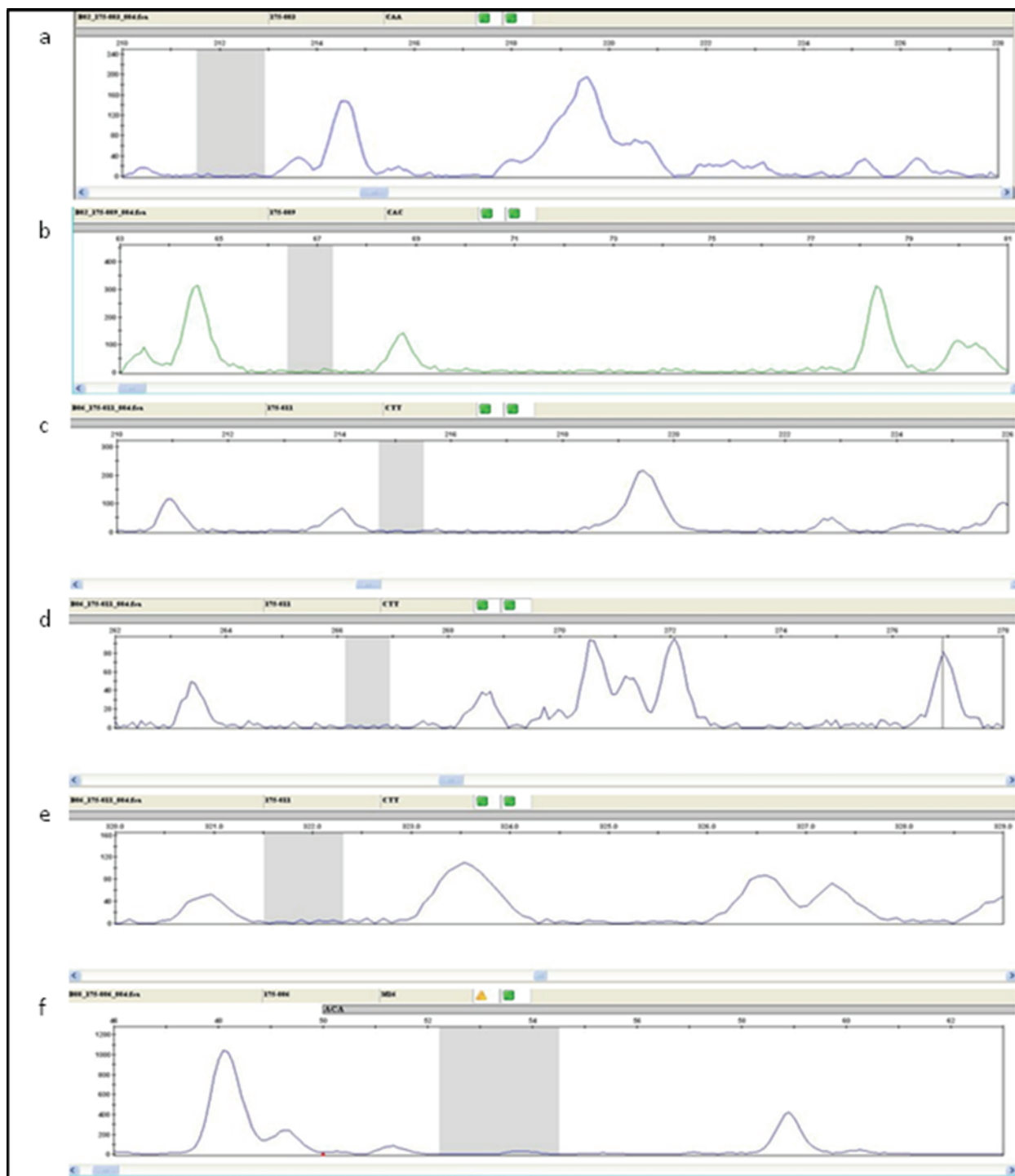
**Figuur 6.2-7:** Monster 153 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



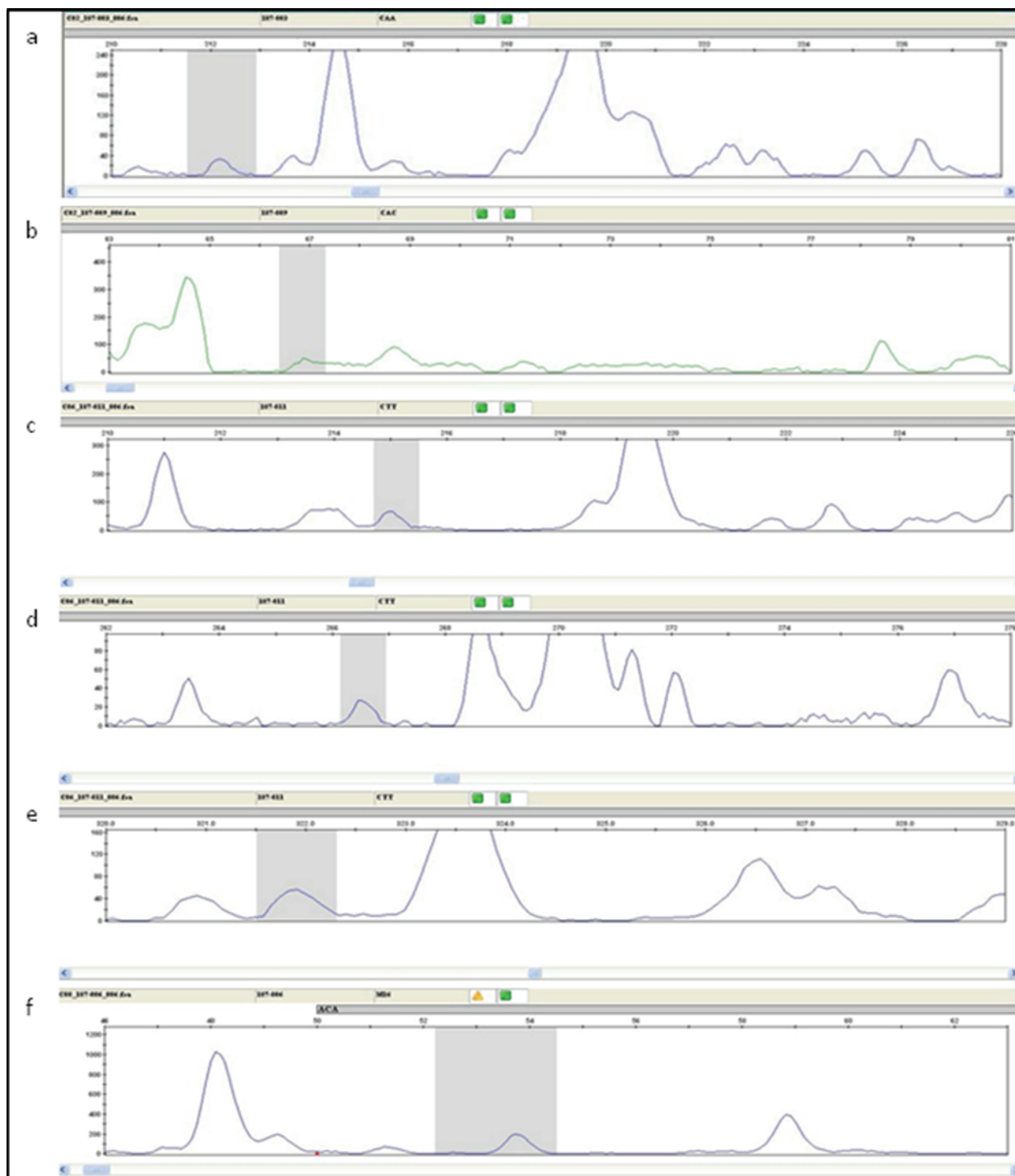
**Figuur 6.2-8:** Monster 157 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



**Figuur 6.2-9:** Monster 174 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

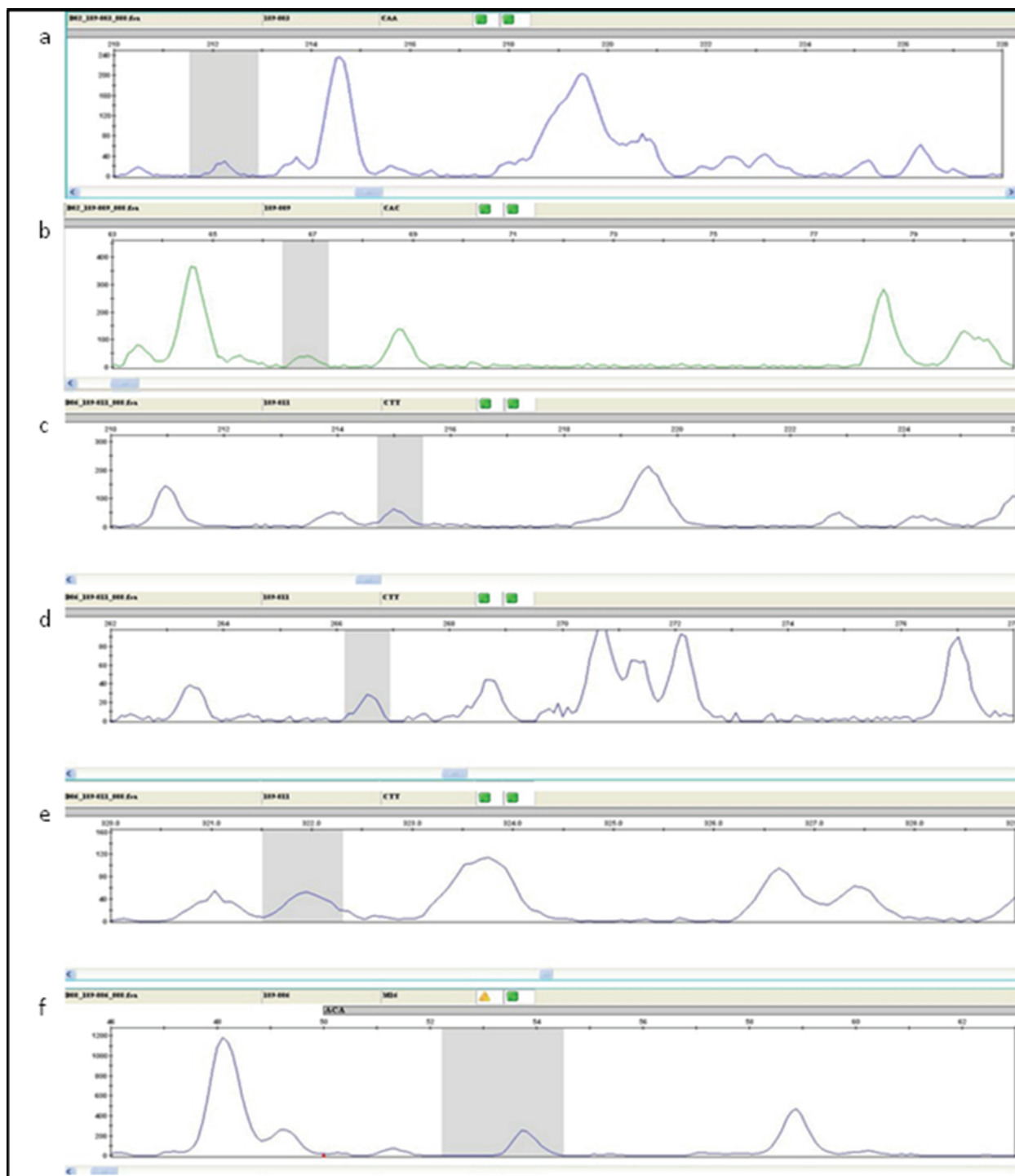


**Figuur 6.2-10:** Monster 175 se AFLP\_resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

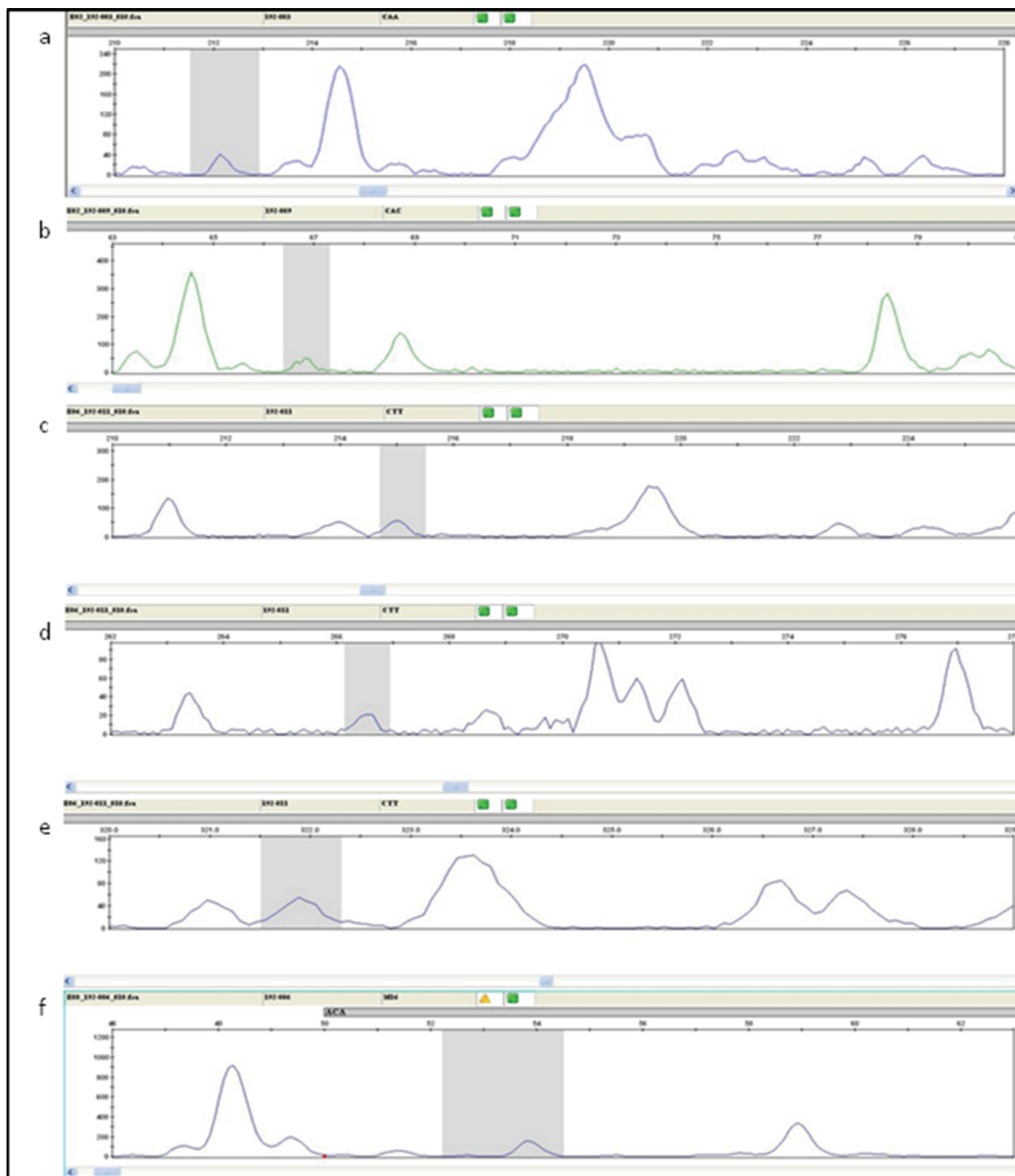


**Figuur 6.2-11:** Monster 187 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

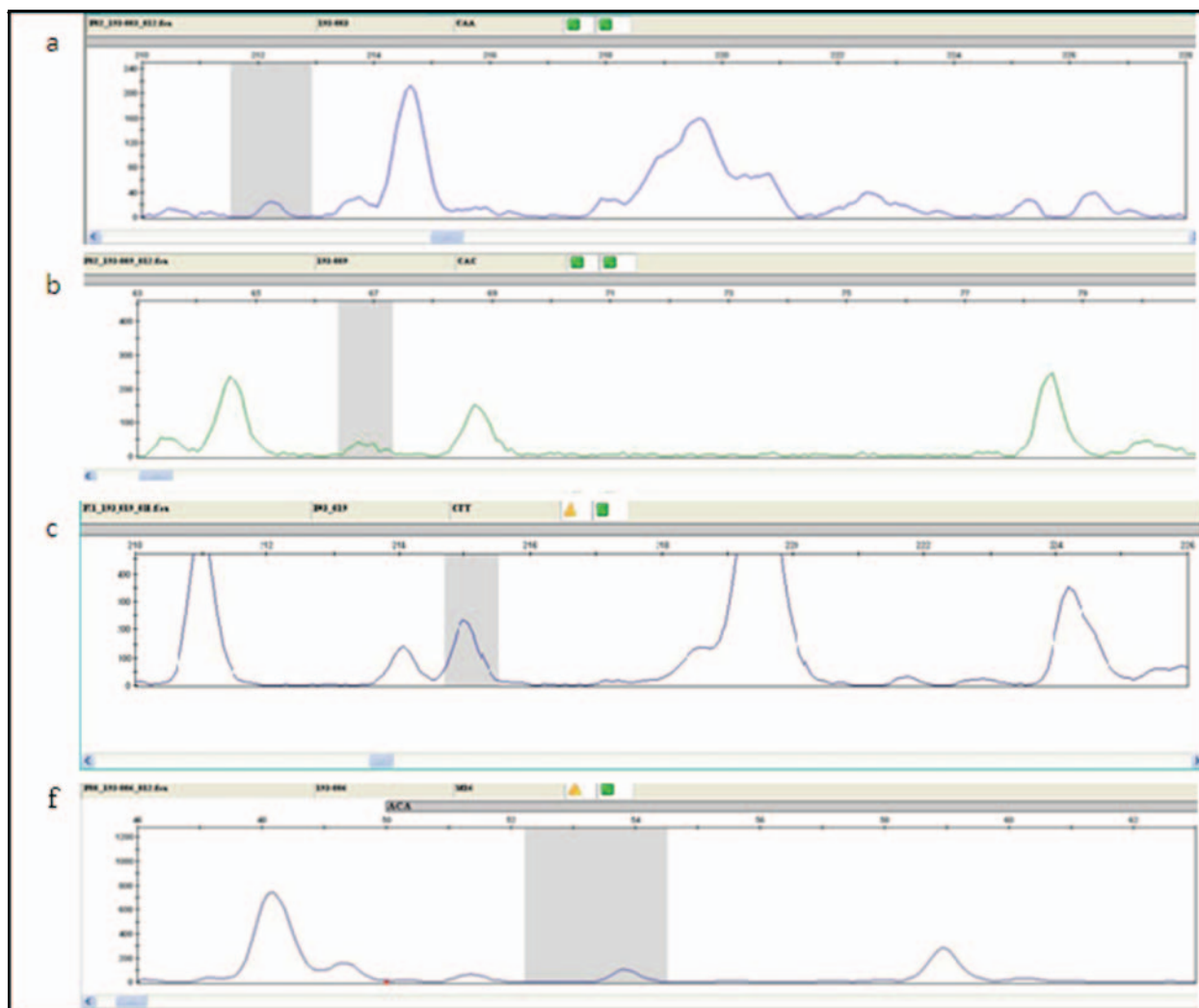




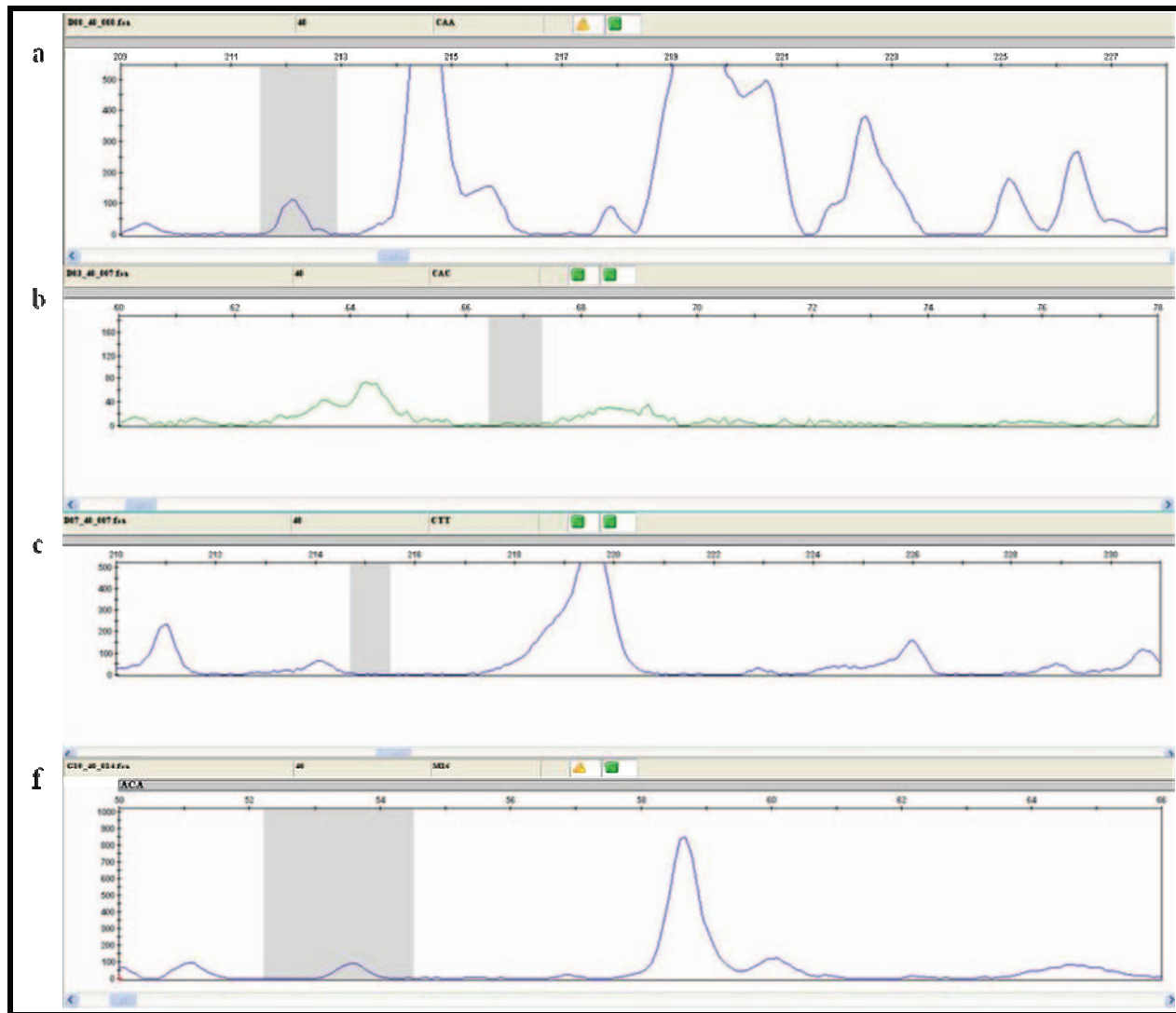
**Figuur 6.2-12:** Monster 189 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



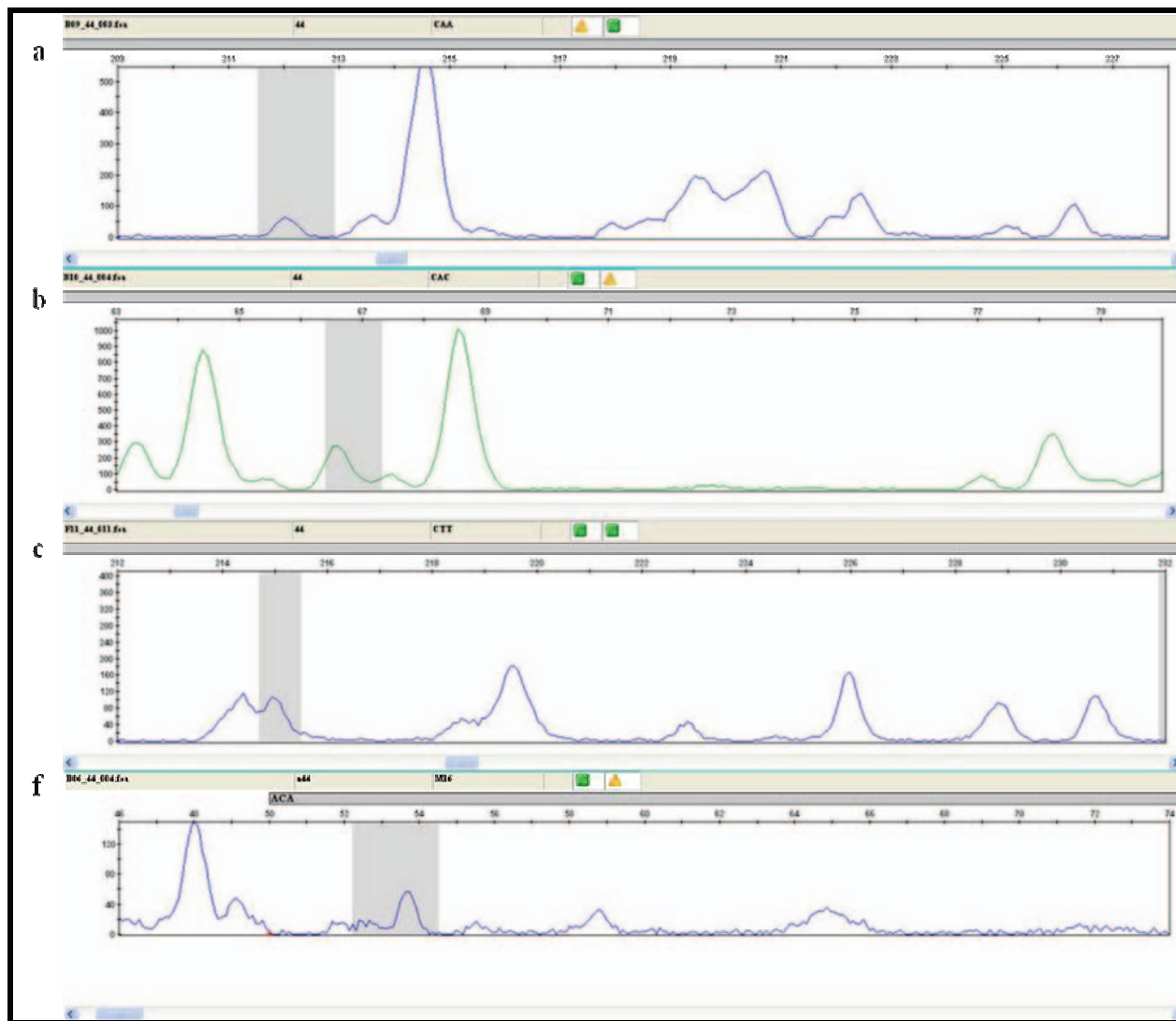
**Figuur 6.2-13:** Monster 192 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



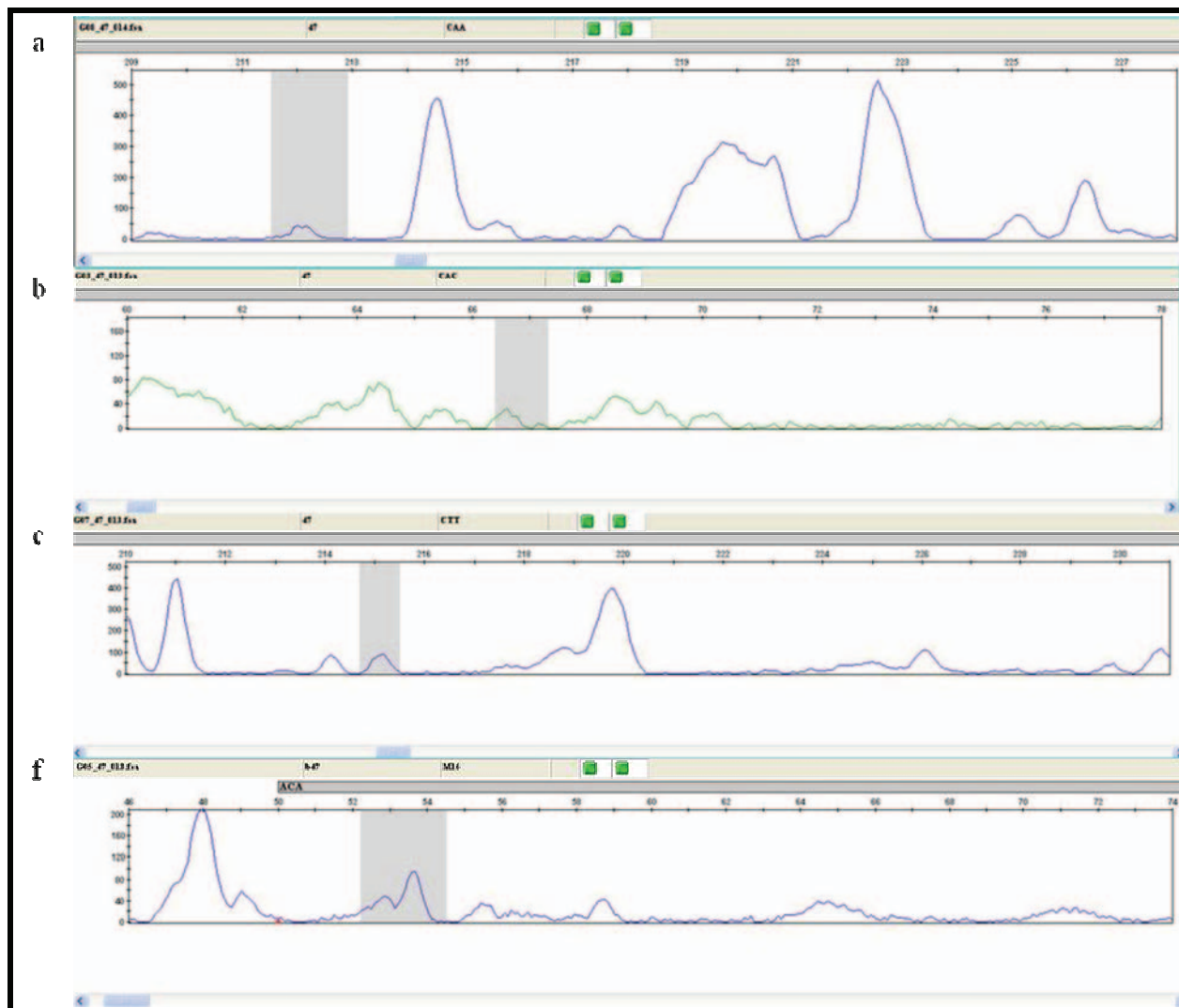
**Figuur 6.2-14:** Monster 193 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



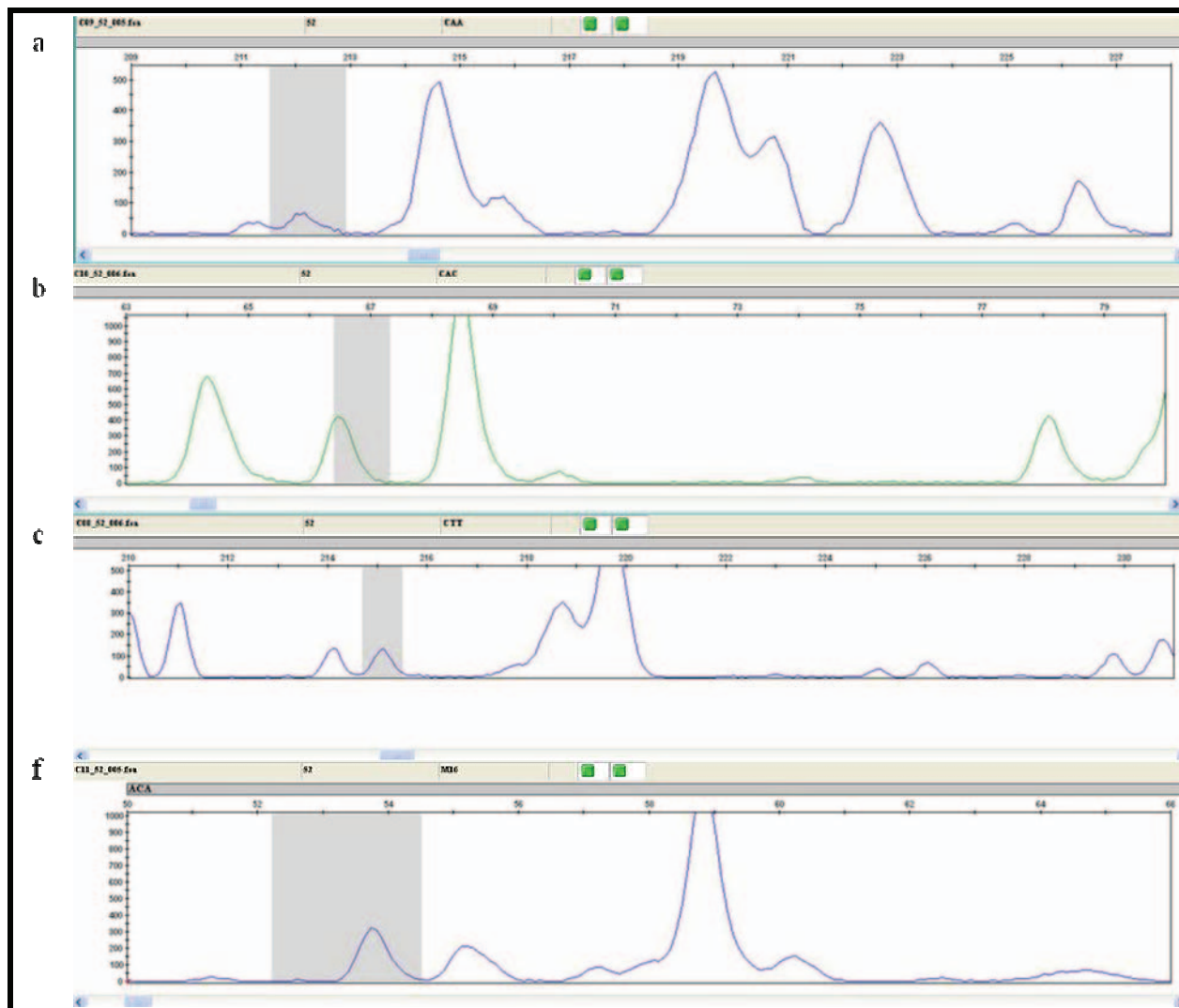
**Figuur 6.2-15:** Monster 40 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



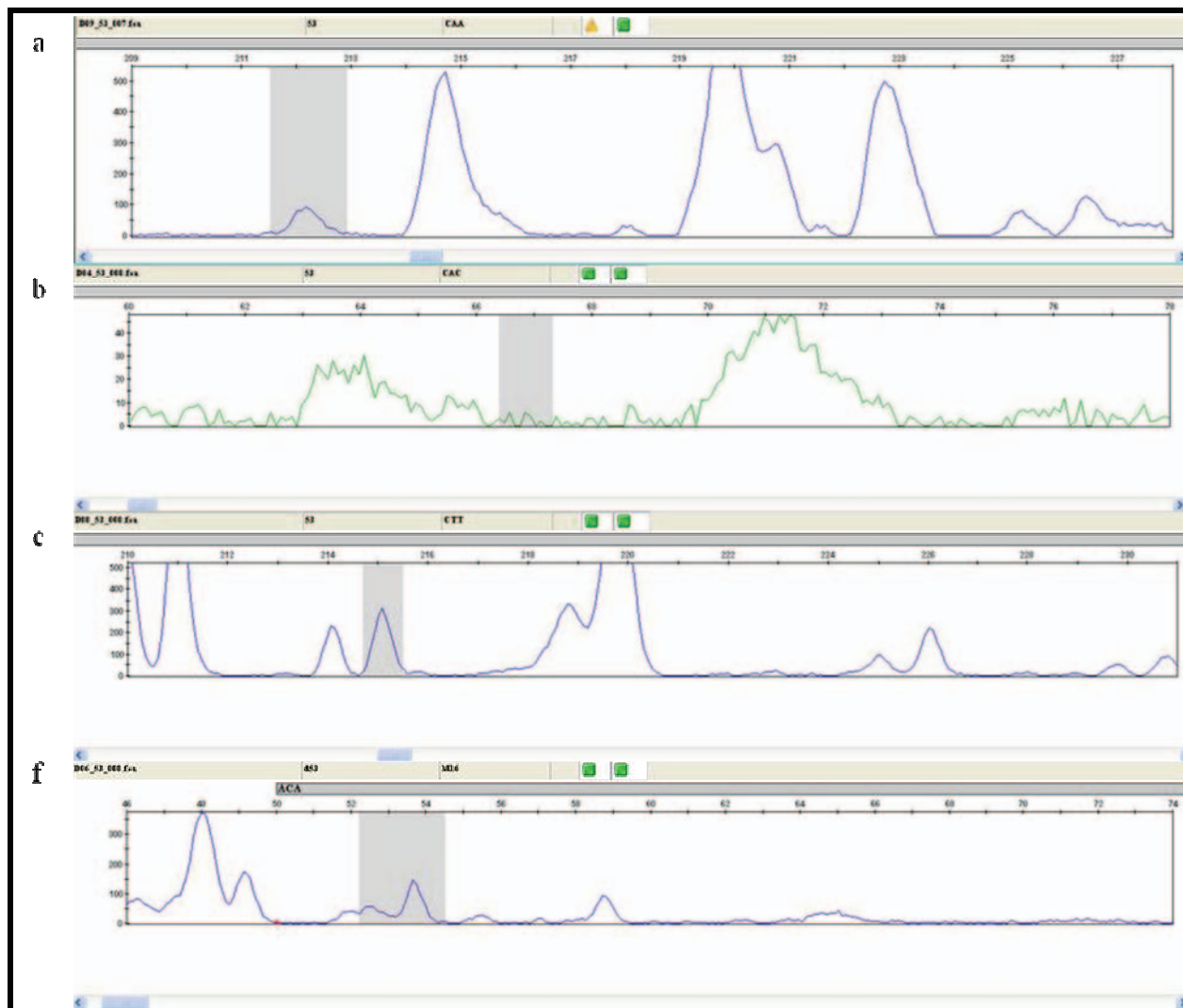
**Figuur 6.2-16:** Monster 44 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



**Figuur 6.2-17:** Monster 47 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

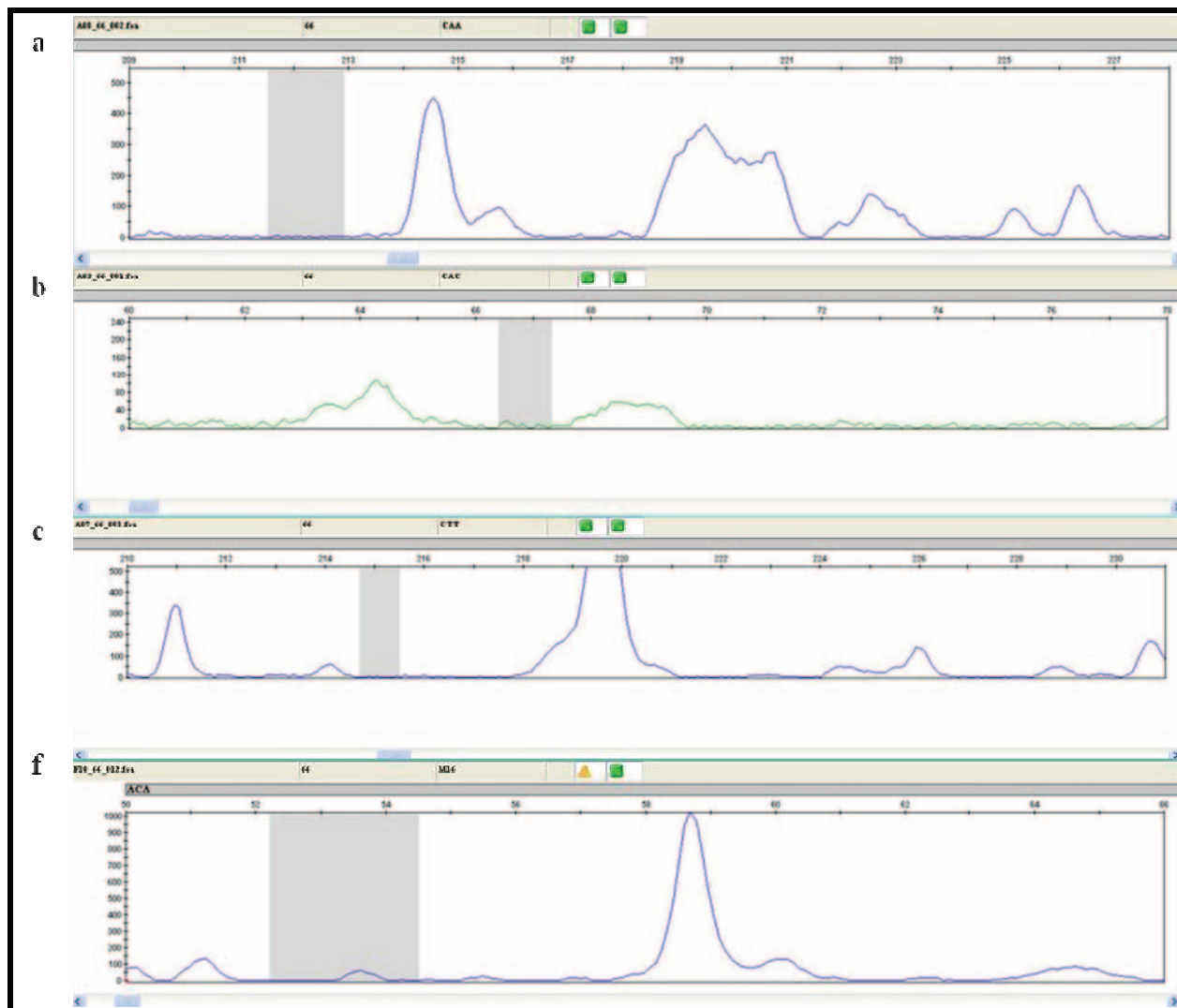


**Figuur 6.2-18:** Monster 52 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

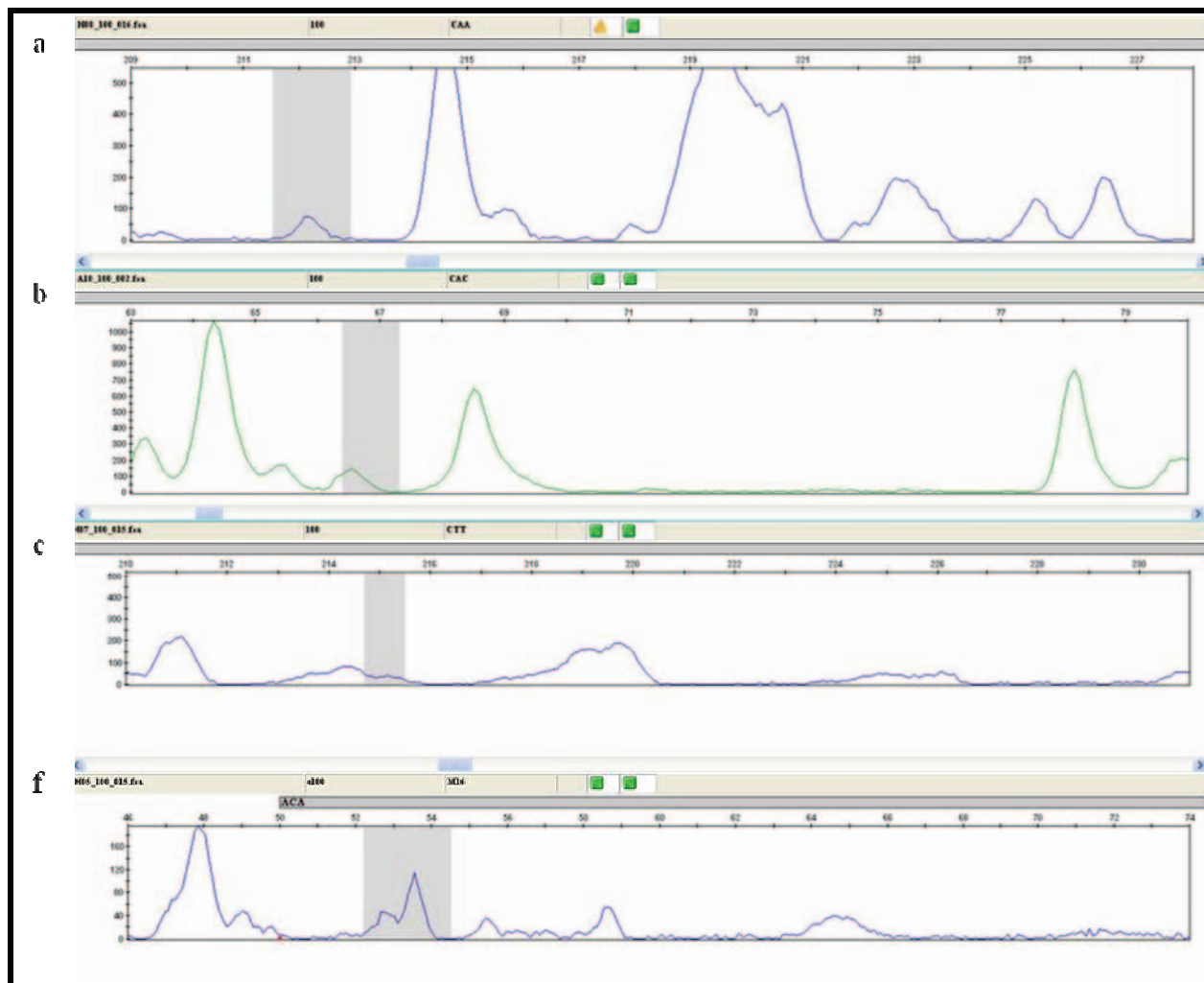


**Figuur 6.2-19:** Monster 53 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

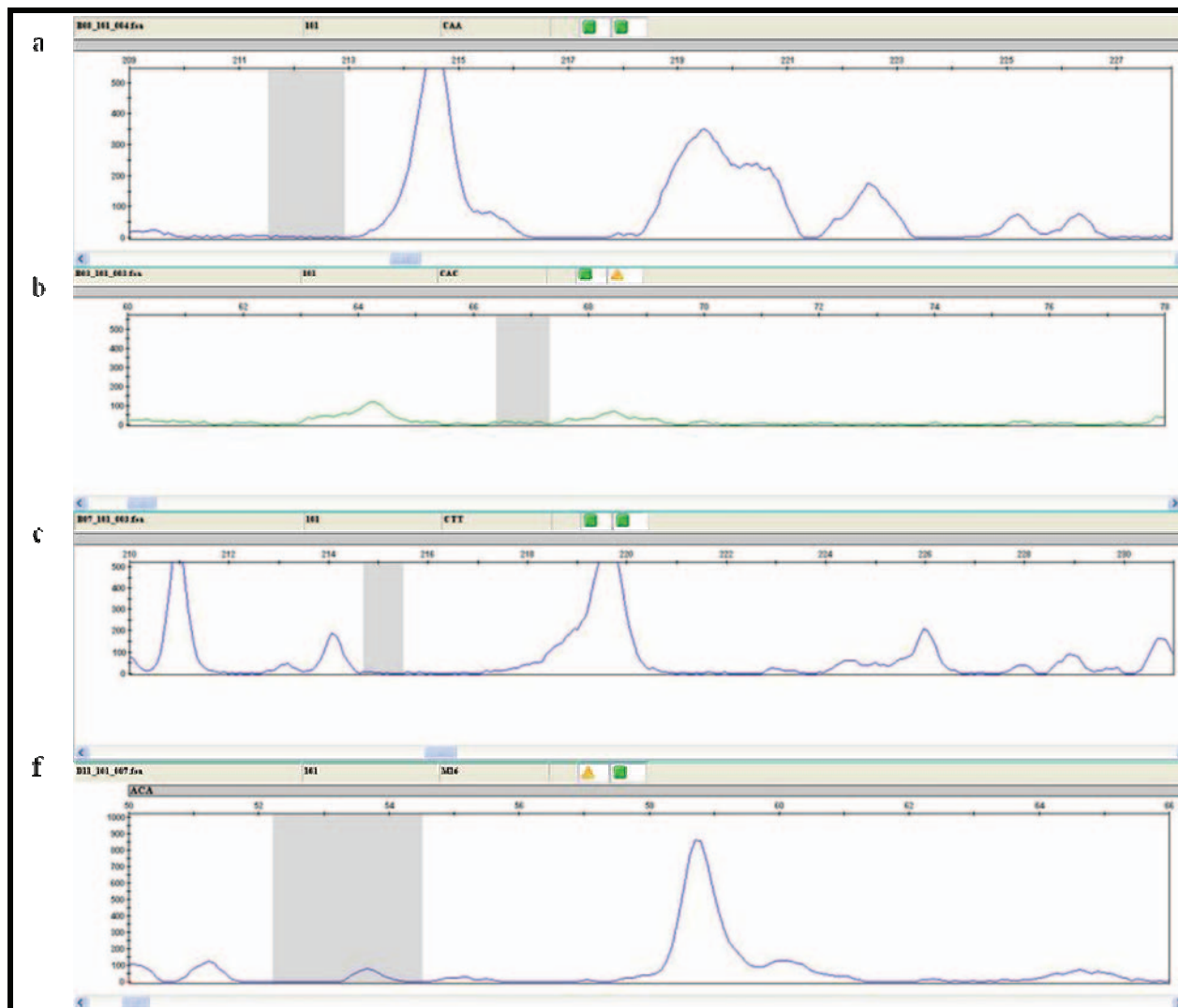




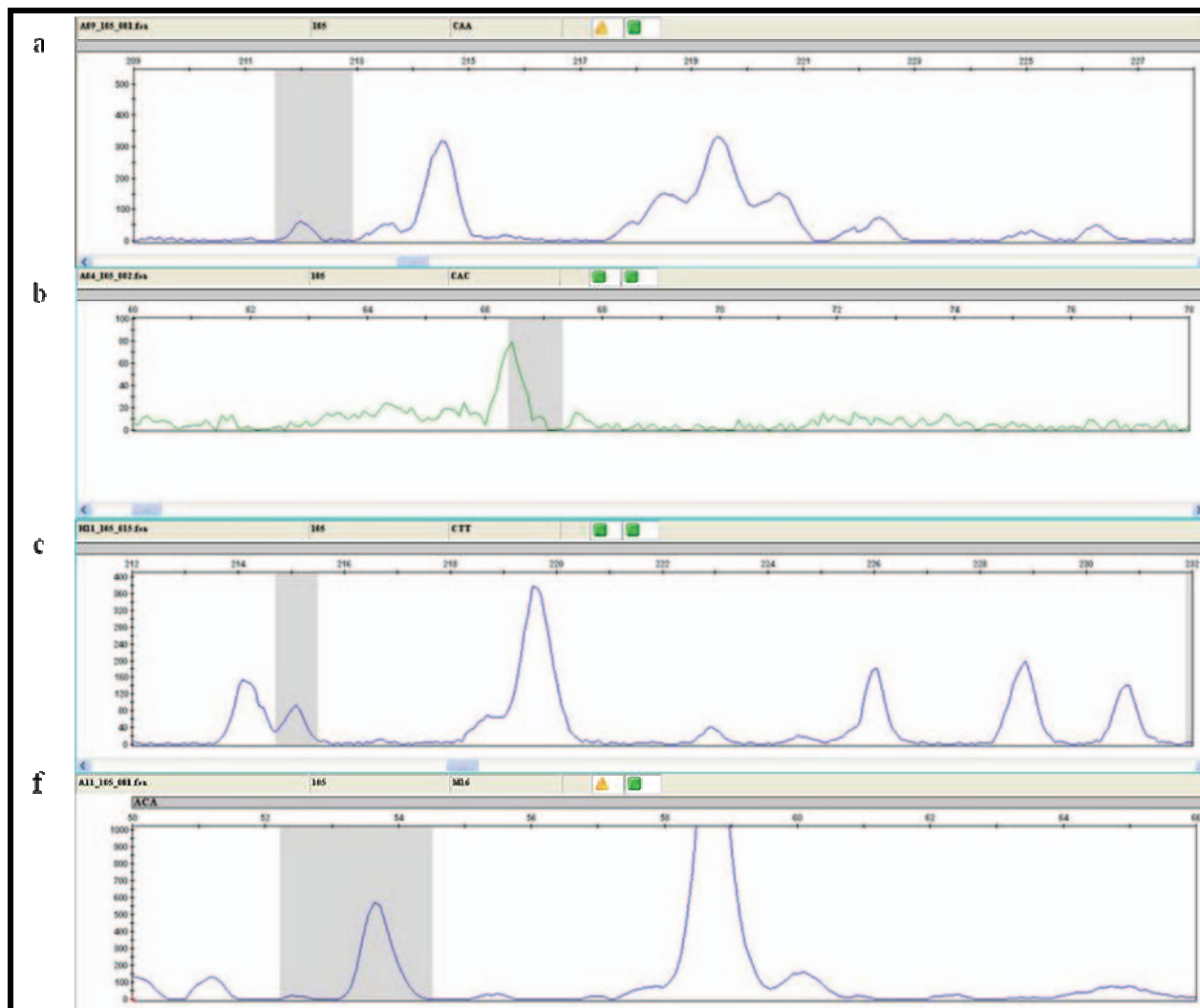
**Figuur 6.2-20:** Monster 66 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



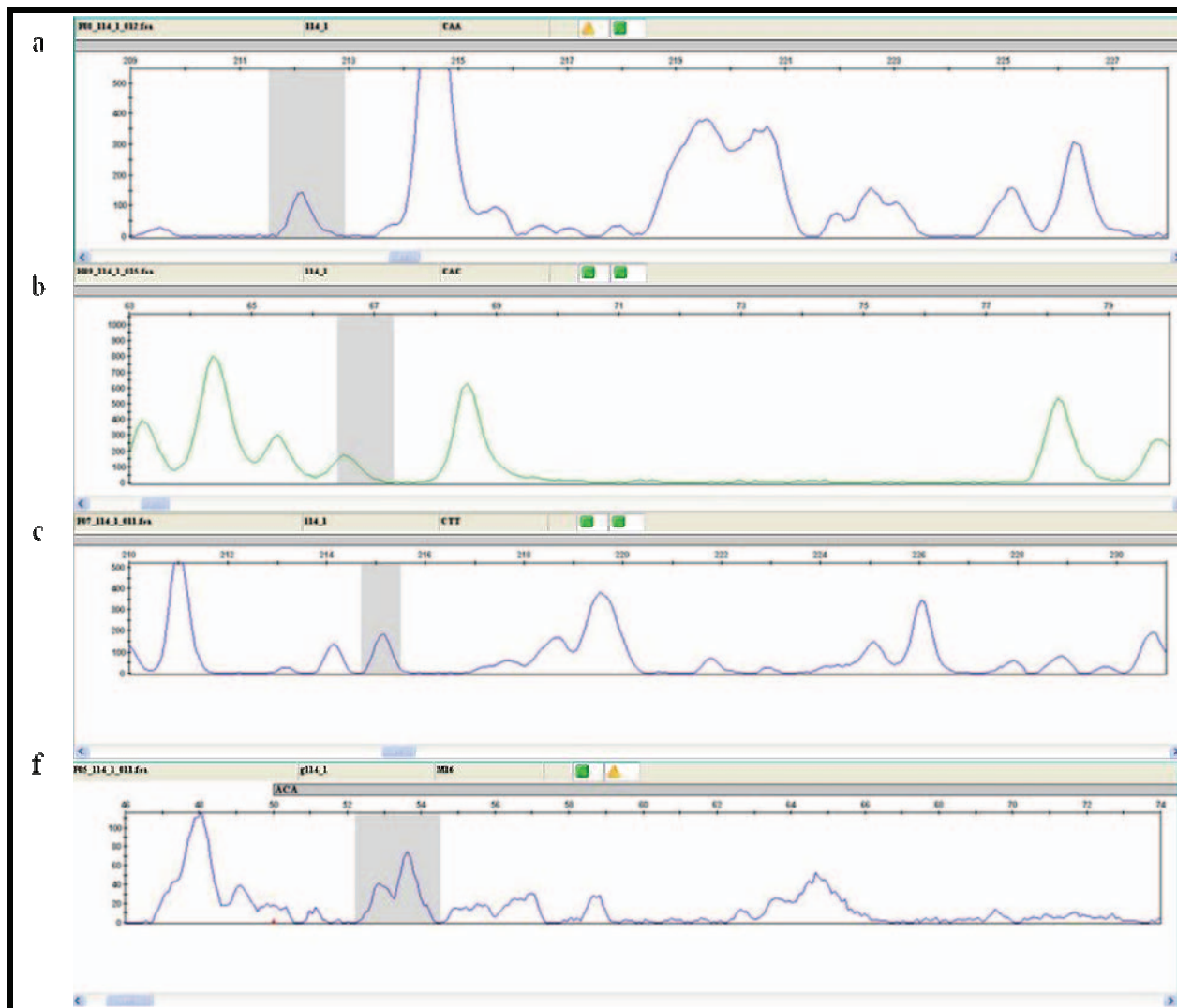
**Figuur 6.2-21:** Monster 100 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



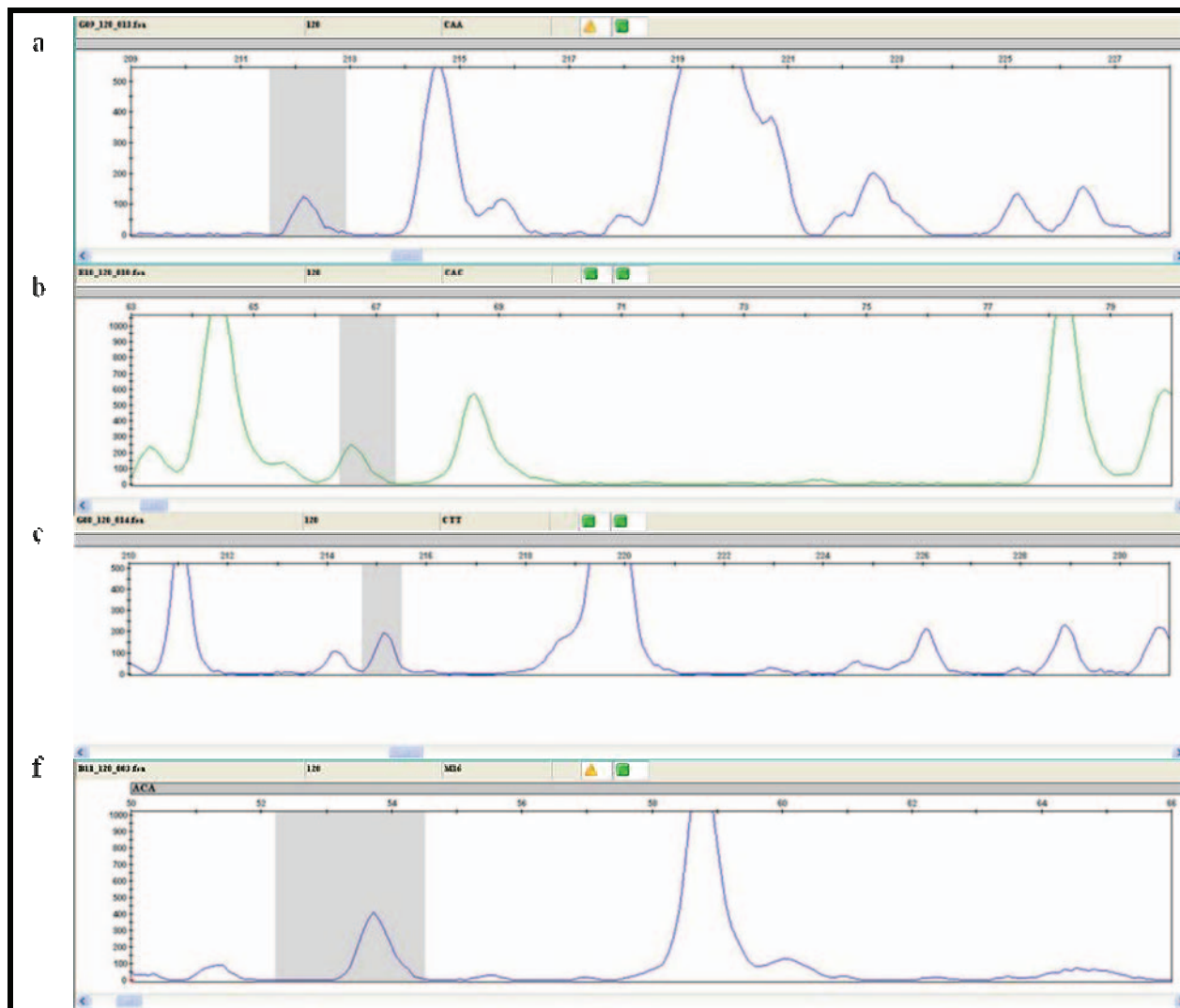
**Figuur 6.2-22:** Monster 101 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



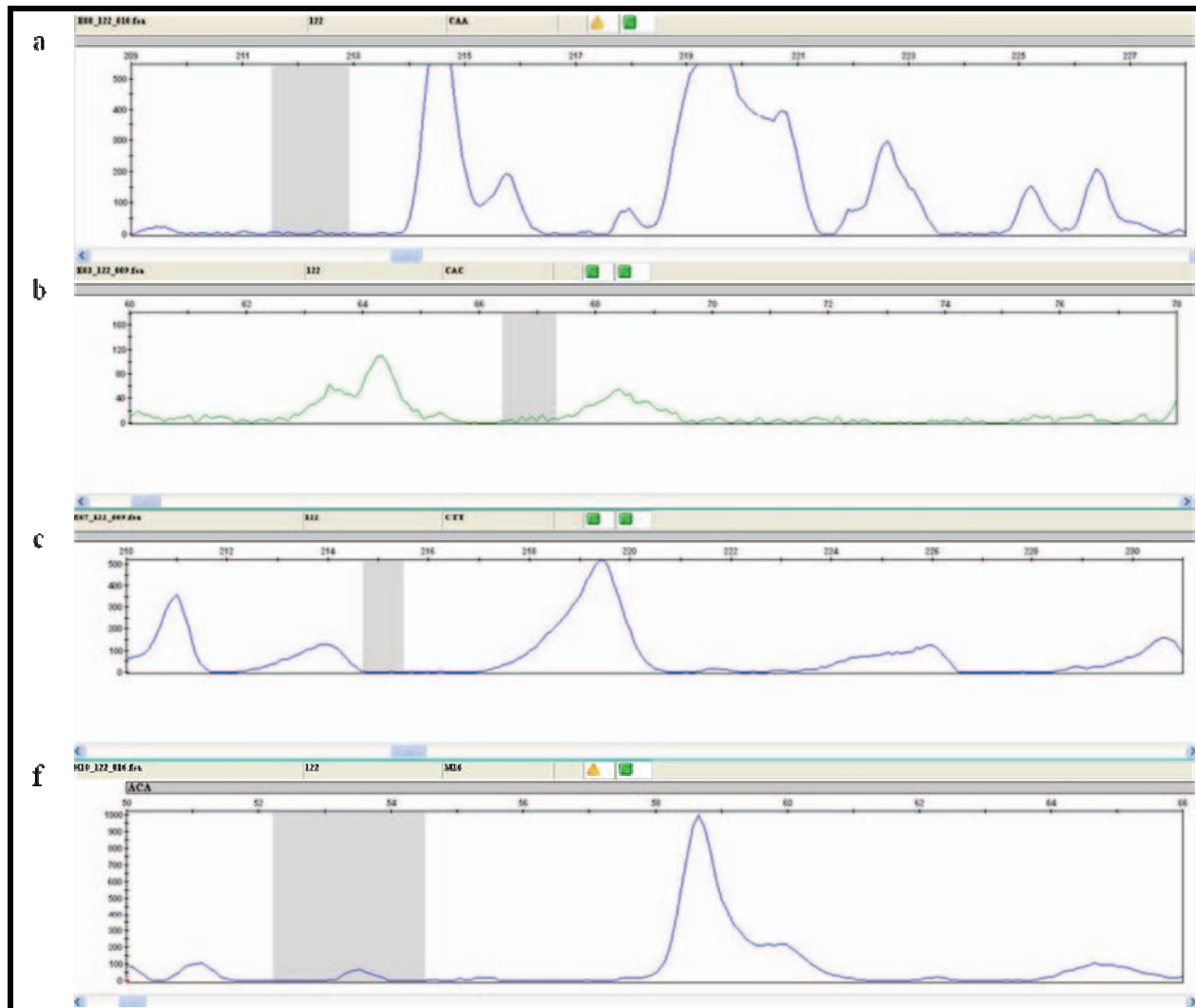
**Figuur 6.2-23:** Monster 105 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



**Figuur 6.2-24:** Monster 114-1 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

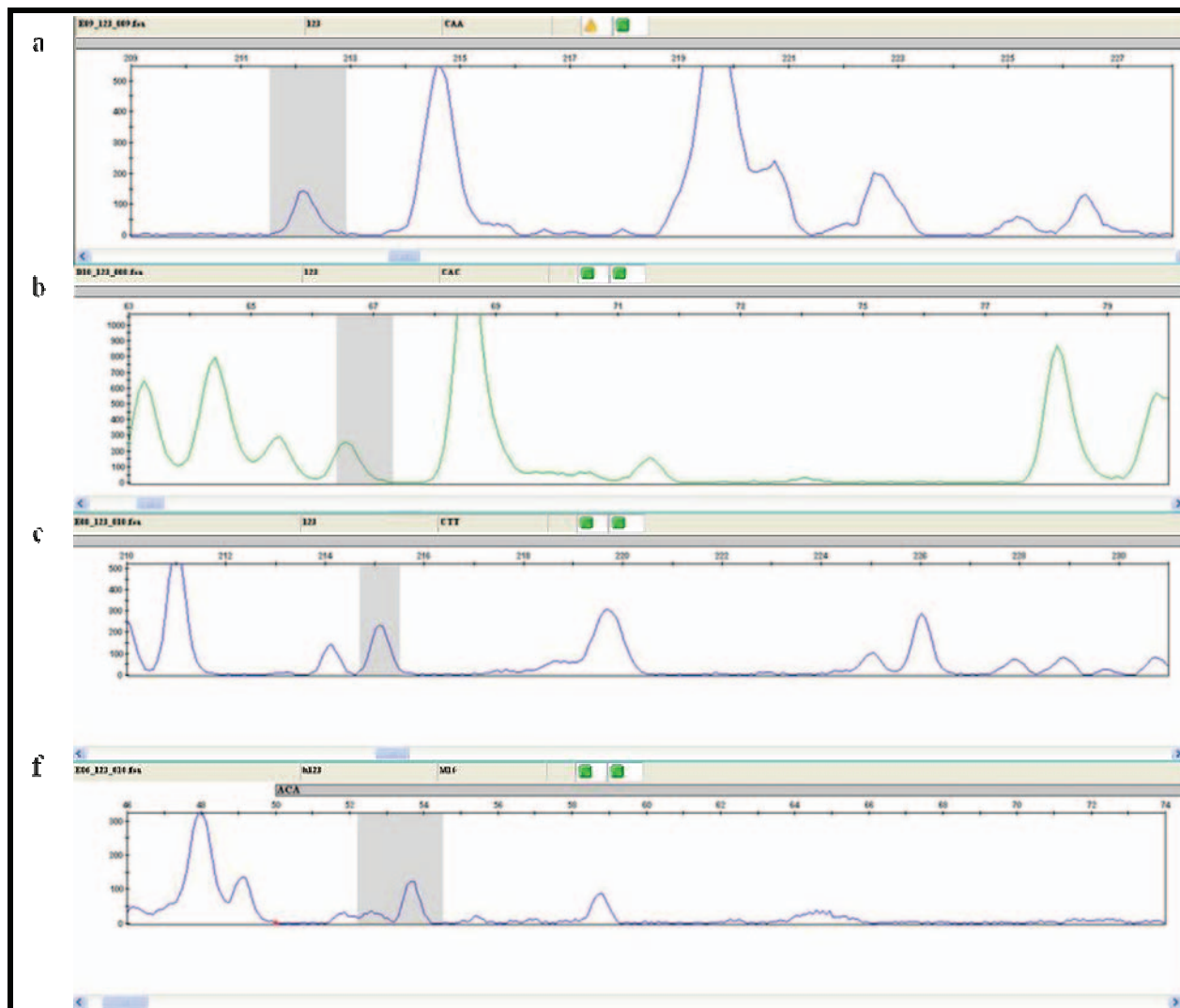


**Figuur 6.2-25:** Monster 120 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



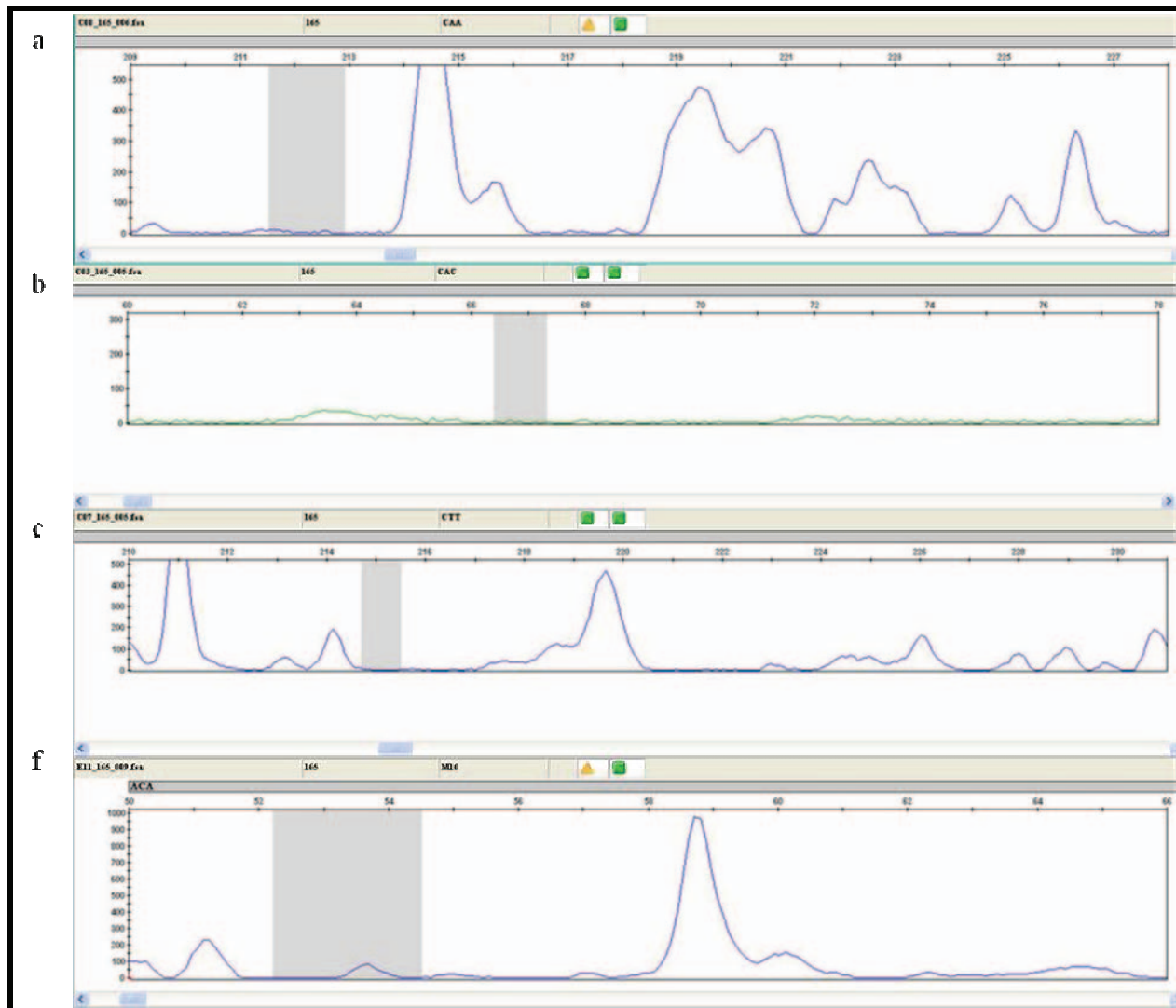
**Figuur 6.2-26:** Monster 122 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



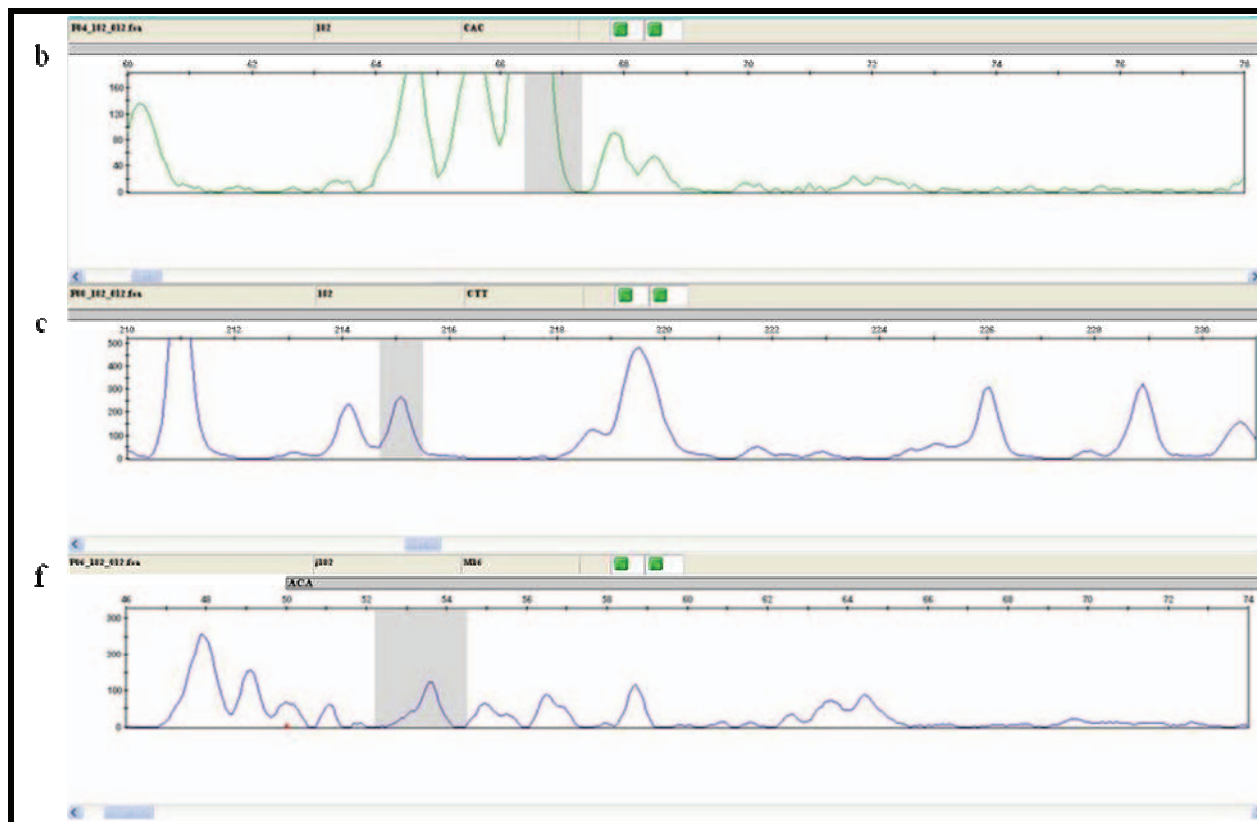


**Figuur 6.2-27:** Monster 123 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

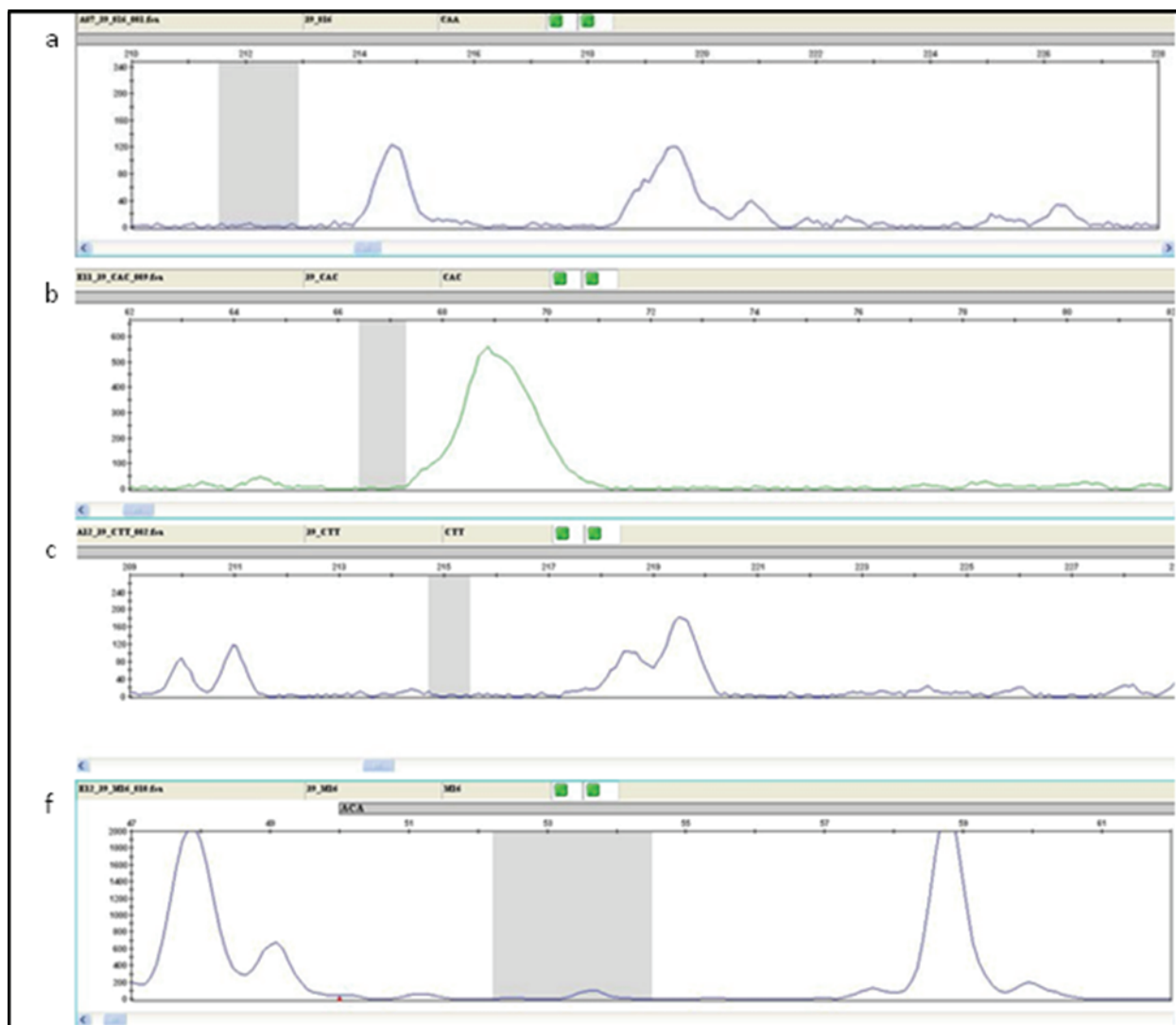




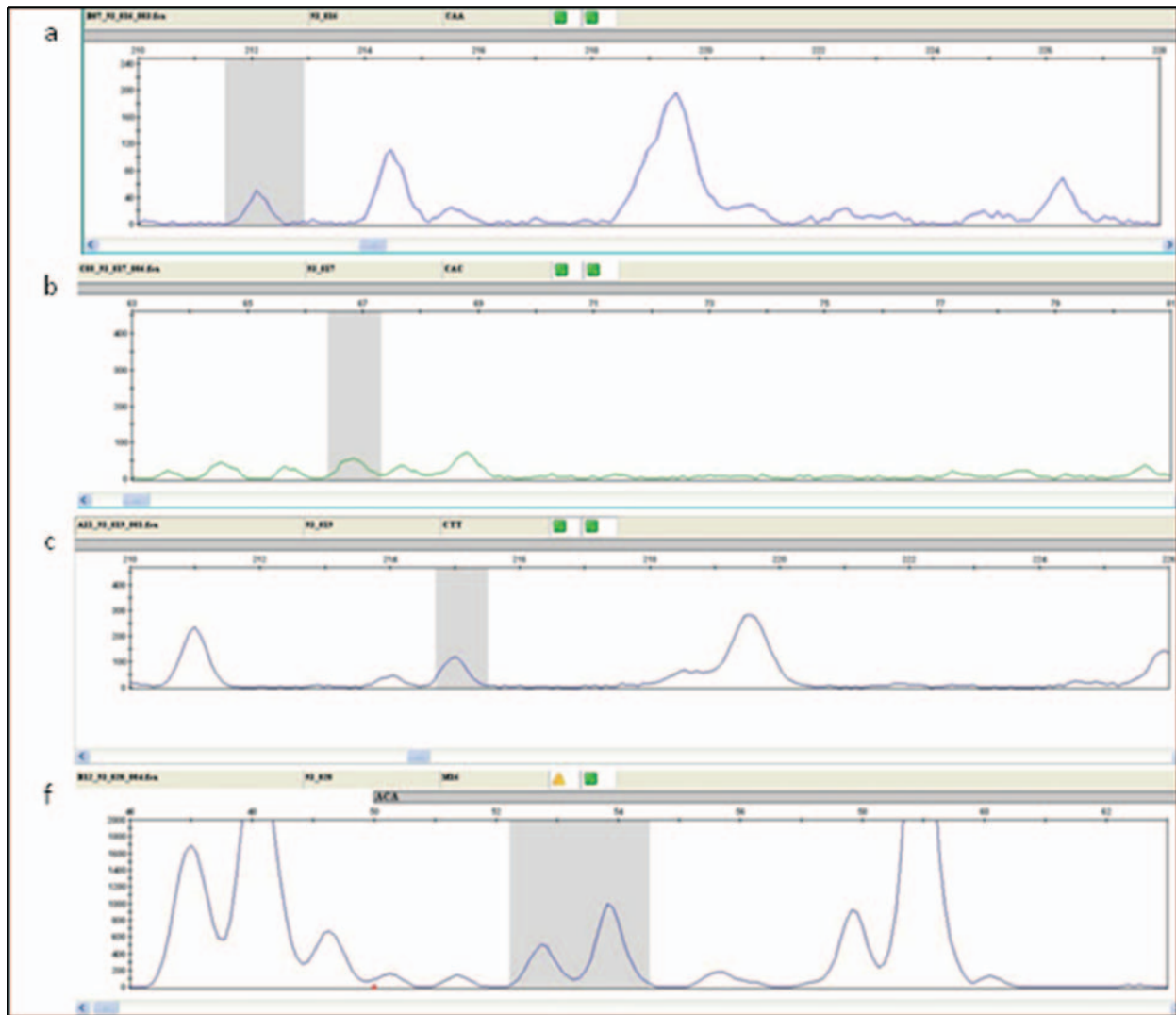
**Figuur 6.2-28:** Monster 165 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



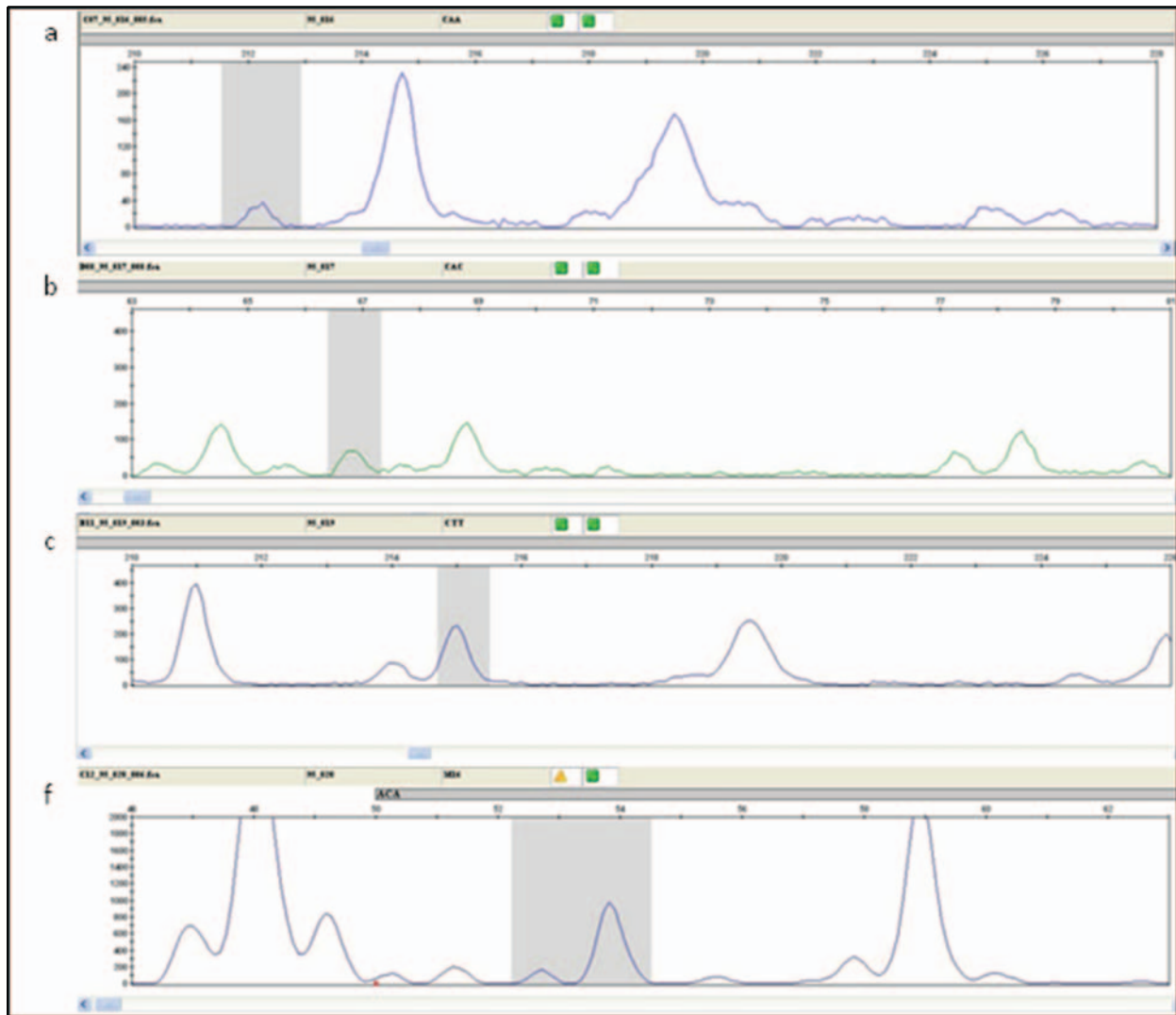
**Figuur 6.2-29:** Monster 182 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



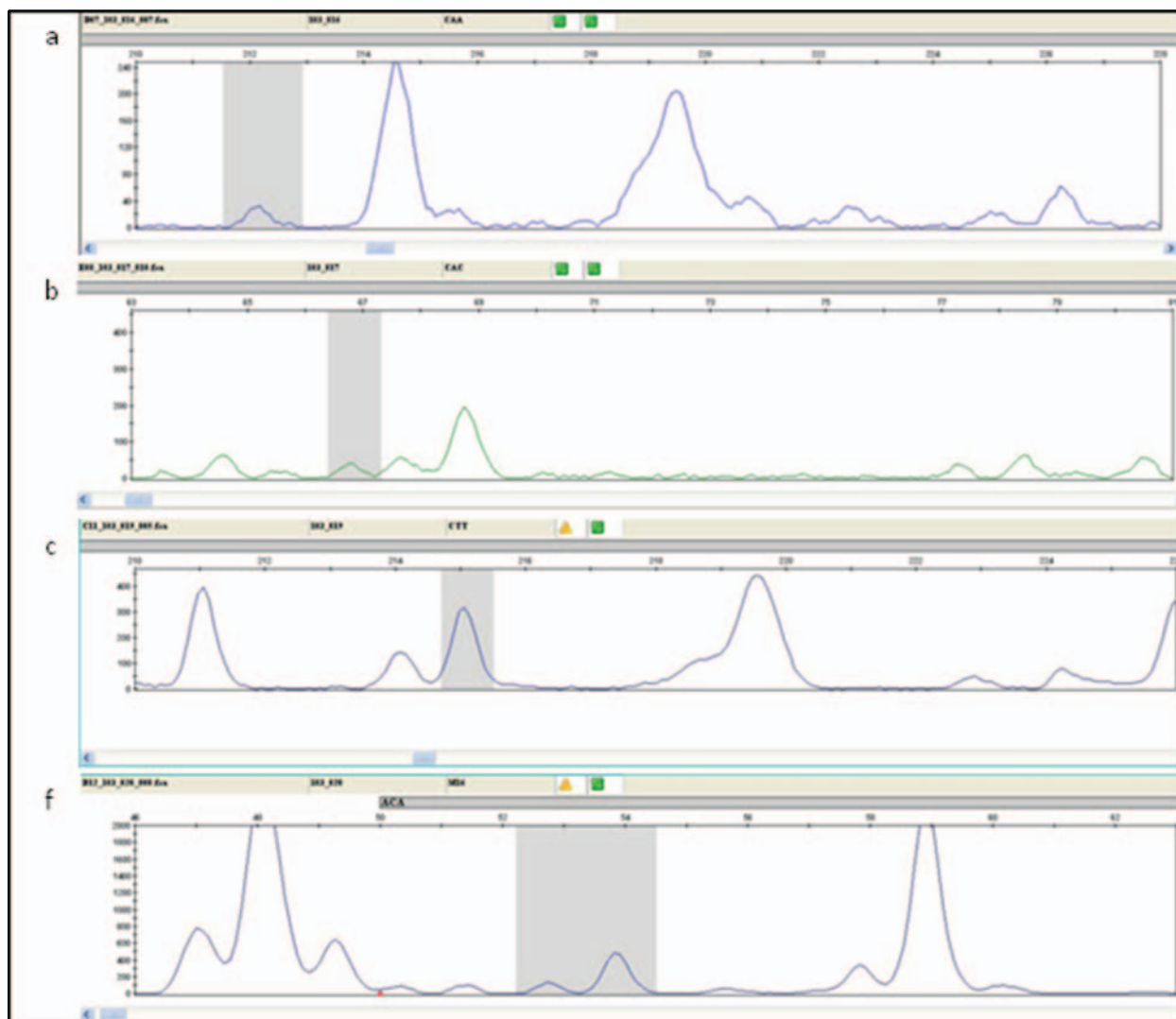
**Figuur 6.2-30:** Die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van monster 39 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



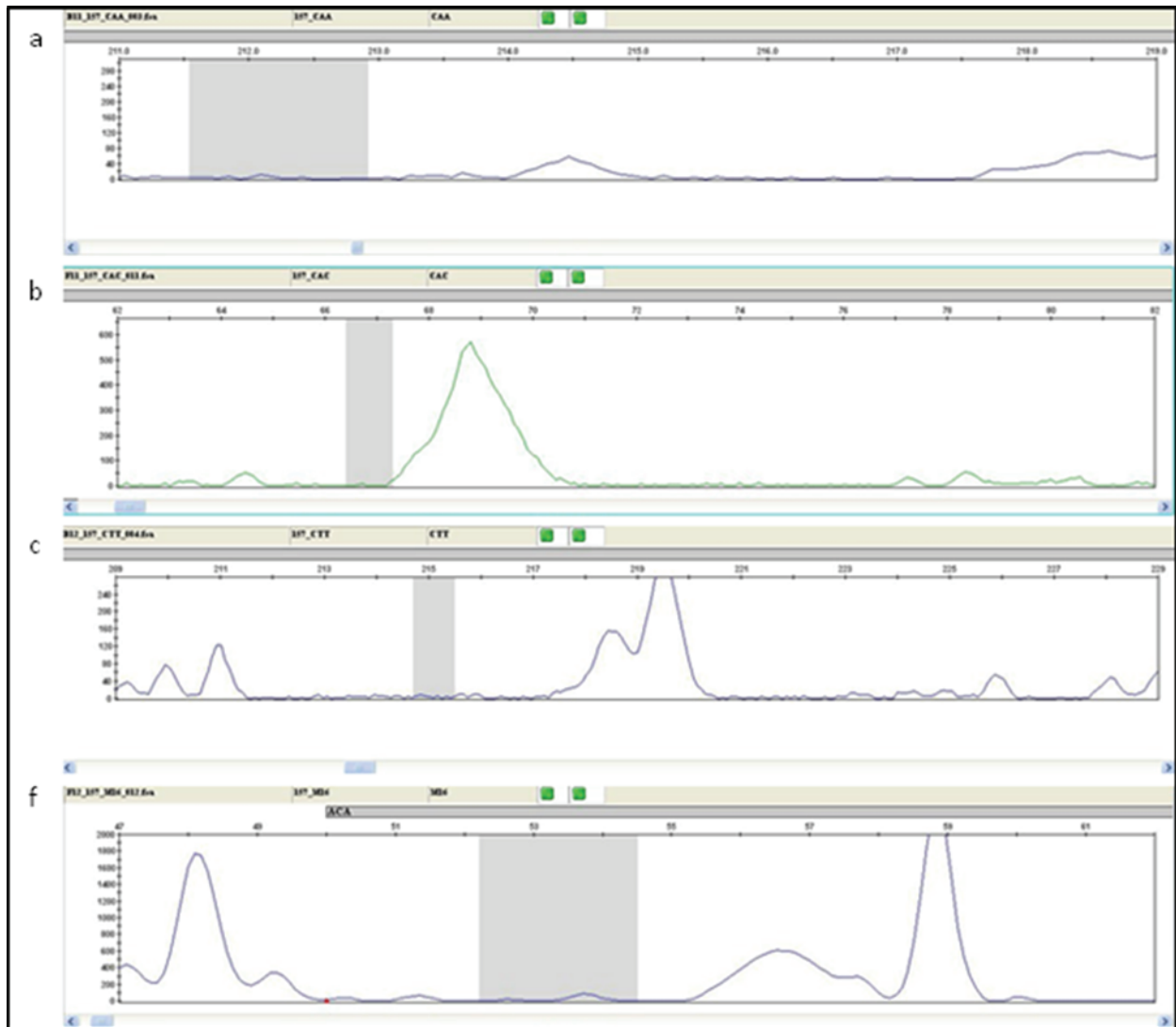
**Figuur 6.2-31:** Die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van monster 93 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



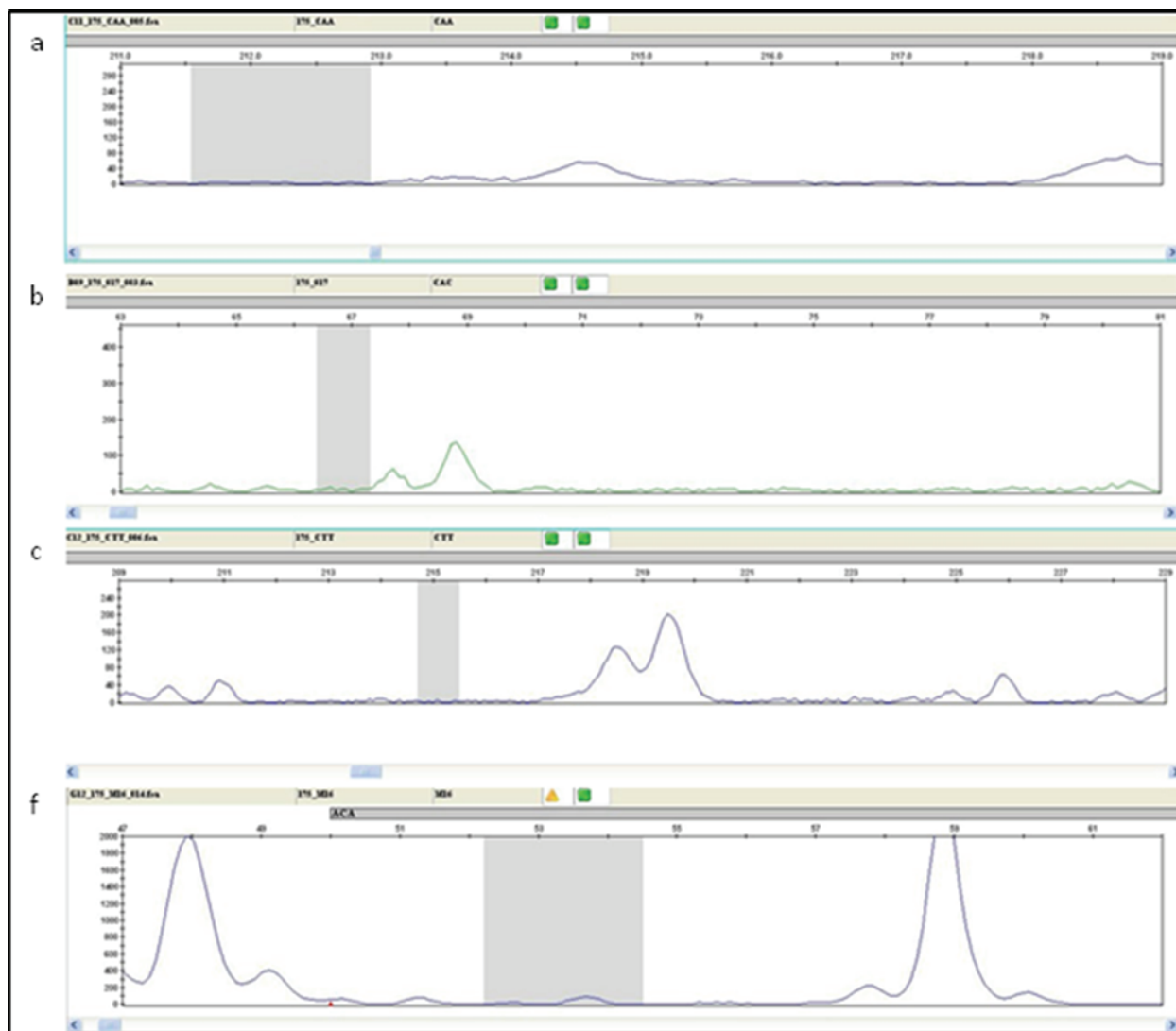
**Figuur 6.2-32:** Die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van monster 95 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



**Figuur 6.2-33:** Die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van monster 103 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

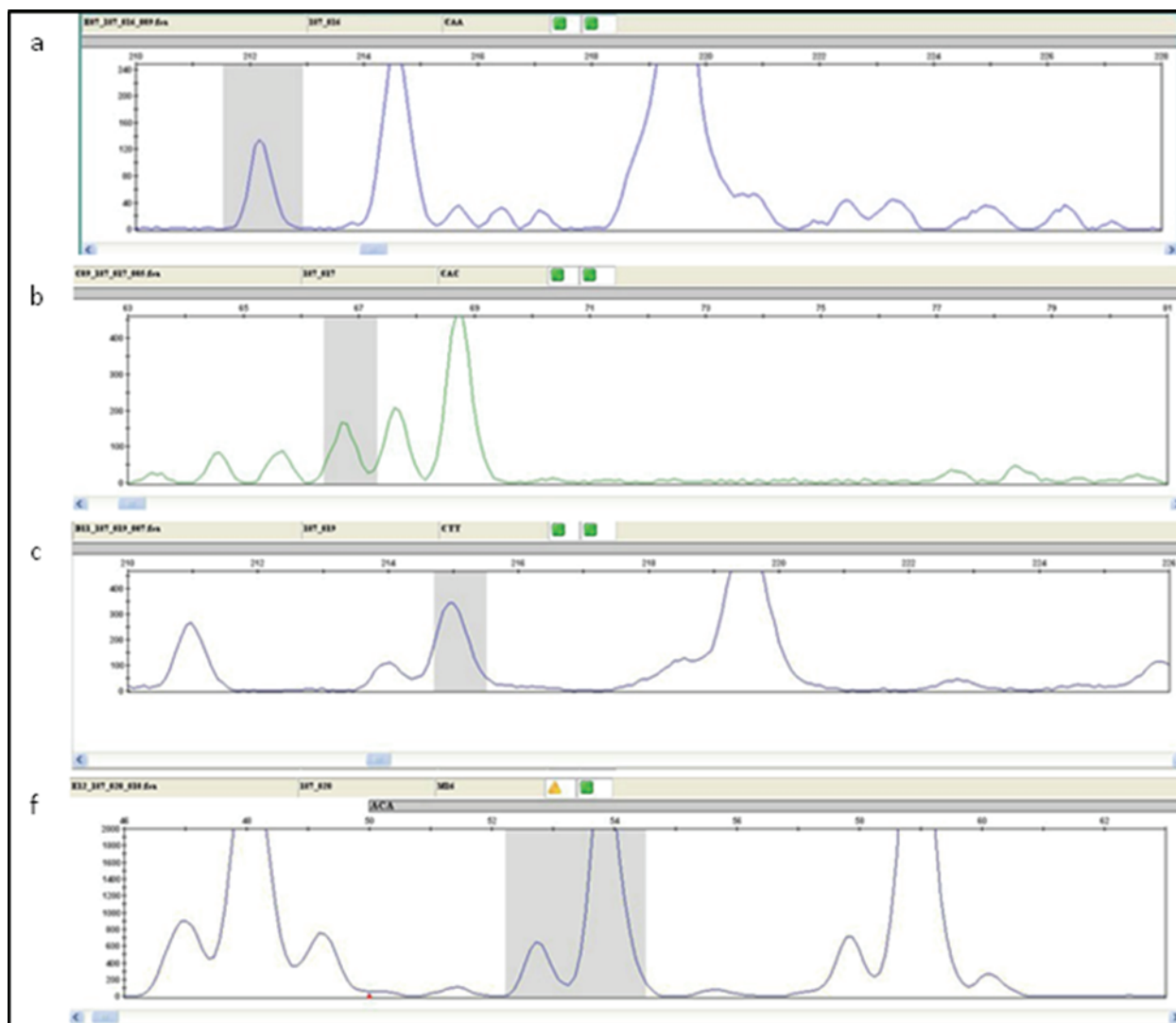


**Figuur 6.2-34:** Die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van monster 157 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

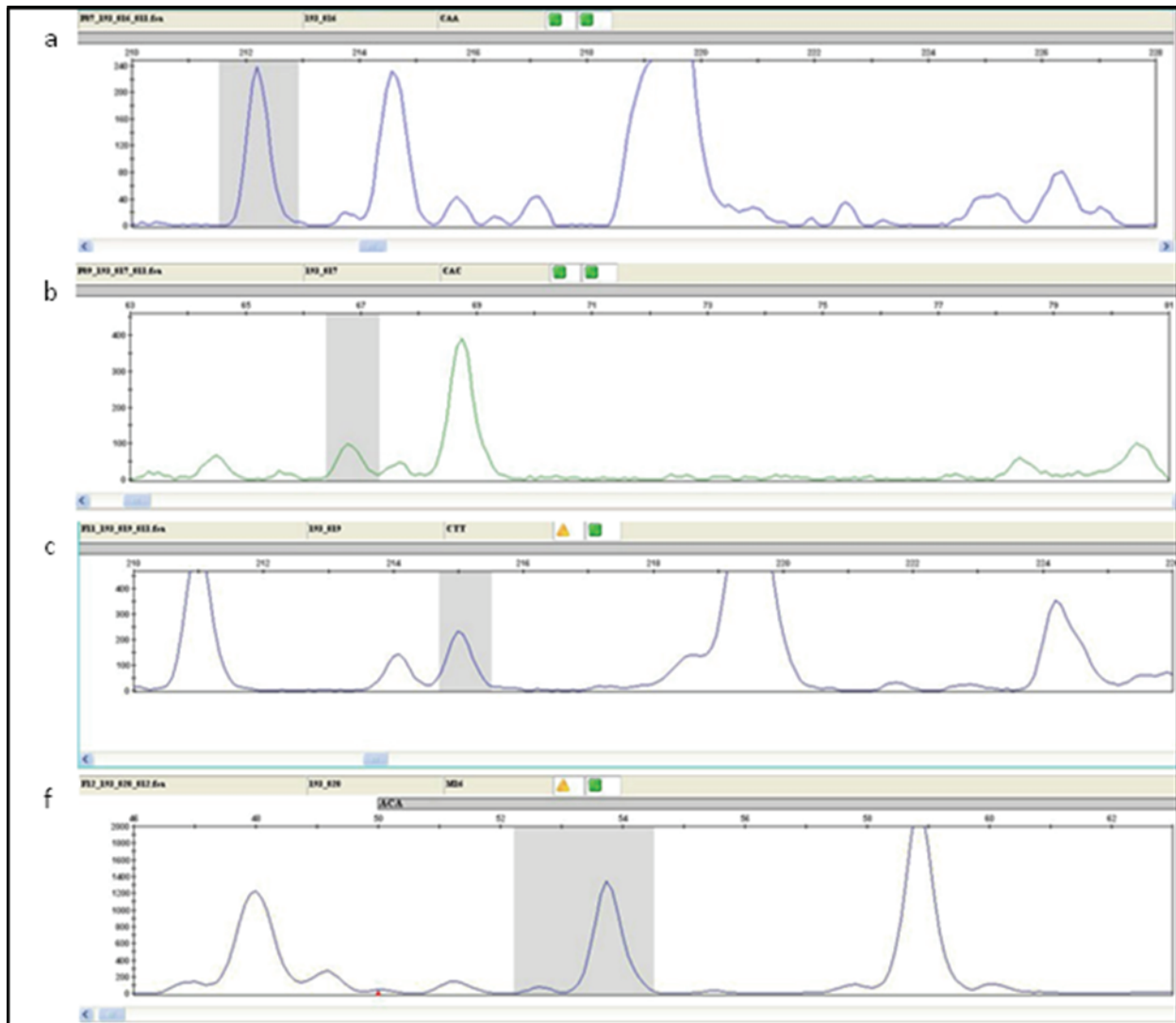


**Figuur 6.2-35:** Die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van monster 175 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.

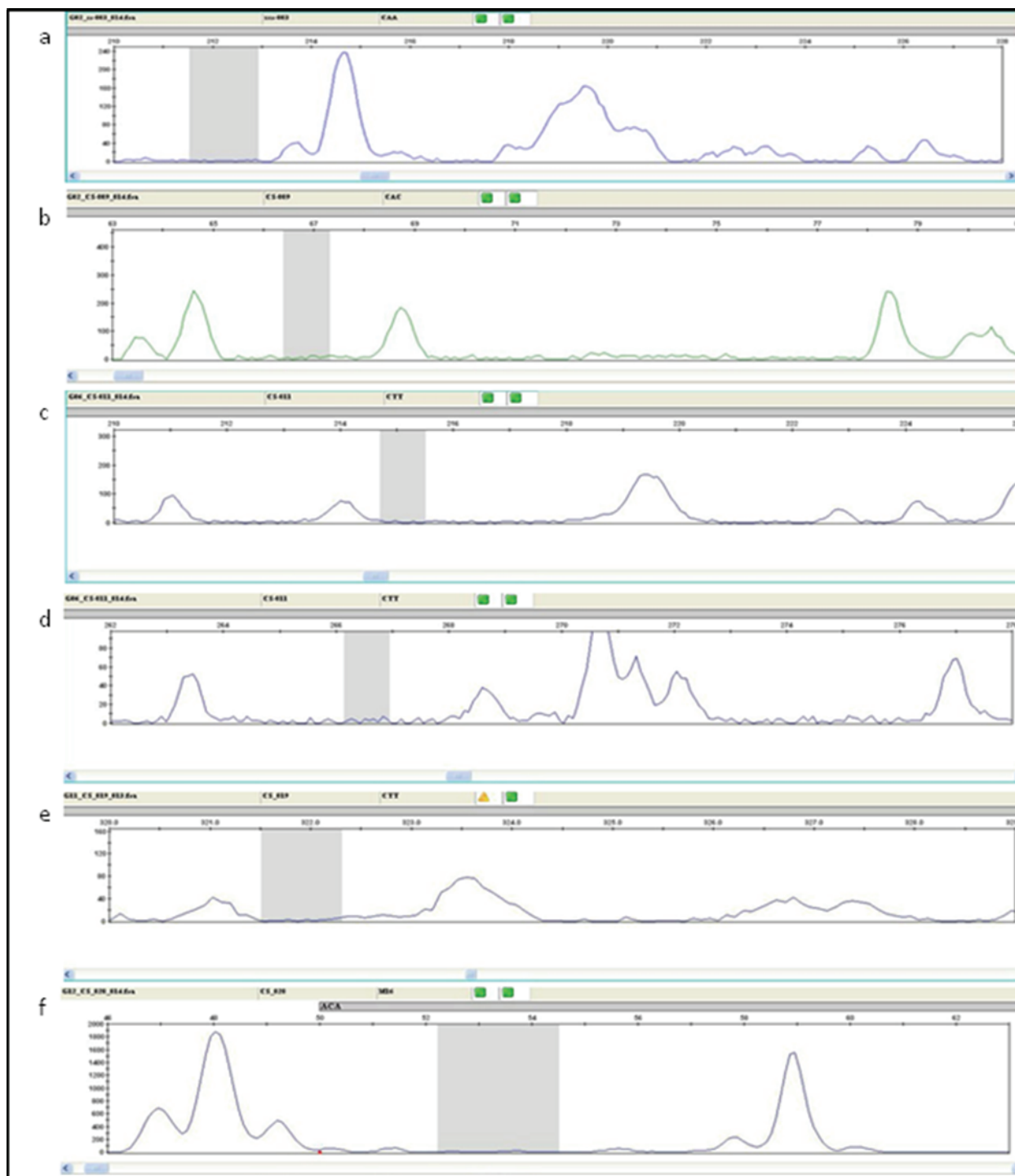




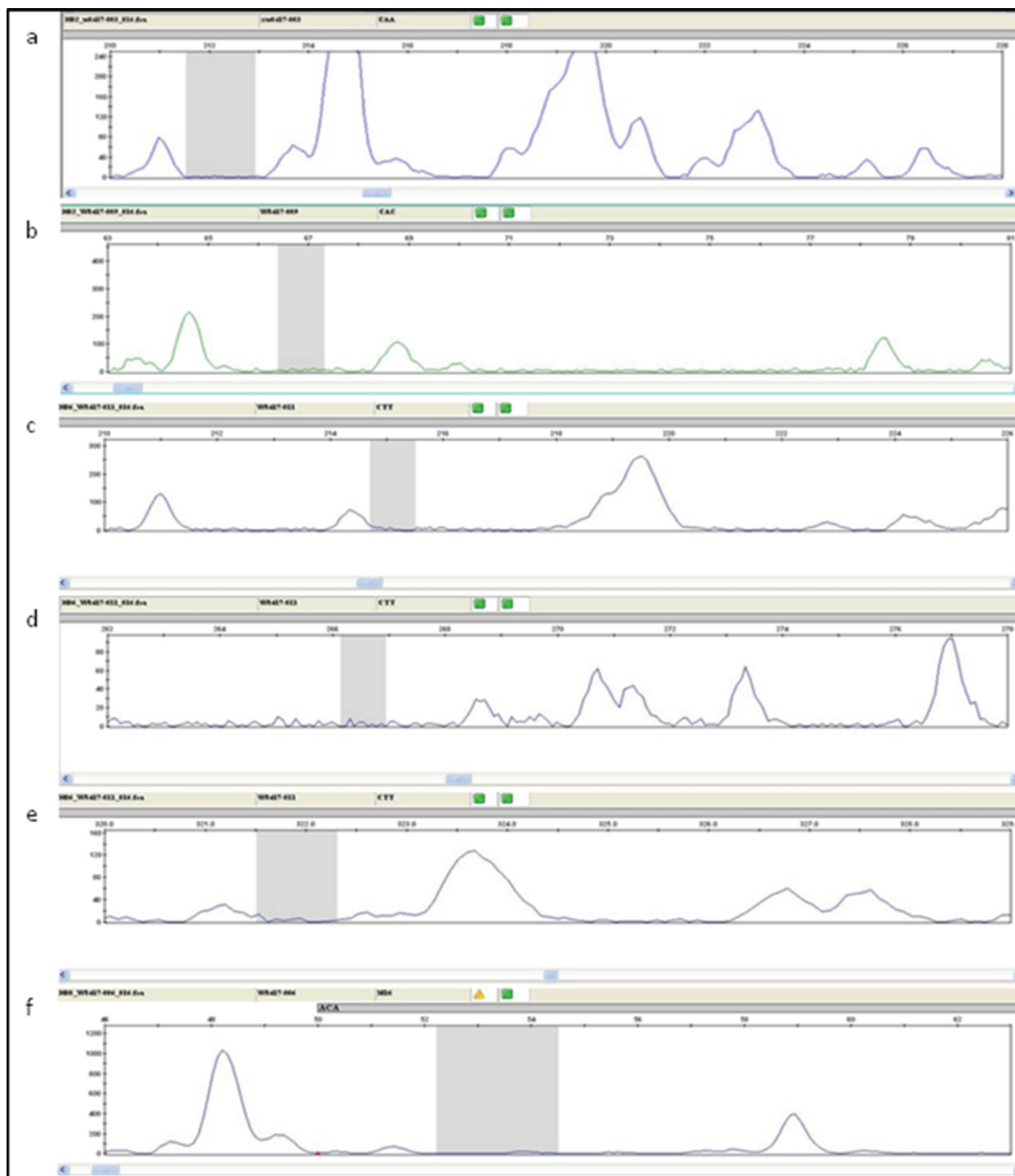
**Figuur 6.2-36:** Die F<sub>1</sub>-verhaalde F<sub>2</sub>-nageslag van monster 187 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



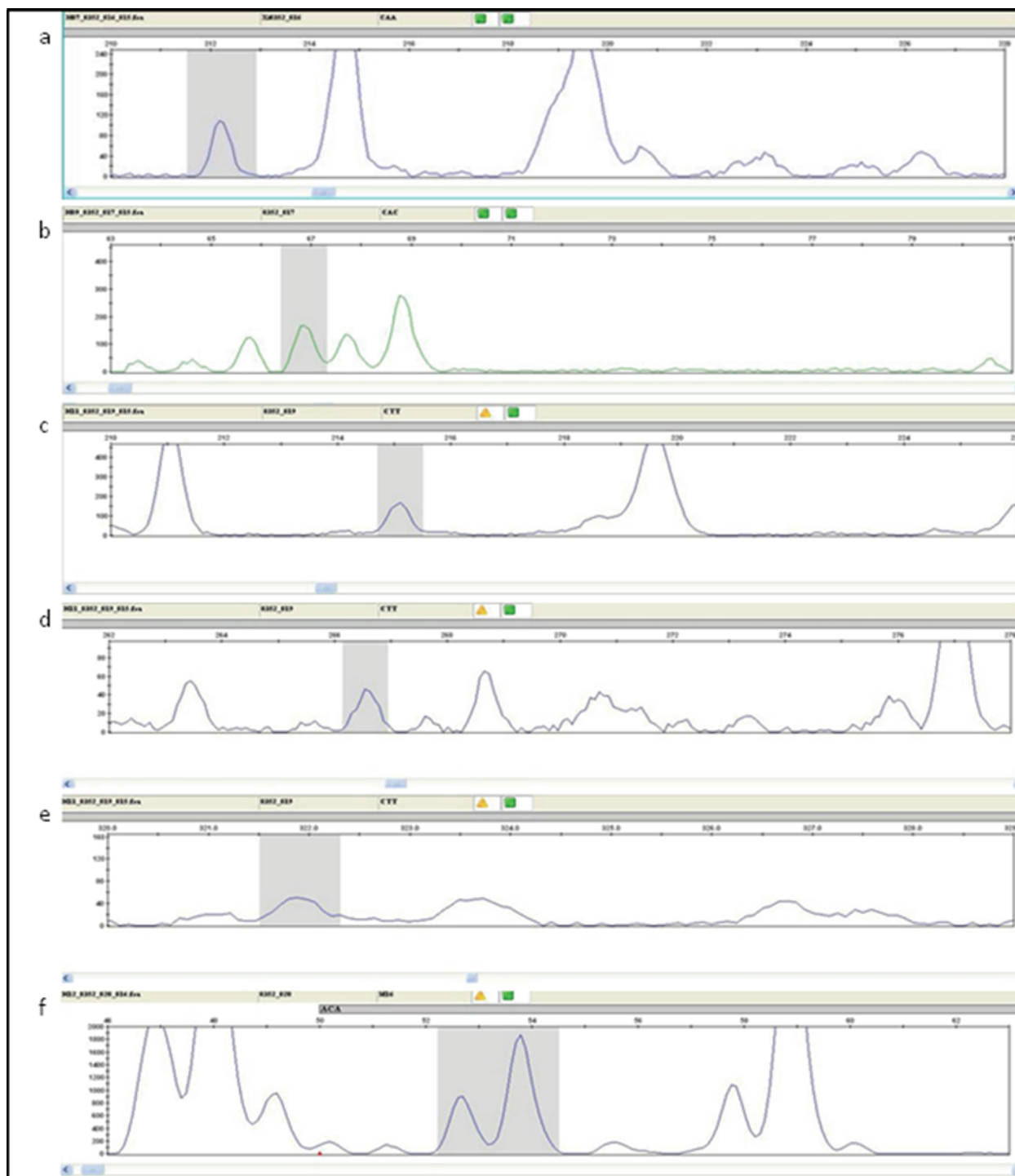
**Figuur 6.2-37:** Die  $F_1$ -verhaalde  $F_2$ -nageslag van monster 193 se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



**Figuur 6.2-38:** ‘CS’ kontrole se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



**Figuur 6.2-39:** W84-17 kontrole se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.



**Figuur 6.2-40:** 0352-4 kontrole se AFLP-resultate verkry met die inleier-kombinasies soos in Tabel 6.2-1 weergegee.