

**Karakterisering van derivate uit 'n *Thinopyrum distichum*
X tetraploïede rog kruising**

Johan Adolf Jacobs



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

Studieleier: Prof G.F. Marais

Maart 2002

Verklaring

Ek, die ondergetekende, verklaar hiermee dat die werk in hierdie tesis vervat, my eie oorspronklike werk is wat nog nie voorheen in die geheel of gedeeltelik by enige ander Universiteit ter verkryging van 'n graad voorgelê is nie.

J.A. Jacobs

OPSOMMING

Versouting is een van die groot beperkende faktore op plant- en gewasgroei, omdat die opname van water en voedingstowwe so 'n ingewikkelde proses is en die effek van lae of matige versouting so alomteenwoordig is. Plantgroei word nadelig geaffekteer as 'n spesifieke ionkonsentrasie sy drempelwaarde oorskry en toksies word. Die nadelige effek van soutgeaffekteerde grond op gewasproduksie, is wêreldwyd aan die toeneem (Tanji, 1990). Die vlak waartoe plante hoë konsentrasies sout kan hanteer is onder genetiese beheer met verskeie fisiologiese en genetiese meganismes wat 'n bydrae maak tot soutverdraagsaamheid (Epstein & Rains, 1987). Die mees effektiewe manier om die beperkinge op gewas produktiwiteit in versoute gebiede te oorkom, is die ontwikkeling van soutverdraagsame variëteite. Begrip van die genetika van soutverdraagsaamheid is dus noodsaaklik vir die ontwikkeling van 'n effektiewe telingsstrategie.

Die departement Genetika (US) bedryf tans 'n wye-kruisings navorsingsprogram waarmee gepoog word om gene vir soutverdraagsaamheid na korog en koring oor te dra. Die skenkerspesie, *Thinopyrum disticum*, 'n inheemse strandkoringgras wat aangepas is by hoë konsentrasies sout, is gekruis met verboude rog (*Secale cereale*) in 'n poging om die oorerwing van soutverdraagsaamheid te bestudeer (Marais et al., 1998).

Die hoofdoel van hierdie studie was om molekulêre merkers (RAPD en AFLP) te vind, wat assosieer met chromosome wat soutverdraagsaamheid bevorder en om nuttige merkers daar te stel vir latere pogings om die gene na korog en koring oor te dra. Ongeveer 70 klone van sekondêre hibriede (*Th disticum* / 4x-rog // 2x-rog) is onderwerp aan souttoetse en het verskillende grade van soutverdraagsaamheid getoon. RAPD-merker analise is gebruik om polimorfismes te identifiseer tussen soutverdraagsame en soutsensitiewe plante. Twaalf RAPD inleiers het duidelike, ontleedbare en herhalende polimorfiese fragmente opgelewer en moontlike nuttige merkers uitgewys. Verskillende AFLP-inleier kombinasies, wat getoets is teen die genotipes van 15 klone (Marais & Marais, 2001 ongepubliseerde data) het ongeveer 2000 duidelik onderskeibare AFLP fragmente geproduseer, waarvan 54 (3%) polimorfiese fragmente was. Twee RAPD fragmente en 4 AFLP fragmente is geïdentifiseer wat as moontlike kandidaat merkers gebruik kan word vir die identifisering van chromosome wat bydra tot soutverdraagsaamheid.

Die interpretasie van die merkers is bemoeilik deur heterogeniteit tussen die plante wat betref die agtergrond van chromosome wat hulle besit en die genetiese diversiteit van die rog genoom. Dit is ook moontlik dat chromosoom herrangskikking plaasgevind het tydens terugkruising, wat die data verder kon kompliseer.

ABSTRACT

Soil salinity is a major limiting factor of plant and crop growth, because the absorption of water and nutrients is such a complex process while low and moderate salinity are omnipresent. Plant growth is affected negatively if a specific ion concentration exceeds its threshold and becomes toxic. The detrimental effect of soil affected by salt on crop production is increasing worldwide (Tanji, 1990). The level to which plants can tolerate high salinity levels is genetically controlled with several physiological and genetic mechanisms contributing to salt tolerance (Epstein & Rains, 1987). The most effective way of addressing the limitations of crop productivity in saline areas, is the development of salt tolerant varieties. Understanding the genetics of salt tolerance is, therefore, necessary for the development of an effective breeding strategy for salt tolerance.

The department of Genetics (US) conducts a wide crosses research programme aiming to transfer genes for salt tolerance to wheat and triticale. The donor species, *Thinopyrum disticum*, an indigenous coastal wheat grass, adapted to high concentrations of salt, was crossed with cultivated rye (*Secale cereale*) in an attempt to study the genetics of salt tolerance (Marais et al., 1998).

The primary goal of this study was to find molecular markers (RAPD and AFLP) which associate with chromosomes promoting salt tolerance for later attempts to transfer the genes to triticale. Seventy clones of secondary hybrids (*Th disticum* / 4x-rye // 2x-rye) were tested for salt tolerance and showed different levels of salt tolerance. RAPD-marker analyses were used to identify polymorphisms between salt tolerant and salt sensitive plants. Twelve RAPD primers produced clear, analyzable and repetitive polymorphic fragments that can be used as useful markers. Different AFLP-primer combinations were tested against the genotypes of 15 clones (Marais & Marais 2001, unpublished data) and produced approximately 2000 clearly distinguishable AFLP fragments, of which 54 (3%) were polymorphic fragments. Two RAPD fragments and 4 AFLP fragments that can be used as possible markers for the presence of chromosomes that contribute to salt tolerance were identified.

The interpretation of the markers was complicated by heterogeneity among plants with regard to the origin of their chromosomes and the genetic diversity of the rye genome. It is

also possible that chromosome re-arrangement took place during backcrossing, which could have complicated the data.

Vir my Ma en Pa

BEDANKINGS

Hiermee wil ek graag my dank uitspreek teenoor die volgende individue en organisasies:

- Prof. G.F. Marais, studieleier, vir sy leiding, ondersteuning en deurgaanse geduld.
- Mev. A.S. Marais en mnre. Herman Roux, Stanley Pretorius en Charles Toutie vir hul hulp en vriendskap.
- Die Nasionale Navorsingstigting (NNS) en Wintergraantrust vir befondsing.
- My familie en vriende vir hul liefde en ondersteuning.

LYS VAN AFKORTINGS

°C	Grade Celsius
µl	mikroliter
ABA	Absissiensuur
AFLP	Geamplifiseerde Fragment Lengte Polimorfisme
AP-PCR	Lukrake inleier polimerasekettingreaksie
ATP	Adenosien trifosfaat
bp	basispaar
Ca ²⁺	Kalsium
cm	sentimeter
Cl ⁻	Chloried
DAF	DNA-amplifikasie vingerafdrukke
dm	desimeter
DNA	Deoksiribonukleïensuur
dNTP	Deoksinukleotied trifosfaat
dS/m	Desi-siemens per meter
E	Eenheid
EC	Elektriese konduktiwiteit
EDTA	Etileendiamientetra-asynsuur
g	gram
H ⁺	Waterstof
ha	hektaar
K ⁺	Kalium
l	liter
M	Molaar
mg	milligram
Mg ²⁺	Magnesium
min	minuut
ml	milliliter

mm	millimeter
mM	millimolaar
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchloried
ng	nanogram
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfaat
PKR	Polimerase ketting reaksie
pmol	pikomol
QTL	Kwantitatiewe-kenmerk-lokuse
RAPD	Lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNA
RFLP	Restriksie-ensiem-fragment-lengte-polimorfisme
rpm	revolusies per minuut
sek	sekonde
SO ₄ ²⁻	Sulfaat
Taq DNA pol	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
TBE-buffer	Tris boraat EDTA buffer
<i>Th.</i>	<i>Thinopyrum</i>
Tris	2-amino-2-(hidroksiemetiel)-1,3-propandiol
TWV	Totale waterverlies
US	Universiteit van Stellenbosch

1.	LITERATUUR OORSIG	1
1.1	Inleiding	1
1.2	Sout-geaffekteerde grond	2
1.2.1	Die verspreiding van sout-geaffekteerde grond	3
1.3	Fisiologiese kompleksiteit van soutverdraagsaamheid	4
1.3.1	Die effek van sout op plantgroei	5
1.3.2	Water verhoudings	6
1.3.3	loos opname en vervoer	7
1.3.3.1	Osmotiese verstelling	8
1.3.3.2	Kompartementering van ione	9
1.3.3.3	loos uitsluiting	11
1.3.3.4	K^+ Na^+ /diskriminasie en die rol van Ca^{2+}	12
1.3.3.5	Hormonale verstelling	12
1.4	Natuurlike omgewing	13
1.5	Morfologiese aanpassing	13
1.6	Bykomstige meganismes wat soutverdraagsaamheid verhoog	14
1.7	Genetiese kompleksiteit van soutverdraagsaamheid	14
1.8	Teling vir soutverdraagsaamheid	15
1.8.1	Geen-oordrag deur wye hibridisasie in die tribus Triticeae	16
1.8.2	Soutverdraagsaamheid in die tribus Triticeae	19
1.9	Tempo van waterverlies	19
1.10	Die Triticeae	20
1.10.1	Die genus <i>Thinopyrum</i>	20
1.10.1.1	<i>Thinopyrum distichum</i>	21
1.10.2	<i>Secale cereale</i> (verboude rog)	23
1.11	Molekulêre merkers vir die seleksie van soutverdraagsaamheid	24
1.11.1	RAPD-merkers	25
1.11.2	AFLP-merkers	26
1.12	Apomiksie	27
1.13	Kruising van <i>Thinopyrum distichum</i> en tetraploïede rog	29
1.14	Doelstelling	31
2.	MATERIAAL EN METODEDES	32
2.1	Plant materiaal	32

2.2	Soutverdraagsaamheid van die <i>Thinopyrum distichum</i> tetraploïede rog hibried en terugkruisingsderivate	33
2.2.1	Ontkieming en voorbereiding van die T ₁ F ₁ - en F ₂ -plante vir souttoetsing en DNA-ekstraksie (Populasie A)	33
2.2.2	Soutverdraagsaamheidstoets	34
2.3	Chromosoomtellings op T ₁ F ₁ -plante (Populasie A)	35
2.4	DNA-ekstraksie van die T ₁ F ₁ - en F ₂ -plantmateriaal (Populasie A en B)	36
2.5	Analise van lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNAs (RAPD Populasie A en B)	37
2.5.1	Inleiers	37
2.5.2	Amplifikasie	39
2.6	Analise van geamplifiseerde fragment lengte polimorfisme (AFLP Populasie B)	39
2.6.1	Inleiers	40
2.6.2	Amplifikasie	40
2.7	Blaar waterretensie as 'n seleksie maatstaf vir soutverdraagsaamheid (Populasie A)	41
	Korrelasie analises.	42
3.	RESULTATE	42
3.1	Karakterisering van T ₁ F ₁ - en F ₂ -plante ten opsigte van soutverdraagsaamheid en chromosoomtellings (Populasie A).	43
3.2	Blaarwaterretensie	44
3.3	Identifisering van molekulêre merkers vir <i>Thinopyrum</i> chromosome wat bydra tot soutverdraagsaamheid	48
3.3.1	RAPD analises van die T ₁ F ₁ - en F ₂ -plante (Populasie A)	48
3.3.2	Korrelasie analises	53
3.3.3	AFLP analises van Populasie B	54
3.3.4	RAPD analises van Populasie B	58
4.	BESPREKING	61
4.1	Karakterisering van T ₁ F ₁ - en F ₂ -plante (Populasie A)	61
4.1.1	Evaluering van T ₁ F ₁ - en F ₂ -plante ten opsigte van sout-	

	verdraagsaamheid	61
4.1.2	Identifisering van RAPD-merkers ten opsigte van soutverdraagsaamheid	62
4.2	Korrelasie tussen soutverdraagsaamheid en blaarwaterretensie van Populasie A	63
4.3	Identifisering van molekulêre merkers vir <i>Thinopyrum</i> chromosome met gene vir soutverdraagsaamheid (Populasie B)	64
4.3.1	Karakterisering van Populasie B ten opsigte van AFLP-merkers	64
4.3.2	Karakterisering van Populasie B ten opsigte van RAPD-merkers	66
5.	GEVOLGTREKKING	68
6.	VERWYSINGSLYS	69

1. LITERATUUROORSIG

1.1 Inleiding.

“ The increasing use of water of poor quality, the continuous addition of waste salts to our environment, as well as increasing contamination of underground water sources lead to gradual soil salinization. Soberly analyzing the consequences of such a process, one must reach the conclusion that the future of plants lies with some group of halophytes.”

Yoav Waisel 1972.

Ons wêreld verdwyn rondom ons. As gevolg van reën word die aardoppervlakte stadig opgelos en spoel weg in die oseane. Soute van natrium, kalsium, magnesium, chloried, sulfaat, karbonaat en vele ander elemente vorm wanneer water vanaf die grond na riviere, mere en uiteindelik die see vloei. Die water en die opgeloste soute is noodsaaklik vir plantgroei, maar die hergebruik van die water en die hoë verdampingstempo van droë en semi-droë klimaatstreke konsentreer die soute, sodat versouting plaasvind (Batie & Healy, 1983; Boyer, 1982).

Versouting is een van die groot beperkende faktore op plant- en gewasgroei omdat die opneem van water en voedingstowwe so 'n ingewikkelde proses is, en die effek van lae of matige versouting, so alomteenwoordig is. Plantgroei word nadelig geaffekteer as spesifieke ion konsentrasies hul drempelwaarde oorskry en toksies word. Sout strem ook plantgroei deur die vermindering van waterpotensiaal en belemmering van voedingstof inname. Die konsentrasies waarby hierdie effekte plaasvind verskil met die genetiese kapasiteit van die spesie, groeifase, omgewings interaksies en die spesifieke ion (Epstein, 1985; Shannon, 1990). Plante kan oorleef in oseane, versoute moerasse en semi-droë woestyne. Plante het aangepas by hoë natrium omgewings en alkaliese vlaktes en om te oorleef in habitate met hoë konsentrasies van magnesium, chloried, sulfate en karbonate, maar verboude gewasse, met 'n paar uitsonderings, groei optimaal by lae konsentrasies soute rondom die wortelarea. In die algemeen kan soute konsentrasies hoër as 4 dS/m die opbrengs van die gewas verminder (Shannon et al., 1994).

Geskiedkundig het slegte bestuur van besproeiings landbou en sout sensitiwiteit van verskillende gewasse bygedra tot die verdwyning van Ou en Nuwe Wêreld beskawings (Shannon, 1987; Jacobsen & Adams, 1958). Ten spyte hiervan, word daar steeds 'n toenemende proporsie van die wêreld se voedsel in semi-droë landstreke onder besproeiing verbou. Die wêreldbevolking neem voortdurend toe en die beskikbaarheid van waterbronne van hoë gehalte word net minder.

Dit is dus nodig om biologiese en tegnologiese oplossings vir die fisiologiese beperkings op gewas-produktiwiteit te vind. Die tegnologiese benadering is om grondbestuur en besproeiing te verbeter (Pasternak, 1982). Die biologiese benadering behels die seleksie en verbetering van die gewas deur benutting van die natuurlike variasie vir agronomiese aanpasbaarheid (O'Leary, 1984). Die mees effektiewe manier om gewas produktiwiteit in sout-geaffekteerde grond te verbeter is die ontwikkeling van soutverdraagsame tipes, 'n kenmerk wat geneties beheer word. Die hedendaagse neiging is om soutverdraagsame gewas-genotipes te teel deur die genetiese agtergronde van soutverdraagsame wilde spesies en verboude gewasse te integreer (Norlyn, 1980; Shannon 1984).

1.2 Sout-geaffekteerde grond.

Sout-geaffekteerde gronde besit 'n hoë persentasie oplosbare soute en een of meer van hierdie sout-komponente is gewoonlik in oormaat teenwoordig. Daar is twee tipes sout-habitatte, nat en droog. Die nat habitat is gewoonlik die see-agtige moerasse wat die see begrens, en wat onderworpe is aan periodiese oorstromings, sodat die soutinhoud baie sal wissel. Die droë habitatte is binnelands en begrens gewoonlik woestyne. Ander sout-geaffekteerde gronde is droë soutpanne en sandduine langs die kuslyn waar konstante seesproei 'n belangrike rol speel. Die plantegroei van die sout-geaffekteerde habitatte is halofiete (plante wat natuurlik aangepas is vir oorlewing in omgewings met hoë sout konsentrasies) en word onderskei van glikofiete (plante wat nie natuurlik kan oorleef in die aanwesigheid van oormaat soute). Feitlik alle moderne gewasse het ontstaan vanaf glikofiete. Halofiete in die soute-omgewing word nie net blootgestel aan soutedruk nie maar ook aan osmotiese en lae-suurstof-druk. Ons stel om drie redes in halofiete belang: (i) 'n suiwer wetenskaplike en teoretiese belangstelling om te verstaan hoe hulle spesifiek aangepas is by soutedruk en die meganismes wat hulle gebruik om produktiwiteit te behou.

Dit kan gebruik word om 'n klein stel van aanpassings te identifiseer wat nodig is vir soutverdraagsaamheid. Die kennis kan planttelers en molekulêre bioloë help wat op konvensionele gewas-plante werk (Bohnert et al., 1995), (ii) halofiete wat in 'n landbou omgewing groei kan gebruik word om die uitvoerbaarheid van hoë-sout landbou te evalueer (Miyamoto, 1996), (iii) halofiete kan 'n direkte bron van nuwe gewasse word (Aronson, 1989). Dit sal alles help met die seleksie en ontwikkeling van gewasse wat meer soutverdraagsaam kan wees.

1.2.1 Die verspreiding van sout-geaffekteerde grond.

Omdat meeste gewasse in grond groei, het die eienskappe van die grond 'n belangrike invloed daarop. Plant-ontwikkeling en suksesvolle gewas-produksie vereis geskikte grondtoestande, met genoeg water en voedingstowwe. Ongunstige grondtoestande het 'n nadelige uitwerking op die lewensiklus van plante en kan die effektiewe produksie van gewasse ernstig strem



Figuur 1.1 Wêreld-verspreiding van sout-geaffekteerde gronde.

Southoudende grond is baie algemeen, omtrent 7% van die wêreld grondoppervlakte is sout geaffekteerd en van die bewerkte grond (14 biljoen ha) is 6.0 biljoen ha droog of semi-droog en 1.0 biljoen ha geaffekteer deur oortollige sout (Christiansen, 1982).

Belangriker is dat 20% van besproeiingsgrond ly aan sekondêre versouting (Ghassemi et al., 1995) en 50% van besproeiingskemas sout-geaffekteerd is (Szabolcs, 1991).

Table 1.1 Voorkoms van sout-geaffekteerde grond op die kontinente en subkontinente van die wêreld (Kovda & Szabolcs, 1979).

Kontinent	Area (miljoen ha)
Noord-Amerika	15.7
Mexiko en Sentraal-Amerika	2.0
Suid-Amerika	129.2
Afrika	80.5
Suid Asië	87.6
Noord en Sentraal Asië	211.7
Suidoos Asië	20.0
Australasië	357.3
Europa	50.8
Totaal:	954.8

Sout-geaffekteerde grond kan in droë of semi-droë klimaatstreke of op die kuslyn voorkom, waarheen sout vervoer word deur grondwater en presipitasie. Die bestuur van sout-geaffekteerde grond is dus van groot belang vir die produksie van voedsel en vesel. In sekere lande speel southoudende grond 'n sleutelrol in landbou. In Pakistan, wat hoofsaaklik afhanklik is van besproeiing vir voedsel-produksie en 'n vinnig-groeiende populاسie het, is omtrent 'n kwart van die beproeiingsgrond sout-geaffekteerd (Ahmad, 1990; Ghassemi et al., 1995). Tabel 1.1 en Figuur 1.1 wys dat daar nie 'n kontinent of subkontinent is wat nie deur sout geaffekteer word nie.

1.3 Fisiologiese kompleksiteit van soutverdraagsaamheid.

Die studie van die meganisme van soutverdraagsaamheid van plante kan uiteindelik lei tot gewasse met verbeterde vermoë om op soutgronde te groei. Dit is ook waardevol omdat dit kan lei tot nuwe insigte in die fundamentele prosesse van ioon-vervoer, ioon-ophoping en ioon-regulering oor die plasmamembraan. Alhoewel ander ione soos SO_4^{2-} en Mg^{2+} ook

bydra tot soutdruk, word die toksiese effek van Na^+ en Cl^- as belangriker geag (Flowers & Yeo, 1986). Ongeag die vele studies van plant-reaksies op soutdruk, weet ons nog baie min van die spesifieke genetiese basis en fisiologiese meganismes wat bydra tot soutverdraagsaamheid (Cheeseman, 1988; Dracup, 1991). Baie basiese fisiologiese eienskappe is al geïdentifiseer as belangrike komponente van soutverdraagsaamheid bv. direkte beheer oor die instroming en uitstroming van ione soos Na^+ en K^+ oor die plasmamembraan en tonoplast (Jeschke, 1984; Flowers & Yeo, 1986; Yang et al., 1990); sintese van verenigbare osmotikums soos prolien, ander aminosure, oplosbare koolhidrate en glisien betane (Jones & Storey, 1981; Sumaryati et al., 1992); en modifikasie van membraan samestelling (Kuiper, 1984,1985; Hirayama & Mihara, 1987; Peeler et al., 1989; Blits & Gallagher, 1990). Halofiete, oor die algemeen, kompartementeer Na^+ en Cl^- binne die sel-vakuole en reguleer ook ion-vervoer oor beide die plasmamembraan en die tonoplast (Flowers et al., 1977,1990; Flowers, 1985, Flowers & Yeo, 1986).

Dit is duidelik dat ion-vervoer en -regulering 'n groot rol speel in soutverdraagsaamheid (Kramer, 1984; Flowers & Yeo, 1986), en dat die verdraagsaamheid van plante t.o.v. oortollige sout, komplekse en hoogs geïntegreerde reaksies op sellulêre, sub-sellulêre en interorganiese vlak behels (Epstein & Rains, 1987; Cheeseman, 1988; Yeo & Flowers, 1989; Claes et al., 1990; Adams et al., 1992).

1.3.1 Die effek van sout op plantgroei.

Soutverdraagsaamheid beteken die vermoë van plante om goed te kan groei in soutgeaffekteerde gronde. Dit is duidelik dat hoë grond soutkonsentrasies groei inhibeer in meeste plante, maar sout toestande affekteer plantgroei op verskeie maniere nl. (i) vermindering van wateropname in die plant, (ii) die ophoping van ione tot toksiese vlakke en (iii) verminderde beskikbaarheid van voedingstowwe. Die klassieke definisie van groei is, "die onomkeerbare verhoging van weefsel volume" (Thimann, 1977). Dit kan gebeur deur selontwikkeling of selverdeling. Wanneer die sout konsentrasie van die grondoplossing verhoog en die waterpotensiaal verlaag, sal die selwanddruk verminder en die selle sal uiteindelik ophou om te verdeel en te verleng. Onder hierdie toestande van waternood sal die huidmondjies sluit wat 'n vermindering in fotosintese tot gevolg sal hê. Die afbreek tempo van proteïene sal verhoog word en die plante sal swak of negatiewe groei en verminderde biomassa toon (Ashraf, 1994).

Versouting affekteer ook noodsaaklike fasette van plant-metabolisme nl. (i) osmotiese aanpassing (Crammer et al., 1990), (ii) opneem van voedingstowwe (Yang et al., 1990), (iii) proteïen en nukleïensuur sintese, (iv) fotosintese (Hsiao, 1973), (v) ophoping van opgeloste organiese stowwe, (vi) ensiem en hormonale aktiwiteite en balans (Pilet, 1983), (vii) weefsel beserings en (viii) verandering in respiratoriese tempo (Alam, 1994).

Sout affekteer plantgroei verskillend op verskillende groeifases en in verskillende dele van die plant (Lunin et al., 1963). Rys is byvoorbeeld baie gevoelig vir sout tydens die saailing- en blomstadium (Akbar & Yabuno, 1977) en suikerbeet is weer meer verdraagsaam in latere groeistadia maar is baie gevoelig tydens ontkieming (Beatty & Ehlig, 1973). Sout affekteer ook die groei van die wortels minder as die van die stingels en blare (Robinson et al. 1983). Die eerste reaksie van die plant op sout is die vermindering van blaargroei a.g.v. verminderde osmotiese potensiaal (Munns, 1994). Nuwe blaargroei word aangehelp deur die uitvoer van koolstof vanaf die volwasse blare. Soos die ouer blare doodgaan (tweede reaksie fase) as gevolg van sout-geïnduseerde blaar nekrose (ioon-toksiseiteit), verminder die kapasiteit van die nuwe blaar om die verhoogde-sout konsentrasie, vanaf die wortels, te hanteer (Volkmar et al., 1998). Die plant sal nou vinnig ingee, want die kapasiteit vir kompartementering van ione neem baie af. In kort, die plant sal doodgaan want die tempo waarteen die blare doodgaan is hoër as waarteen nuwe blare kan groei. Dit is dus belangrik om kort- en lang-termyn effekte van sout te onderskei. Kort-termyn effekte is gewoonlik die gevolg van osmotiese druk (verminderde blaargroei) eerder as ioniese toksiseiteit. By lang-termyn effekte van sout oorheers die ion-toksiseiteit en die druk wat osmotiese verstelling op die koolstof bron plaas (Cramer, 1994).

1.3.2 Water verhoudings.

Die balans tussen water en sout in hoër plante is sentraal in die daarstelling van soutverdraagsaamheid (Shannon et al., 1995). Water beslaan omtrent 80% van plantweefsel en word benodig as 'n fisiologiese oplosmiddel, vervoermiddel vir voedingstowwe, verdampende verkoelmiddel, 'n fisiese drukbron (selwandspanning) vir vorm en funksie van die plantsel en die dryfkrag tot groei (Shannon et al., 1993). Plante verkry feitlik al hul water vanaf die grondoplossing deur die wortels, maar het baie min beheer oor die water en ion konsentrasie van die grond. Die water en geselekteerde opgeloste stowwe beweeg vanaf die grond deur die plant as gevolg van die verskil in osmotiese potensiaal tussen die grond, wortels, blare en die atmosfeer. Feitlik al die water wat deur die plant

opgeneem is verdamp weer by die blaar oppervlakte en net 'n klein fraksie word deel van die permanente plant struktuur. Die hoeveelheid water in 'n plant op 'n spesifieke tyd is klein vergeleke met die hoeveelheid wat in die plant se leeftyd vanaf die wortel na die loof deurbeweeg.

Die grond-wortel osmotiese gradiënt is die hoofkrag agter die absorpsie van water deur die plant. Soos water deur die plant beweeg, as gevolg van sy potensiaalgradiënt, so filter sout deur die biologiese membrane van die plant by wyse van verskillende aktiewe en passiewe vervoer-meganismes (Volkmar et al., 1998). Die meganisme van ioon-vervoer verskil baie (Glass, 1983), en die ioon-konsentrasie wat noodsaaklik is vir normale sellulêre fisiologiese prosesse is baie klein.

1.3.3 Ioon opname en vervoer.

Ioon-vloei oor plant membrane is afhanklik van die elektriese gradiënt of membraan potensiaal en die chemiese gradiënt oor die membraan (Noble, 1991). Vervoer-proteïene betrokke by ioon-vloei kan deel vorm van pompe, draers en kanale. Pompe gebruik metaboliese energie direk vir rigtingspesifieke vervoer, terwyl draers weer gekenmerk word deur die opdraande vloei van een oplossing en die afdraande vloei van 'n ander. By kanale is die vloei passief volgens die vrye energie gradiënt.

Natrium beweeg passief vanaf die omgewing na die sitosol van die plantsel vanweë 'n elektrochemiese potensiaalgradiënt van Na^+ en die teenwoordigheid van deurlaatbare Na^+ kanale in die plasmamembrane (Baker & Hall, 1988). Die spesifieke kanale is nie bekend nie, maar daar word vermoed dat Na^+ met K^+ kompeteer vir K^+ -draers en ander kationkanale (Rubio et al., 1995, Schachtman & Schroeder, 1994, Schachtman et al., 1991). Die invloed veroorsaak nie net gevaarlike vlakke van Na^+ in die plant nie, maar verhinder ook die opname van K^+ . Die teenoorgestelde geld vir Cl^- wat opgeneem word deur 'n aktiewe vervoer sisteem, maar die sel passief kan verlaat. Wanneer plante blootgestel word aan 'n oormaat NaCl , verminder die apoplastiese waterpotensiaal en ione akkumuleer in die sitosol (Benzel et al., 1988). Die plantselle pas osmoties aan deur die sintese van verenigbare, organiese, opgeloste stowwe en die ophoping van ione vanuit die eksterne omgewing. Genotipes wat goed aangepas is teen soutedruk, reguleer ioon-opname oor die plasmamembraan teen 'n tempo wat verenigbaar is met die kapasiteit van die vakuole om sout te kompartementeer (Binzel et al., 1988). Dus, die transport-meganismes in die

membrane wat die invloei en uitvloei van ione reguleer, veral die wat betrokke is by die Na^+ -opname en kompartementering van NaCl in vakuole, is van kritieke belang vir aanpassing by soutstremming (Volkmar et al., 1998). Die membrane van belang is, (i) die plasmalemma van die wortelkorteks en die epidermale selle, waar ione en water die plant binnegaan, (ii) die tonoplast van die wortel- en loofsel vakuole en (iii) die plasmalemma van die xileem- en parenchiemaselle wat die skeiding tussen die wortel en loof beheer.

1.3.3.1 Osmotiese verstelling.

Met verhoogde soutkonsentrasies sal die lae osmotiese potensiaal van die grond-sout oplossings dit noodsaaklik maak vir die plante om 'n laer intrasellulêre osmotiese potensiaal te handhaaf anders sal die plante osmotiese uitdroging ondervind, want die water sal osmoties uit die selle na die grond beweeg (Maas & Nieman, 1978; Greenway & Munns, 1980; Flowers et al., 1977). Omdat die groei van selle primêr korreleer met selwanddruk, sal verlaagde osmotiese potensiaal, wat verlaagde selwanddruk veroorsaak, die hoofrede wees vir verminderde plantgroei by hoë soutkonsentrasies (Ashraf, 1994).

Die sitoplasma kan so min soos 1% van die selvolume beslaan (Winter et al., 1993) en dit is uiters sensitief vir die kleinste verandering in sout vervoer na die sel. Die verskuiwing van sout vanaf die sitoplasma na die vakuool veroorsaak 'n sterk osmotiese gradiënt oor die vakuoliese membraan. Hierdie gradiënt word gebalanseer met verhoogde sintese van oplosbare molekules in die sitoplasma, 'n proses wat osmotiese verstelling genoem word (Wyn Jones & Gorham, 1983; McCue & Hanson, 1990). Osmotiese verstelling word beskou as 'n belangrike aanpassing van plante by versouting, want dit help om selwanddruk en selvolume vir groei te handhaaf. Talle van hierdie verenigbare opgeloste stowwe is al geïdentifiseer, hulle het feitlik almal dieselfde eienskappe nl., 'n lae polêre lading en hoë oplosbaarheid (Paleg et al., 1985). Hierdie opgeloste stowwe stabiliseer ook die aktiewe konformasie van die sitoplasmiese ensieme, en beskerm dus die ensieme teen anorganiese ione (Pollard & Wyn Jones, 1979; Smirnov et al., 1990). Die lae molekulêre massa, organiese komponente sluit in prolien (Shen et al., 1994), glisien-betaan (Gorham et al., 1985; Storey & Wyn Jones 1975) en ander verwante kwaterneë ammonium-komponente (Hanson & Burnet, 1994), pinitol (Thomas & Bohnert, 1993), mannitol (Everard et al., 1994) en sorbitol (Briens & Lahrer, 1983). Die verhoging van soutverdraagsaamheid deur osmotiese verstelling is waargeneem in gars en mielies (Grumet & Hanson, 1986) en *Th. bessarabicum* (Gorham et al., 1985). 'n Wye reeks

sellulêre prosesse word negatief geaffekteer deur die oksiderende effek van vry radikale, wat ontstaan as 'n reaksie op verhoogde soutinhoud (Lewis et al., 1997). Die plant word beskerm teen die oksidasie deur vry radikale deur oplosbare molekules, soos mannitol (Shen et al., 1997).

Die produksie van genoeg verenigbare, opgeloste stowwe is metabolies baie duur en dit gebruik groot hoeveelhede koolstof wat andersins vir groei gebruik kon word (Greenway & Munns, 1980). Osmotiese verstelling mag 'n aanpassing wees waarmee 'n plant kan oorleef onder soutedruk, maar ten koste van groei (die gevolg van ioniese toksisiteit, ioon-tekort en fisiologiese prosesse).

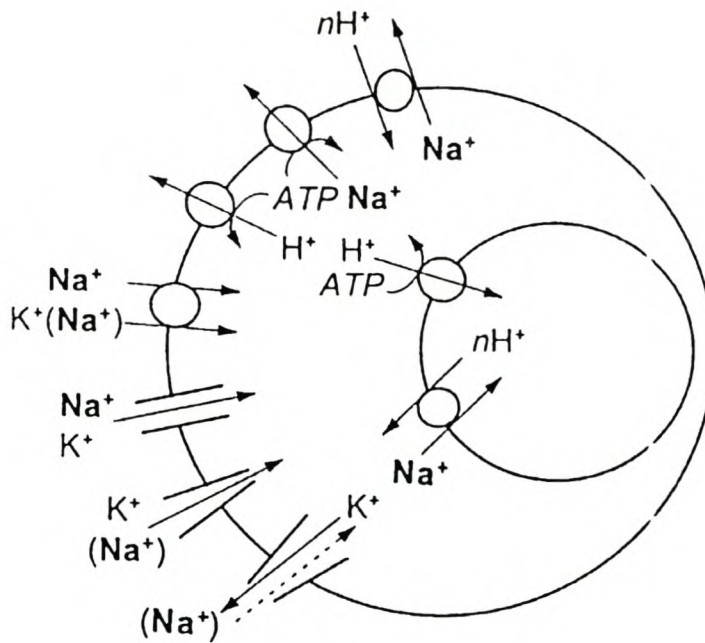
1.3.3.2 Kompartementering van ione.

Wanneer die opgeloste sout die blaar van die plant bereik is daar net twee meganismes om die sout uit die sitoplasma te hou. Sout-ione kan opbou in die apoplast, die netwerk van spasies tussen die selle, of kan geïsoleer word binne die vakuool, 'n membraan-omhulde ruimte binne die sel. Die opbou van die soute in die apoplast sal die osmotiese gradiënt tussen die buite- en binnekant van die sel so vergroot dat die water uit die sel beweeg en sellulêre ontwatering veroorsaak en later seldood. Die oorblywende opsie is dat die sout gekompartementeer sal word in die selvakuool. Die vakuool beslaan omtrent die hele sel-volume en is goed aangepas vir die kompartementering van die soutoplossing (Canny, 1995).

Vir plante om in 'n sout-omgewing te kan groei moet daar gekoördineerde kontrole van ioon beweging wees, vanaf die omgewing na die wortel en deur die vaskulêre weefsel tot by die blaarselle. Die kontrole word uiteindelik uitgeoefen deur ioon-vervoer oor die membrane. Suksesvolle kompartementering van sout hang af van die ioon-vervoer deur die plasmamembraan en tonoplast (Volkmar et al., 1998). Die Na^+ elektrochemiese gradiënt dikteer die passiewe invloei van Na^+ oor die plasmamembraan, (Niu et al., 1995). Die uitvloei van Na^+ is aktief (as gevolg van die hidrofobiese aard van die plasmamembraan teen die termodinamiese gradiënt), word bemiddel deur Na^+/H^+ -teendraers in die tonoplast en word aangedryf deur H^+ -afhanklike ATPase (Figuur 1.2) (Rea et al., 1992). Die membraangebonde ATPase/ H^+ pomp vervoer protone oor die membraan teen die elektrochemiese gradiënt en skep dus 'n elektriese membraan potensiaal. Die energie vir die proses word deur die splitsing van ATP verkry. Vakuoliese

kompartementering van Na^+ verminder die sitosoliese vlakke van die ioon, wat 'n "energieke afdraande" veroorsaak vir die verdere invloei van Na^+ . Aktiewe uitvloei van Na^+ vanaf die sitosol oor die plasmamembraan en tonoplast is essensiël vir totale intrasellulêre opname en vakuool kompartementering. Die negatiewe membraanpotensiaal van die plasmamembraan keer dat chloried-ione in die sitosol inbeweeg. Die vloeï van Na^+ -ione oor die membraan verskuif die elektrochemiese potensiaal en bevorder passiewe invloei van Cl^- deur spesifieke anioon-kanale (Skerrett & Tyerman, 1994). Cl^- speel net so belangrike rol as Na^+ in soutverdraagsaamheid (Flowers & Yeo, 1988). By soutverdraagsame plante geskied die kompartementering van Cl^- in die vakuole by 'n baie hoë konsentrasie (Matile, 1988). Fluktuasie van die sitoplasmiese en vakuool Cl^- konsentrasies vergemaklik ook die vervoer van ander ione na die vakuool (Martinoia et al., 1987). Vakuool kompartementering van Na^+ en Cl^- is dus noodsaaklik vir soutverdraagsaamheid, want dit fasiliteer osmotiese verandering vir seluitsetting en die behoud van selwanddruk.

Wanneer die Na^+ in die selvakuool is, is dit baie geneig om terug te lek na die sitoplasma as gevolg van die groot konsentrasie verskil tussen die twee kompartemente. Hierdie lekkasie verhoog weer die tempo waarmee Na^+ terug in die vakuool gepomp moet word (Maathuis et al., 1992). Cl^- sal ook lek, maar net as die lekkasie van Na^+ die punt bereik waar die vakuool nie meer positief gelaai is ten opsigte van die sitoplasma nie. Baie suiwer vakuole is geïsoleer uit *Suaeda maritima* en het hoogs versadigde vetsure en ander lipiede bevat wat aanleiding gee tot verminderde deurlaatbaarheid vir NaCl (Leach et al., 1990). Daar is gevind dat die tonoplast kation-kanale waardeur Na^+ teruglek na die sitoplasma, toe is by normale fisiologiese Na^+ konsentrasies in die geïsoleerde vakuole van *S. maritima* (Maathuis et al., 1992). In die afwesigheid van lekkasie sal 'n relatiewe lae vlak van tonoplast H^+ -ATPase aktiwiteit nodig wees om NaCl kompartementering te behou (10% in volwasse selle en 'n bietjie meer in ontwikkelende selle) (Maathuis et al., 1992).



Figuur 1.2 Skematiese voorstelling van die moontlike paaie van Na^+ vervoer oor plantmembrane (Ammann & Sanders, 1999).

1.3.3.3 Ioon uitsluiting.

Sout uitsluiters het die vermoë om die vervoer van sout na die loof te beperk. Dit is moontlik dat toksiese ione soos Na^+ , wat in groot hoeveelhede geabsorbeer word, gereabsorbeer word vanaf die loof of die wortels en dan gestoor word en teruggeplaas word na die grond (Winter, 1982; Winter & Preston, 1982). Boontjie plante sluit Na^+ uit deur dit in die basale dele van die plant te hou, maar terselfdertyd Cl^- na die res van die plant te vervoer (Jacoby, 1964). Soutverdraagsaamheid in 'n sekere mielie genotipe word ook toegeskryf aan die vermoë van die plasmalemma in die wortel epidermis en korteks om Na^+ meer doeltreffend uit te sluit as wat die geval is in 'n sensitiewe genotipe (Schubert & Läuchli, 1990).

1.3.3.4 Na⁺/K⁺ diskriminering en die rol van Ca²⁺.

Hoë sout konsentrasies in die wortel medium versteur die voedingsstatus van die plant. Die opname en vervoer van belangrike voedingstowwe soos K⁺ en Ca²⁺ word erg belemmer deur sout stremming, wat uiteindelik die soutverdraagsaamheid van die plant nadelig beïnvloed onder toestande van lae voedingsstof beskikbaarheid (Kuiper, 1984). Regulering van ioon-selektiwiteit, spesifiek Na⁺/K⁺ diskriminasie speel 'n belangrike rol in soutverdraagsaamheid (Gorham, 1993). Die meeste sout-geaffekteerde gronde het meer Na⁺ as K⁺ (Hale & Orcutt, 1987; Omielan et al., 1991; Nevo et al., 1992). Plante verkies om meer K⁺ as Na⁺ op te neem (Schroeder et al., 1994) en doen dit deur Na⁺ te verhinder om in die transpirasie stroom te kom deur die toevoer van Na⁺ en Cl⁻ na die loof te kontroleer (Gorham, 1988; Dvorak et al., 1994). Hoë vlakke van K⁺ in jong groeiende weefsel word geassosieer met soutverdraagsaamheid in baie spesies (Gorham, 1993; Storey et al., 1993; Khatun & Flowers, 1995). *Th. elongatum* is gevind om baie meer soutverdraagsaam te wees as *Th. intermedium* (Elzam & Epstein, 1969). Die verskil in soutverdraagsaamheid was gesetel in die hoër opname van K⁺ deur *Th. elongatum* (Flowers et al., 1977).

As soutgeaffekteerde plante met 'n oorvloed Ca²⁺ behandel word, verminder dit die toksisiteit van die Na⁺ (Hyder & Greenway, 1965). Natrium-ophoping word verlaag, die weefsel K:Na verhouding word verhoog, wortel verlenging word gedeeltelik herstel en loof-kalsium-vlakke verbeter (Kawasaki & Moritsugo, 1978; Lynch & Lauchli, 1984 en Cramer et al., 1987, 1989). Dit word aangeneem dat kalsium die opname van Na⁺ verlaag deur die passiewe invloei van natrium oor die plasmalemma van die wortelselle te beperk. Die teenwoordigheid van K⁺ en Ca²⁺ ione verminder dus die vloei van Na⁺ na plasmalemma (Jacobsen et al., 1961; Lahaye & Epstein, 1971; Maathuis & Prins, 1991) en verminder so Na⁺ skade.

1.3.3.5 Hormonale verstelling.

Hormone soos sitokinien, gibberellien, oksien en etileen dra skynbaar by tot die soutverdraagsaamheid van plante, maar die mees oortuigende bewyse dui op 'n rol vir absissiensuur (ABA) (Vaadia, 1976). ABA verminder die verlies van water deurdat dit die sluiting van die huidmondjie bewerkstellig en wateropname van die wortel verhoog. Dit

bevorder ook ontwikkelings-veranderinge wat die plant meer verdraagsaam maak, naamlik: (i) verminderde groei van die loof, (ii) verkleining van die blaaroppervlakte, (iii) stimulering van wortelverlenging, laterale wortelgroei en wortelhaar ontwikkeling (Hartung & Davies, 1994). ABA speel ook 'n belangrike rol by die beheer van die Ca^{2+} -geaktiveerde Cl^- kanale, Ca^{2+} -kanale en K^+ -kanale (Blatt, 1993). Verhoogde ABA-vlakke is gevind om hand aan hand te gaan met verhoogde vlakke van osmotien ('n lae molekulêre gewig proteïen). Die rol van osmotien in die daarstelling van soutverdraagsaamheid is nog nie bekend nie (Singh et al., 1987).

1.4 Natuurlike omgewing.

Verskillende faktore in die plant se atmosferiese omgewing affekteer soutverdraagsaamheid. Meeste gewasse is meer soutverdraagsaam in vogtige en koel weer as in warm, droë weer (Magistad et al., 1943). Boontjies is omtrent twee keer so soutverdraagsaam as dit in lae temperature met hoë vogtigheid groei as wanneer dit aan hoë temperature met lae vogtigheid blootgestel word (Hoffman & Rawlins, 1970). Hoë atmosferiese vogtigheid verhoog die soutverdraagsaamheid deurdat die transpirasie tempo verlaag word. Soutverdraagsaamheid neem weer af by hoë lig-intensiteit (Nieman & Poulsen, 1971) en lae suurstof konsentrasies (Aceves et al., 1975).

1.5 Morfologiese aanpassings.

Die mees klaarblyklike effek van sout is die belemmering van groei. Hierbenewens veroorsaak versouting ook strukturele verandering wat die plant se waterbalans of waterstatus verander (Robinson et al., 1983). Hierdie strukturele veranderings behels verminderde en kleiner blare, verhoogde sappigheid, verdikking van die blaar-kutikel, wasagtige lae op die blaar-oppervlak, verminderde differensiasie en ontwikkeling van die vaskulêre weefsel en vervroegde verhouting van die wortels. Hierdie modifikasies verskil van plant-spesie tot plant-spesie en ten opsigte van verskillende grade van versouting (Maas et al., 1978).

Chloried-versouting lei tot vermeerdering van plantweefselsap vanweë verlenging van die palissade-selle wat op hul beurt die interneioon-konsentrasie verdun en die verkleining

van die blaaroppervlakte tot gevolg het (Longstretch et al., 1979; Brugnoli et al., 1991). Dit lyk asof die sout die struktuur van die vaskulêre weefsel verander en die water geleiding van die plant verminder sodat daar verminderde transpirasie plaasvind (Robinson et al., 1983; Longstretch et al., 1979). Die wortels word direk blootgestel aan die sout-omgewing, maar die wortels word minder deur die sout geaffekteer as die groei van die vegetatiewe lote (Robinson et al. 1983). Die laer loof:wortel verhouding verbeter die waterbalans deur die potensiaal van water-absorpsie te handhaaf en transpirasie te verminder (Lauchli & Epstein, 1990).

1.6 Bykomstige meganismes wat soutverdraagsaamheid verhoog.

Bykomstig tot die vermoë om NaCl te kompartementeer en om verenigbare osmotikums te vorm het halofiete diverse, sekondêre meganismes om 'n oorvloed sout te hanteer. Sekere halofiete het soutkliere (Balsamo & Thomson, 1993,1996) en soutblase (Schirmer & Breckle, 1982; Freitas & Breckle, 1992) om tydelik hoë vlakke van NaCl te hanteer. Nie alle soutverdraagsame plante het sout-uitskeidings organe nie, maar die wat het kan 50% en meer van die sout wat die blaar binnekom, uitskei. Versapping kan gedefinieer word as hoë water inhoud per eenheid blaar oppervlakte en is 'n tipiese morfologiese reaksie teen hoë sout konsentrasies. Versapping verminder die effek van oortollige sout in die blare deurdat die NaCl in die blare verdun word (Kramer, 1984). Halofiete kan in die aanwesigheid van sout die doeltreffendheid van hul watergebruik verhoog sodat net 'n minimale hoeveelheid water getranspireer word vir elke eenheid van groei (Guy et al., 1980).

1.7 Genetiese kompleksiteit van soutverdraagsaamheid.

Feitlik al die ekonomies bruikbare kenmerke van gewasse is poligenies in oorerwing en die genotipes vir hierdie kenmerke kan nie geredelik bepaal word nie, want dit word sterk gemodifiseer deur die omgewing. Vanweë die onverkrygbaarheid van isogeniese lyne wat net van mekaar verskil ten opsigte van soutverdraagsaamheid, is feitlik alle fisiologiese studies beperk tot vergelyking tussen verskillende spesies en variëteite met skynbare betekenisvolle genetiese verskille. Natuurlik-ontwikkelde soutverdraagsaamheid is 'n kwantitatiewe, poligeniese kenmerk wat geassosieer word met vele morfologiese en

biochemiese aanpassings (Shannon, 1984,1985; Tal, 1984,1985; Epstein & Rains, 1987; Cushman et al., 1989). Verskillende spesies het ook soutverdraagsaamheid bekom deur verskillende paaie van evolusie. Die vlak van genetiese kompleksiteit by plante blyk duidelik uit studies met verskillende spesies soos rys (Yeo et al., 1988), gars (Forster et al., 1990), tamatie (Saranga et al., 1992), verskillende grasspesies (Ashraf et al., 1986), duiweboontjie (Subbarao et al., 1990) en koring (Schachtman & Munns, 1992). Die reaksie van disomiese chromosoom addisielyne (*Thinopyrum elongatum* na tetraploïede koring, *Triticum durum* of heksaploïede koring *Triticum aestivum*, "Chinese Spring") op verhoogde soutkonsentrasie het gewys dat verskeie chromosome bydra tot Na^+ -uitsluiting (Gorham, 1994).

Verskeie, onafhanklike fisiologiese meganismes dra moontlik by tot soutverdraagsaamheid, naamlik: (i) veranderde plasmamembraan H^+ -ATPase aktiwiteit (Reuveni et al., 1993), (ii) osmotiese verstelling, (iii) kompartementering van Na^+ en Cl^- (Binzel et al., 1988), (iv) meer effektiewe Na^+ -uitsluiting (Binzel et al., 1989) en (v) ophoping van osmotien en verminderde groeitempo (Bressan et al. 1987). Die uiteenlopendheid van die kenmerke dui op veelvuldige pleiotropiese of epigenetiese interaksies wat die assosiasie tussen die fisiologiese meganismes en die spesifieke genetiese veranderings bemoeilik (Warne et al. 1995).

1.8 Teling vir soutverdraagsaamheid.

Soutverdraagsaamheid kan gedefinieer word as volgehoue plantgroei in die teenwoordigheid van NaCl en die basiese telings-beginsels berus op die teenwoordigheid van genetiese variasie vir soutverdraagsaamheid tussen verskillende genotipes. Ten spyte van die teenwoordigheid van genetiese variasie is daar nog min soutverdraagsame kultivars vrygestel (Noble & Rogers, 1993). Die stadige vooruitgang is te wyte aan 'n kombinasie van verskillende faktore: (i) onvolledige kennis van die sout-effek op plante, (ii) onvoldoende middele vir die meting en bepaling van soutverdraagsaamheid, (iii) ondoeltreffende seleksiemetodes, (iv) die komplekse aard van die ioniese en osmotiese effekte van sout op die plant en (v) die verandering van soutverdraagsaamheid tydens plant-ontwikkeling.

Oor die laaste 15 jaar het pogings om die soutverdraagsaamheid van graangewasse te verbeter op vier strategieë berus (Shannon, 1984), nl.

- geleidelike verbetering van gewasse deur konvensionele teling en seleksie.
- die verbastering van gewasse met hul verwante wilde spesies wat reeds soutverdraagsaam is.
- die domestikasie van soutgeharde wilde spesies deur teling en seleksie vir verbeterde akkerboukundige prestasie.
- biotegnologiese strategieë waar gene vir soutverdraagsaamheid geïdentifiseer, gekloon en gemanipuleer word.

Die fisiologiese maatstawwe vir die teel van soutverdraagsaamheid is osmotiese verstelling, K^+/Na^+ selektiwiteit, Na^+ uitsluiting, fotosintese en transpirasie tempo (Morant-Avice et al., 1999).

1.8.1 Geen-oordrag deur wye hibridisasie in die tribus Triticeae.

In Europa het moderne planteteelt omtrent 100 jaar gelede begin vanaf 'n wye reeks primitiewe populasies (landrasse) uit die verskillende hoeke van Rusland, Duitsland, Frankryk en Engeland (Röbbelen, 1978). Die ontwikkeling van verbeterde kultivars was hoofsaaklik toegespits op die aaneenlopende kombinering van voortreflike gene, behoud van die beste kombinasies en die ontslae-raak van die slegter tipes. Dit het oor tyd gelei tot die vernouing van die genetiese basis van die verboude gewasse.

Die gevaar van vernouing van die genetiese basis en die genetiese kwesbaarheid van die graangewasse bly 'n kopseer wêreldwyd (Gill et al., 1983; Feldman & Sears, 1981; Sears, 1981; Feldman, 1988). Die voortdurende verlies aan genetiese variasie, lei tot die verlies van toekomstige genetiese opsies vir noodsaaklike aanpassings in kultivars en landbou-produksie (Jiang et al., 1994). Die gewas se genepoel voorsien die basiese rou materiaal vir seleksie vir aanpassing in geval van 'n toename in biotiese of abiotiese druk, veranderde gebruikersvoordele, veranderde omgewing en die groei van die wêreld-bevolking. Vir die redes is dit nodig om ook die genetiese variasie te ontgin wat opgesluit is in wilde gras-spesies wat verwant is aan die verboude graangewasse. Hierdie spesies is 'n ryk bron van variasie vir 'n wye reeks van kenmerke. Die wilde spesies het verskillende

grade van verwantskap met die verboude graangewasse (Sears, 1981). Die mees voordelige metode vir geen-oordrag vanaf enige spesie word bepaal deur die evolusionêre afstand tussen die donor en ontvangerspesies (Kimber 1984; Feldman 1988). Dus, die graad van homologie (ooreenkoms), homoeologie (gedeeltelike ooreenkoms) of nie-homologie (geen ooreenkoms) van die wilde spesie chromosome ten opsigte van die ontvanger-gewasse se chromosome, moet bekend wees.

In interspesie en intergeneriese geen-oordrag is daar drie noodsaaklike stappe, ongeag die homologie tussen die skenker en ontvanger chromosome. Dit is:

- identifisering van spesie aanwinste met wenslike kenmerke.
- oordrag van 'n spesie chromosome of chromosomegment met die teikengene daarop
- rekonstruksie van die graangewas-genotipe met behoud van die teikengene en die kleinste moontlike hoeveelheid vreemde genetiese materiaal.

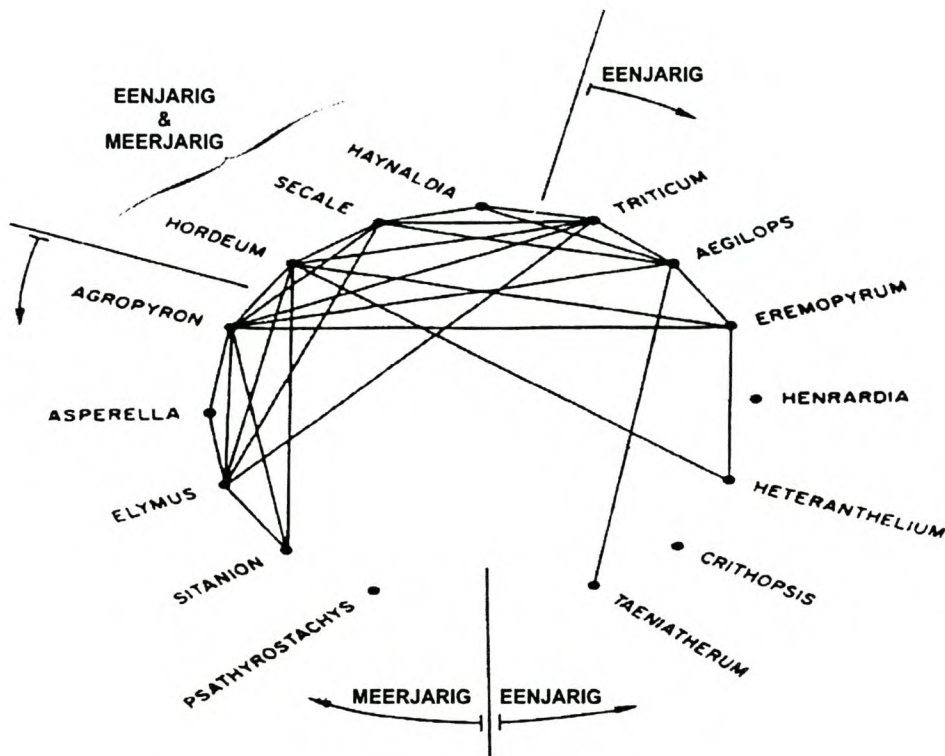
Om die regte metode te kies vir die oordrag van vreemde gene is daar drie kriteria waaraan voldoen moet word (Kimber & Feldman, 1987).

- 'n eenvoudige en effektiewe siftings-metode wat toelaat dat die kenmerk wat oorgedra word, maklik herken kan word.
- die teikenkenmerk moet eenvoudig oorge-erf word.
- die geen moet uitgedruk word en maklik waarneembaar wees in die genetiese agtergrond van die ontvanger-kultivar.

Hierdie vereistes beperk die kenmerke wat geteiken word vir oordrag na graangewasse. Siekteweerstandsgene word meestal oorgedra aangesien die oorerwingswyse gewoonlik eenvoudig is en maklike siftingsmetodes vir die teikengene bestaan.

Die taksomiese verskeidenheid van halofiete verhoog die moontlikheid dat soutverdraagsaamheid by gewasse ingevoer kan word deur wye kruisings (Epstein et al., 1980). Gewasse met soutverdraagsame, wilde familielede sluit in, koring (het verwantskap met *Aegilops*, *Thinopyrum* en ander wilde spesies van die Triticeae (Figuur 1.3)(Gorham & Wyn-Jones, 1993), gars (Aronson, 1989), tamatie (Asins et al., 1993) en voerbeet (Rozema et al., 1993). 'n Geen, (+*Kna1*), vir verhoogde K^+/Na^+ diskriminasie is by wyse

van konvensionele kruisings vanaf broodkoring (*Triticum aestivum*) na durumkoring (*T. turgidum*) oorgedra en die hibried vertoon verhoogde soutverdraagsaamheid (Dvorák et al., 1994). Soutverdraagsaamheidsgene vanaf *Triticum tauschii* is ook uitgedruk in heksaploïede koring (Schachtman et al., 1992). Die hoop om soutverdraagsaamheid te verbeter met glikofiet-halofiet kruisings is nog nie heeltemal vervul nie, as gevolg van die multigeniese aard van halofietiese soutverdraagsaamheid (Flowers & Yeo, 1995). Die oordrag van poligenies-bepaalde soutverdraagsaamheidsgene vanaf *Thinopyrum* spesies sal moeilik wees, alhoewel daar reeds vordering gemaak is met die ontrafeling van die genetiese beheer van die kenmerk.



Figuur 1.3 Susesvolle intergeneriese hibriede wat reeds binne die tribus Triticeae gemaak is (Sakamoto, 1973).

1.8.2 Soutverdraagsaamheid in die tribus Triticeae.

Genetiese ontleding van kwantitatiewe kenmerke toon dikwels dat 'n hanteerbare aantal chromosoom segmente groot invloed het op ingewikkelde fisiologiese kenmerke (Prioul et al., 1997). Daar is gevind dat chromosome 3 en 5 van verskillende Triticeae spesies konstant betrokke is by soutverdraagsaamheid (Zhong & Dvůrák, 1995). In die Triticeae, fasiliteer chromosoom 4D ook altyd K^+/Na^+ diskriminasie (Gorham & Wyn-Jones, 1989). Daar mag dus 'n gelyksoortige basis vir verdraagsaamheid in die verskillende spesies van die tribus Triticeae wees (Forster, 1992). Dit beteken dat die mees geskikte benadering vir geen-oordrag, genoom skommeling na wye hibridisasie is, of die toevoeging van heel chromosome.

Ondersoek van addisies van *Thinopyrum elongatum* (Host) Löve chromosome na broodkoring het getoon dat 'n aantal chromosome bydra tot soutverdraagsaamheid van die volle amfiploïed (Dvorák et al., 1988). Die mees dramatiese verhoging is verkry met die aanwesigheid van chromosoom 3J (Omielan et al., 1991) terwyl die groep 2 chromosome soutverdraagsaamheid verminder het. By *Th. bessarabicum* is dit chromosoom 5J wat bydra tot soutverdraagsaamheid van die addisielyne in Chinese Spring (Mahmood & Quarrie, 1993). Die effek van chromosoom 5J is die uitsluiting van Na^+ en Cl^- ione na die jonger blare en die ophoping van K^+ in die jong weefsel.

1.9 Tempo van waterverlies.

Lae tempo van waterverlies (TWV) deur die plant kutikel word gesien as 'n belangrike droogte oorlewings meganisme (Oppenheimer, 1960). Genotipiese verskille in TWV kan gebruik word vir die sifting van verskillende genotipes in koring (Winter et al., 1988) en ander gewasspesies (Jordan et al., 1984) vir aanpassing by droë groeikondisies. Die kenmerk toon middelmatige oorerflikheid (Clarke & Townley-Smith, 1986) en lae tempo van waterverlies word geassosieer met hoë graanopbrengs by durum koring onder droë toestande (Clark et al., 1989), maar die optimale telings strategie vir die tempo van waterverlies is nog onbekend.

Epikutikulêre was speel 'n belangrike rol in plant-water verhoudings. Die chemiese aard van epikutikulêre was skep 'n deurlopende hidrofobiese waterskeiding, wat waterverlies deur die plant verminder deurdat die transpirasietempo verlaag word (Uddin & Marshall, 1988).

1.10 Die *Triticeae*.

Die tribus *Triticeae* van die grasfamilie, *Gramineae*, bestaan uit ongeveer 325 spesies (Dewey, 1984) wat deur Löve (1984) in 38 genera geklassifiseer is volgens hul genomiese verwantskappe. Van die vernaamste verboude graangewasse, koring, gars en rog, is lede van die tribus *Triticeae*. Meer as 75% van die spesies van die *Triticeae* is meerjarig en sluit verskeie spesies in waarvan die natuurlike habitate verskillende mates van soutverdraagsaamheid vereis (Gorham et al, 1985). Die basiese genoom van die *Triticeae* is sewe paar homoloë chromosome, wat impliseer dat almal ontwikkel het uit 'n gemeenskaplike voorouer (Dvorák, 1980). Deur die evolusionêre proses is die basiese genoom gewysig, maar 'n groot mate van chromosomale homologie het behoue gebly, wat voorspel dat oordrag van gene tussen die verwante spesies van die *Triticeae* moontlik is (Gale & Miller, 1987). Die *Triticeae* kom wyd verspreid voor in al die klimaat-streke van die wêreld, van warm tot koud, en in areas met jaarlikse reënval wat wissel van 1000 mm tot so min as 100 mm.

1.10.1 Die genus *Thinopyrum*.

Meer as 100 meerjarige grassoorte met een sjaar per aarnode is oorspronklik geklassifiseer in 'n komplekse genus, *Agropyron* B.P. (Cauderon, 1966, 1979). 'n Meer onlangse taksonomiese klassifikasie van die genus deur Löve (1982, 1984) en Dewey (1984) is ge-grond op genomiese verwantskappe tussen spesies. Dewey (1984) klassifiseer slegs die spesies met die P-genoom onder *Agropyron*, wat *Agropyron* reduceer tot 10 spesies en 19 subspesies. Al die ander voormalige *Agropyron* spesies word nou geklassifiseer in nuwe genera volgens hul genoom of genome: *Critesion* (H), *Psathyrostachys* (N), *Pseudoroegneria* (S), *Thinopyrum* (J), *Elytrigia* (SX), *Leymus* (JN), *Elymus* (SHY) en *Pascopyron* (SHJN) (X en Y dui ongespesifiseerde genome aan). Volgens Dewey (1984) bestaan *Thinopyrum* (afgelei van die Griekse woorde wat "strand" en "koring" beteken) uit sowat 20 spesies binne drie spesiekomplekse, elkeen met sy eie status as seksie.

Die seksie *Thinopyrum* sluit die spesies van die *Th. junceum* kompleks in, soos *Th. bessarabicum*, *Th. disticum*, *Th. junceiforme*, *Th. junceum* en *Th. runemarkii*. Hierdie is almal maritieme grasse wat aan die kus van die Baltiese See, Mediterreense See en die NoordSee groei, behalwe *Th. disticum* wat aan die kuslyne van die Wes Kaap en Oostelike Provinsies van Suid-Afrika groei. Die spesies is meestal selfbestuiwend.

Die seksie *Lophopyrum* bestaan uit die spesies van die *Thinopyrum elongatum* kompleks, soos *Th. caespitosum*, *Th. curvifolium*, *Th. elongatum*, *Th. ponticum* en *Th. scirpeum*. Hierdie spesies kom natuurlik voor langs die kus van die Mediterreense See, en ook binnelands in die soutgebiede van die Midde-Ooste en Europese Rusland. Die spesies is self- en kruisbestuiwend.

Die derde seksie, *Trichophorae*, bestaan uit die spesies van die *Thinopyrum intermedium* kompleks, die mees bekende is *Th. gentryi*, *Th. intermedium* en *Th. podperae*. Hierdie spesies word gevind in die binnelandse streke van Europa, die Midde-Ooste en Sentrale Asië en is oorwegend kruis-bestuiwend.

Verskeie *Thinopyrum* spesies is soutverdraagsaam (Mcguire & Dvůrák, 1981). In hierdie spesies is die volgende kenmerke geassosieer met lang termyn soutverdraagsaamheid (Wyn-Jones & Gorham, 1989).

- die handhawing van hoë K^+ konsentrasies, veral in die jong weefsel
- beheer oor die vervoer van Na^+ en Cl^-
- minimale osmotiese regulering
- hoë watergebruik doeltreffendheid
- sout ge-induseerde verandering van blaarwas en stomatale frekwensies
- hoë glisienbetaan inhoud, veral in die jong ontwikkelende blare.

1.10.1.1 *Thinopyrum distichum*.

Thinopyrum distichum ($2n = 4x = 28$) (Thunb.) Löve, is 'n strandkoringgras inheems aan die kuslyn van die Wes Kaap en Oostelike Provinsies van Suid-Afrika. Dit is 'n baie geharde, stadig-groeiende maritieme gras wat op sandduine groei, (soms) onder die hoogwater-merk en wat by tye oorspoel word deur seewater. Dit is 'n meerjarige gras wat hoofsaaklik selfbestuiwend is, maar ook vegetatief kan voortplant met wortelstok-sylote

(Pienaar, 1981). Pienaar (1981, 1983) het gevind dat *Th. distichum* 'n segmentele allotetraploïed is met genome verskillend van die van koring. Meiotiese studies het gewys dat die genoom van *Th. distichum* ($J_1^d J_1^d J_2^d J_2^d$) eiesoortig is, maar baie nou verwant is aan die genome van *Thinopyrum elongatum* ($J^e J^e$) en *Thinopyrum junceiforme* ($J_1 J_1 J_2 J_2$) (Pienaar et al., 1988). Die twee genome, J_1^d en J_2^d , deel 'n groot mate van homologie maar verskil van mekaar in sekere chromosoom-segmente weens ten minste twee resiproke translokasies. Op grond van die C-band kariotipe van *Th. distichum* (Littlejohn & Pienaar, 1994; Pienaar, 1981) kon die 28 chromosome opgedeel word in sewe groepe van vier. Die genus *Thinopyrum* is 'n ryk bron van potensieël nuttige gene wat vir die verbetering van verboude gewasse gebruik kan word en hieronder resorteer:

- meerjarigheid
- weerstand teen blaar-, stam- en streeproes
- streep-mosaïek-virus-weerstand
- sout- en droogte-verdraagsaamheid
- verhoogde aantal blommetjies per sjaar
- verhoogde graan-proteïeninhoud
- apomiksie.

Thinopyrum distichum (Fig.1.4) is goed aangepas om in onvrugbare sandduine te groei. Dewey (1960) het met veldproewe getoon dat *Th. distichum* redelik soutverdraagsaam is. Onder kweekhuis toestande was *Th. disticum* net so soutverdraagsaam soos *Th. elongatum* (Littlejohn, 1988). *Thinopyrum distichum* is dus 'n goeie bron van soutverdraagsaamheidsgene vir die verbetering van graangewasse.



Figuur1.4 *Thinopyrum distichum*.

1.10.2 *Secale cereale* (verboude rog).

Die enigste verboubare spesie van die genus *Secale* is *Secale cereale* en naas koring en gars is rog die derde mees verboude graangewas (Bushuk, 1976). Rog is 'n eenjarige gewas, aangepas by gebiede met koue winters en warm, droë somers, waar rog se opbrengs baie beter is as die van ander graangewasse. Rog is baie gehard en het die vermoë om in suur en sanderige, onvrugbare grond te groei, daarom is rog meer geskik om in marginale terreine te verbou waar ander graangewasse nie kan oorleef nie. Rog het die wydste verspreiding van al die graangewasse. Dit maak omtrent 2-3% van die globale graanproduksie uit, en 90% van die wêreld se rog produksie geskied in Europa. Rog word meestal gebruik vir die maak van rog-brood (swart brood), rog-beskuitjies en tot 'n mindere mate vir dierevoer. In die V.S.A. en Kanada word dit ook gebruik vir die produksie van rog-whisky. Al is rog grootliks 'n graangewas word dit ook verbou vir veevoer, veral vir vroeë lente weiding (Evans, 1993).

Behalwe die kunsmatige poliploïede variëteite, is alle *Secale* spesies diploïed ($2n = 2x = 14$) (Deodikar, 1963). Rog is 'n oopbestuivende spesie met 'n gametofietiese selfonverenigbaarheids-sisteem (Hoffman et al., 1981). Rog-kultivars is hoogs

heterosigoties, anders as koring, gars en hawer wat weer hoogs homosigoties is. Die telings-proses van *S. cereale* behels gewoonlik net deurlopende oopbestuiwing en massaseleksie. Sintetiese tetraploïede kultivars is meestal minder suksesvol. Deesdae kan selfonverenigbaarheid in rog geneutraliseer word deur gene vir selfvrugbaarheid (Hoffman et al., 1981). Met die gene kan telers nou ingeteelde lyne en hibriede maak (Geiger, 1982). Die eerste hibried-kultivars is in 1984 vrygestel en raak al hoe belangriker in kommersiële rog-teling (Geiger, 1990). Die groot voordeel van hibriede bo oopbestuiwende kultivars is 'n opbrengs-verhoging van 10-15% en verbeterde omvalweerstand vanweë die verkorte halms.

1.11 Molekulêre merkers vir die seleksie van soutverdraagsaamheid.

Teling vir soutverdraagsaamheid word beperk deur die kompleksiteit van die kenmerk. Daar is nog steeds onvoldoende genetiese kennis van die komponente van verdraagsaamheid, baie min, of geen, korrelasie van verdraagsaamheid in verskillende ontwikkelings-fases en daar is ook nie effektiewe seleksie-maatstawwe nie. Soutverdraagsaamheid, by elke fase van plant-ontwikkeling, word beheer deur meer as een gen en word ook baie beïnvloed deur omgewings-variasies (Shannon, 1985; Fooland & Jones, 1991,1993; Fooland, 1996,1997). Een manier om seleksie en teling vir komplekse kenmerke, soos soutverdraagsaamheid, te vergemaklik, is die identifisering en aanwending van maklik oorerfbare genetiese merkers wat geassosieer kan word met die kenmerk van belang (Tanksley & Rick, 1980; Lander & Botstein, 1989; Lande & Thompson, 1990; Stuber et al., 1992; Dudley, 1993; Tanksley 1993 & Fooland et al., 1995).

Molekulêre merkers is gevolglik van groot nut in genetiese studies, mits hulle oor die volgende eienskappe beskik:

- hulle hoogs polimorfies is.
- hulle ko-dominant oorge-erf word sodat daar tussen homo- en heterosigote onderskei kan word in diploïede organismes.
- hulle oorvloedig en eweredig dwarsdeur die genoom voorkom.
- hulle maklik bekombaar is.

- die toets daarvoor maklik en vinnig is en die moontlikheid van outomatisering bestaan.
- hulle hoogs reproduseerbaar binne en tussen laboratoriums is.

Polimorfiese molekulêre merkers is al dikwels suksesvol gebruik vir die identifisering en kartering van kwantitatiewe-kenmerk-lokusse (QTLs; Martin et al., 1989; Paterson et al., 1991; Stuber et al., 1992). Die ontwikkeling van DNA-merkers soos RFLPs (restriksie-ensiem-fragment-lengte-polimorfismes; Botstein et al., 1980) en RAPDs (lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNAs; Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990) het dit moontlik gemaak om QTLs op te spoor en die genetiese effekte daarvan te bepaal. Wye-kruisings programme wat lei tot die invoer van baie ongewenste eienskappe, tesame met die teikengeen(e), kan gebruik maak van molekulêre merkers vir die vinnige en effektiewe bestuur van die segregerende generasies (Dudley, 1993).

1.11.1 RAPD-merkers.

Veelvuldige amplifikasie-produkte vanaf setels wat verspreid deur die genoom voorkom kan gegenereer word deur die amplifisering van genomiese DNA met een kort (9 of 10 basispare), lukrake oligonukleotied inleier onder lae strengheid kondisies (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990). Die polimerase kettingreaksie (PKR) kan op verskeie wyses gebruik word om molekulêre merkerfragmente te genereer. Die metodes verskil ten opsigte van die spesifieke kondisies van amplifikasie, of die wyse waarop die geamplifiseerde produkte geskei en gevisualiseer word, en sluit in: RAPDs, AP-PCRs (lukrake inleier polimerasekettingreaksie; Welsh & McClelland, 1990) en DAFs (DNA-amplifikasie vingerafdrukking; Caetano-Anolles et al., 1991). RAPD merkers is in die huidige studie gebruik.

RAPDs is baie sensitief vir DNA en Mg^{2+} konsentrasies, polimerases en bindings-temperatuur (Devos & Gale, 1992) en skep dus probleme van reproduseerbaarheid (Penner et al., 1993; Skroch & Nienhuis, 1995). RAPD-merkers word gemanifesteer as die teenwoordigheid of afwesigheid van fragmente en is dus 'n dominante merker. Heterosigote kan dan nie akkuraat van dominante homosigote onderskei word nie (Williams et al., 1993). As gevolg van die lukrake aard van die genomiese toetsing is RAPD-merkers nie die aangewese tegniek om te gebruik wanneer die verskille tussen

twee genome wat vergelyk word uit 'n baie klein genomiese fraksie bestaan nie (0.001% van die genoom of kleiner). RAPD-merkers word wel effektief gebruik as daar vir 'n groot genoeg fraksie van die genoom volgorde variasie bestaan, bv. skenker genoom segmente in naby-isogeniese lyne na 'n paar terugkruisings (1-10% van die skenker genoom) en in bulk-segregaat analyses (Michelmore et al., 1991).

Ten spyte van dié beperkinge, het RAPD-merker tegnologie ook baie voordele (Rafalski, 1994). Dit is naamlik:

- hoë vlakke van polimorfisme
- geen radioaktiwiteit
- geen vooraf kennis van die genoom is nodig nie
- die universele inleiers werk in enige genoom
- slegs 'n klein hoeveelheid genomiese DNA word benodig
- metodes is eksperimenteel eenvoudig
- 'n vinnige en eenvoudige analise
- goedkoop
- kan gebruik word om QTLs op te spoor.

Daar is nie 'n enkele merker-sisteem wat 100% ideaal is nie, maar RAPD-merkers is 'n baie waardevolle werktuig vir enige molekulêre genetikus.

1.11.2 AFLP-merkers.

Geamplifiseerde fragment lengte polimorfisme (AFLP) merkers is ontwikkel deur Zabeau en Vos (1993) en is gebaseer op die selektiewe amplifikasie van totaal verteerde genomiese DNA met die gebruik van polimerase ketting reaksie (PKR)(Saiki et al., 1988). Genomiese DNA word verteer deur 'n hoë frekwensie ("frequent") snyer (*Mse*1) en 'n skaars ("rare") snyer (*Eco*R1) en dubbelstring DNA aansluiters ("adapters") word geligeer met die DNA fragmente om 'n DNA templaar daar te stel vir amplifikasie. Komplementêre inleiers vir die aansluiters en die verteringsnyerpunt word ontwerp met twee of drie selektiewe nukleotiede aan die 3' kant van die inleiers. Die verterings fragmente sal net geamplifiseer word as die nukleotiede langs die verteringsnyerpunt korreleer met die selektiewe nukleotiede. Net een van die inleiers wat gebruik word vir die selektiewe amplifikasie word gemerk sodat slegs die verteerde fragmente met die inleiersnyplek van

die gemerkte inleier sigbaar sal wees. Hierdie geamplifiseerde fragmente kan ontleed word deur gel elektroforese. Om die fragmente te visualiseer, word die inleiers radio-aktief (Vos et al., 1995) gemerk.

Polimorfismes soos die aanwesigheid of die afwesigheid van verteringsensiem-snypte, volgorde polimorfismes langs die snypte, invoegings, delesies en herrangskikkings kan uitgelig word deur die AFLP-tegniek (Cervera et al., 1996).

Die volgende redes word deur Vos et al. (1995) gegee waarom twee verteringsensieme gebruik word:

- (i) Die hoë frekwensie snyer sal klein DNA-fragmente daar stel wat maklik geamplifiseer en geskei kan word.
- (ii) Met die gebruik van twee verteringsensieme is dit moontlik om slegs een string van die dubbelstring PCR-fragmente te merk.
- (iii) Verskillende kombinasies van min inleiers kan 'n groot aantal verskillende vingerafdrukke voortbring.

'n Baie belangrike voordeel van AFLP-merkers is die groot aantal lokusse wat geanaliseer kan word vir elke eksperiment (Vos et al., 1995). Behalwe die vermoë om veelvuldige diskrete genetiese lokusse waar te neem, is die AFLP-tegniek ook vinnig, kragtig en betroubaar en daar is nie voorafkennis van die basisvolgorde van die DNA nodig nie (Vos et al., 1995, Vuylsteke et al., 1999). Die groot nadeel van AFLPs is dat dit nie die hele genoom dek nie. Dit is dan moontlik dat sekere polimorfiese fragmente van dieselfde deel van die genoom kom en dat ander dele van die genoom swakker verteenwoordig word (Walton et al., 1996, Rouppe van der Voort et al., 1997 & Shan et al., 1999).

1.12 Apomiksie

Sommige plante produseer sade op geslagtelike en/of ongeslagtelike (apomiktiese) wyses. Met geslagtelike voortplanting word 'n embrio gevorm deur die samesmelting van haploïede vroulike (eier) en manlike (sperm) gamete. Geslagtelike voortplanting lei tot oorkruising en genetiese rekombinasie tydens beide mikro- en makrosporogenese, dit laat toe dat verenigbare plante kruisbevrug en produseer so nuwe geen-kombinasies. Met apomiktiese voortplanting word 'n embrio direk gevorm vanaf 'n chromosomaal

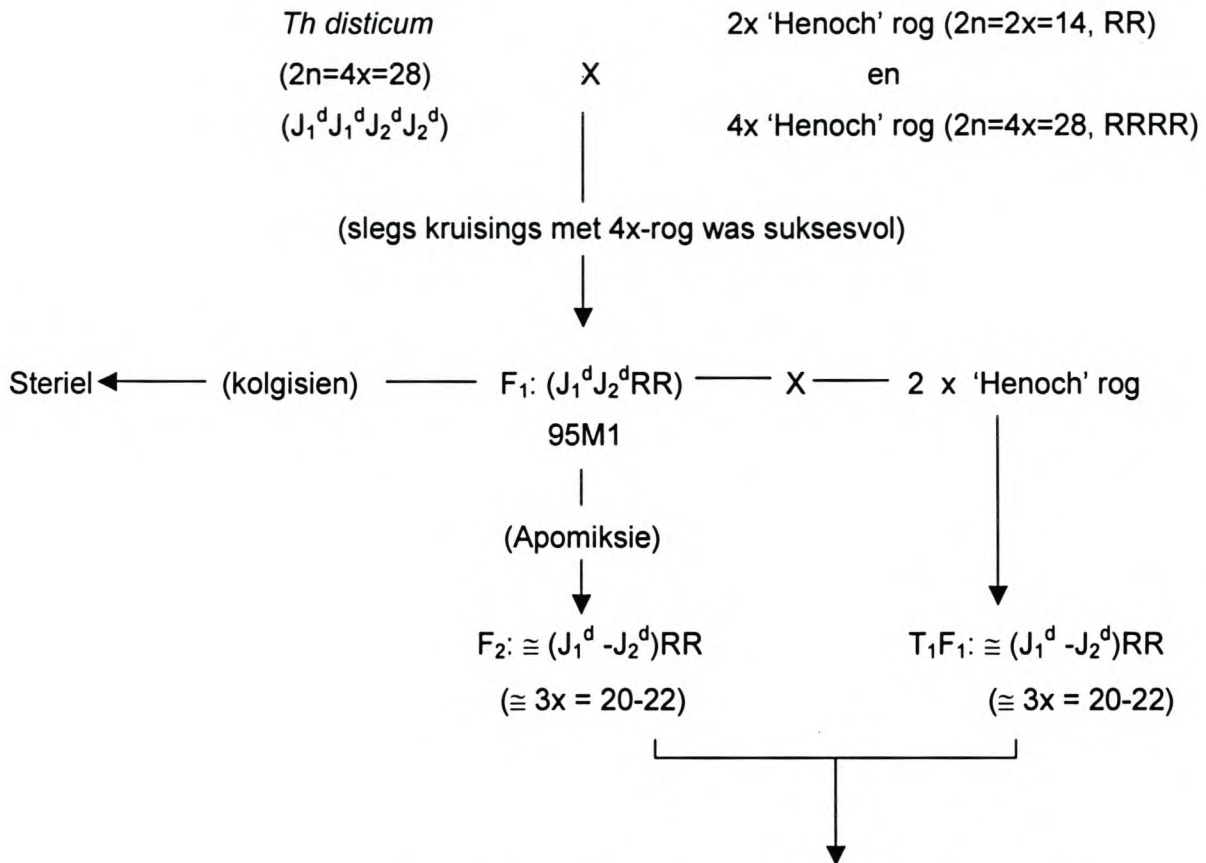
ongereduseerde megaspoor-moedersel, saadknop of 'n somatiese sel van die nusellus (Asker & Jerling, 1992). Apomiksie maak dus vegetatiewe voortplanting deur sade moontlik. Dit fikseer ook baster lewenskragtigheid in die plant deurdat die plant homself onbepaald kan kloon deur sade (Hanna & Bashaw, 1987). Met die ontdekking van gedeeltelike (fakultatiewe) apomiktiese plante in verboude spesies (Arthur et al., 1993; Hanna et al., 1970; Hanna & Powell, 1973; Schertz 1992), geslagtelike plante in apomiktiese spesies (Bashaw, 1962; Hanna et al., 1973; Smith, 1972; Voigt, 1971) en groter bewustheid van die impak wat apomiksie kan hê op kultivarontwikkeling, is navorsing op apomiksie die laaste 20 jaar uitgebrei (Elgin & Miksche, 1992).

Genetiese studies van apomiksie is moeilik en onoortuigend, die nodige kruisings en terugkruisings en dus segregasie-analises in nageslagte is nie altyd moontlik nie. Oorerwingstudies van apomiksie word verder bemoeilik deur die voorkoms van plante met fakultatiewe apomiksie (geslagtelike en apomiktiese voortplanting geskied in die plante op dieselfde tyd en teen verskillende frekwensie; Petrov, 1984). Die genetica van apomiksie is in 'n paar gewasse ontrafel en daar word aanvaar dat dit 'n kwalitatiewe basis het (Asker & Jerling, 1992; Nogler, 1984). Die eenvoudige genetiese beheer van apomiksie verbeter die potensiaal vir die manipulerings van die reprodusiewe meganisme en die oordrag daarvan na ander spesies. Die beste bron van gene wat apomiksie beheer sou die wees wat binne die plant-spesie self voorkom. Ongelukkig is daar nog nie gene wat apomiksie beheer in die belangrike landbou-spesies gevind nie, hoewel die gene wel voorkom in die wilde verwantes (Hanna & Bashaw, 1987). Pogings is reeds aangewend om gene vir apomiksie vanaf die wilde spesies na die verboude vorms oor te dra (Hanna et al., 1992; Ozias-Akins et al., 1992). Apomiksie sal dit vir telers moontlik maak om plante presies te manipuleer. Dit sal die teler toelaat om heterosigotiese genotipes te ontwikkel met hoë produktiwiteit en voortreflike kwaliteit, groeidiure, ens. wat reproduseerbaar is oor omgewings en seisoene (Asker & Jerling, 1992; Hermsen, 1980).

1.13 Kruising van *Thinopyrum disticum* en tetraploïede rog.

In 'n vorige studie het Marais et al. (1998) kruisings tussen *Thinopyrum disticum* en *Secale cereale* (verboude rog) gemaak met die doel om te sien of die soutverdraagsaamheids gene van *Th. disticum* uitgedruk word in die aanwesigheid van die rog genoom. Die ontwikkeling van die plant materiaal in daardie studie was soos volg. Oor 'n tydperk van omtrent vier weke tydens die lente en somer van 1993/94 en 1994/95 is are gesny van *Thinopyrum disticum* plante wat (i) wild voorkom in die omgewing van die Strand en (ii) in 'n glashuis gekweek is vanaf sade wat versamel is by Oos-Londen, Suid-Afrika (Marais et al., 1998). Die are is ontman en bestuif met diploïede of tetraploïede rog (beide van die 'Henoeh' kultivar). Slegs twee hibriede embrios vanaf die tetraploïede rog kruisings kon gered word. Die gedeeltelike haploïede hibriede (genome $J_1^d J_2^d RR$ met 28 chromosome en die *Thinopyrum* sitoplasma) is aangedui met die kruisingsnommer, 95M1 (Figuur 1.5). Die hibriede is baie groeikragtig en het goed-ontwikkelde wortelsisteme, nuwe spruite word deurlopend gevorm en die plante kan maklik onderhou word deur klonering en is dus waarskynlik meerjarig. Die F_1 -hibried was hoogs soutverdraagsaam, maar manlik steriel.

In die somer van 1995/96 het die manlik-steriele 95M1-plante 'n lae persentasie, goed ontwikkelde en skynbaar apomiktiese F_2 -sade geproduseer. Apomiksie was waarskynlik ter sprake omdat daar geen rogstuifmeel in die omgewing was nie. Dit is egter nie duidelik watter tipe deling aanleiding kon gee tot die gedeeltelik gereduseerde chromosoom getalle nie. Agt-en-twintig F_2 -sade is ontkiem en wortelpunt chromosoom-tellings het gewissel tussen 20-22. Met behulp van die C-band tegniek en RAPD-analises is daar bepaal dat die apomiktiese F_2 -genoom uit min of meer twee volledige rog-genome bestaan en die res uit 'n lukrake kombinasie van *Thinopyrum* chromosome (Marais et al., 1998). F_2 -plante is gekloon en die klone is getoets vir soutverdraagsaamheid. Die graad van soutverdraagsaamheid het gewissel vanaf plante wat baie sensitief is, tot plante wat net so soutverdraagsaam was soos die 95M1 primêre hibried. Die F_2 -plante het ook baie in lengte gewissel (Tabel 2.1). In die somer-maande van 1997/98 is diploïede 'Henoeh' rog tussen die 95M1-plante geplaas. 'n Groot getal geslagtelike-sade (T_1F_1) is geproduseer (Figuur 1.5).



Dit lyk of die plante twee stabiele R-genome het plus 'n
 lukrake stel van ongeveer 7 $J_1^d -J_2^d$ chromosome. Die F_2 -en
 T_1F_1 -plante is gebruik om *Thinopyrum* chromosome met gene
 vir soutverdraagsaamheid te identifiseer (RAPDs).

FIGUUR1.5 Oorsprong van *Thinopyrum distichum* en 4x 'Henoeh' rog hibriede en
 nageslagsderivate en die aanwending daarvan vir die opspoor van *Thinopyrum* chromosome wat
 bydra tot soutverdraagsaamheid.

Marais en Marais (2001, ongepubliseerde data) het 'n stel van 15 hoogs
 soutverdraagsame T_1F_1 -plante by wyse van C-band kleuring ontleed en die *Thinopyrum*
 chromosome in elk bepaal. Die data het hulle in staat gestel om die 14 J^d chromosome te
 orden in 7 homoeoloë pare. Hulle poeg tans om die homologie van die chromosoompare
 relatief tot die *Triticum* chromosome te bepaal. Uit die data kon hulle ook 'n aanduiding kry
 van watter chromosome primêr by die bepaling van soutverdraagsaamheid betrokke is.

1.14 Doelstelling.

Die spesifieke doelwitte van die huidige studie was dus om:

- (i) 'n Groep F_2 -plante en T_1F_1 -sade te karakteriseer ten opsigte van soutverdraagsaamheid en RAPD polimorfismes.
- (ii) Om die data te gebruik om *Thinopyrum* chromosome met gene vir soutverdraagsaamheid te identifiseer.
- (iii) Om die F_2 - en T_1F_1 -plante ook te sif vir blaarwaterretensie vermoë as 'n seleksie maatstaf vir soutverdraagsaamheid.
- (iv) 'n Sub-populasie van (i), van soutverdraagsame plante wat deur Marais en Marais (2001, ongepubliseerde data) ontwikkel is, ook te karakteriseer met behulp van AFLPs en geselekteerde RAPD merkers in 'n verdere poging om merkers vir kritieke chromosome te vind.

2. MATERIAAL EN METODEDES

2.1 Plant materiaal.

Populasie A: Vir die doeleindes van hierdie studie is 100 van die 95M1 x 2x rog T_1F_1 - sade ontkiem en sestig van die mees groeikragtiges is gekloon. Die T_1F_1 -plante tesame met 10 plante van apomiktiese oorsprong (Tabel 2.1), is gebruik in 'n poging om RAPD merkers te vind wat assosieer met *Thinopyrum* chromosome wat gene dra vir soutverdraagsaamheid.

TABEL 2.1 F_2 -plante van skynbaar apomiktiese oorsprong wat verskil in hoogte en soutverdraagsaamheid en gekarakteriseer is deur Marais et al. (1998). Soutverdraagsaamheid is bepaal soos beskryf in hoofstuk 2.2.2 en Tabel 2.4.

F_2 -Plante	Hoogte (cm)	Soutverdraagsaamheid
95M1 – 9	75	2; 2
95M1 –11	145	2; 4
95M1 –10	115	3; 5
95M1 – 1	150	4; 6
95M1 –20	85	4; 4
95M1 –17	85	4; 6
95M1 –19	80	7; 5; 4
95M1 –15	205	7; 5
95M1 –21	145	7; 6; 6
95M1 –18	200	6; 7; 5

Populasie B: In die somer 2000/2001 is 'n aantal T_1F_1 (95M1/Henoch) sade ontkiem en die saailinge onderwerp aan saailing souttoetse. Die oorlewende, skynbaar soutverdraagsame plante is toegelaat om te herstel, gekloon en onderwerp aan volwasse plant souttoetse (soos beskryf in 2.2.2). Op die wyse is tien T_1F_1 -plante met hoë vlakke van soutverdraagsaamheid uiteindelik geselekteer (Marais, 2000, ongepubliseerde data). Die 10 plante is saam met 6 T_1F_1 -plante (mees verdraagsame plante uit die materiaal wat benut is in RAPD analises, Tabel 2.2), positiewe (95M1) en negatiewe ("Henoch") kontroles gebruik vir AFLP analises.

Tabel 2.2 T₂F₁-plante met hul soutverdraagsaamheid.

T ₂ F ₁ -plante	Soutverdraagsaamheid
95M1-304	7 ; 7 ; 6.5
95M1-308	6.5 ; 6.5 ; 6.5
95M1-79	6 ; 6.5 ; 5
95M1-302	6 ; 6 ; 6
95M1-300	6 ; 7 ; 5
95M1-301	7 ; 7 ; 4
95M1-305	6.5 ; 6 ; 5
95M1-306	6 ; 5 ; 6.5
95M1-303	6.5 ; 6.5 ; 4
95M1-307	6.5 ; 6 ; 5
95M1-21	7 ; 5 ; 5
95M1-95	6 ; 5 ; 5
95M1-109	7 ; 5 ; 3
95M1-310	6.5 ; 2 ; 5
95M1-18	6 ; 4 ; 3
95M1-123	5 ; 5 ; 3

2.2 Soutverdraagsaamheid van die *Thinopyrum distichum* tetraploïede rog hibriede en terugkruisingsderivate.

2.2.1 Ontkieming en voorbereiding van die T₁F₁- en F₂-plante vir souttoetsing en DNA-ekstraksie (Populasie A).

100 T₁F₁ -sade is in 2 liter potte geplant, toegelaat om te ontkiem en te groei vir vier weke onder kweekhuis toestande. Terselfdertyd is daar ook 'Hench' rog sade geplant om te dien as sout-sensitiewe kontrole. Klone van die primêre hibried, 95M1, asook die F₂ -plante van Tabel 2.1 word reeds vir verskeie jare as klone onderhou. Die sestig sterkste T₁F₁ -plante, die tien F₂ -plante gelys in Tabel 2.1, die primêre amfiploïed (95M1 = soutverdraagsame kontrole) en die diploïede 'Hench' rogplante (soutgevoelige kontrole) is vervolgens gekloon vir souttoetse. Vir elke genotipe is twee tot vier potte berei, elk waarvan twee gekloonde plante bevat het. Drie gate (5 mm in deursnee) is op 'n hoogte van 3 cm in elke pot geboor om doeltreffende dreinerings te verseker, en elke pot is $\frac{3}{4}$

gevol met growwe riviersand. Die klone is toegelaat om vir vier weke te vestig en die plante was gemiddeld in die vroeë stoelstadium (stadium 4 volgens Trottman 1987) met die aanvang van die soutbehandeling.

2.2.2 Soutverdraagsaamheidstoets.

Die toetse is uitgevoer in 'n waterverkoelde glashuis met veranderlike dag en nag temperature wat nooit 30°C oorskry het nie. Die standaard voedingsoplossing het die volgende bevat (per 100 liter): Kynoch Sol-u-fert (164g), Microplex (2g), Kalsiumnitraat (77 ml van 'n 180g/l en 125g/l oplossing). Die elektriese konduktiwiteit (EC) van die standaard voedingsoplossing was ≈ 1.8 dS/m. Die soutinhoud van die voedingsoplossing is tweedaaglik verhoog met 4dS/m deur gelyke hoeveelhede NaCl en CaCl₂ daarin op te los (Tabel 2.3).

Elke pot het 2l van die toepaslike sout-oplossing in deelvolumes van 500ml ontvang wat volledige verplasing van die vorige oplossing verseker het. Met bereiking van 'n elektriese konduktiwiteit van 34 dS/m, is hierdie vlak gehandhaaf totdat die soutsensitiewe kontroles ('Hench' rog) begin doodgaan het. Daaglikse toediening van klein hoeveelhede water is gedoen om te kompenseer vir waterverlies deur verdamping en transpirasie. Sodra die soutsensitiewe kontroles doodgegaan het, is die toetsplante vergelyk met die kontroleplante en beoordeel volgens 'n empiriese skaal van 1-9 (Tabel 2.4).

TABEL 2.3 Elektriese konduktiwiteit van die voedingsoplossings gebruik in die soutbehandeling.

Dag	Benaderde EC (dS/m)	Gewig (NaCl en CaCl ₂ elk) (g/20l)
1	1.8	0
3	6	20
5	10	45
7	14	68
9	18	96
11	22	123
13	26	153
15	30	185
19	34	216
26	34	216
33	34	216
40	34	216
47	34	216

TABEL 2.4 Metings van soutverdraagsaamheid volgens 'n empiriese skaal.

Skaal	Vergelyking
1 (Uiters gevoelig)	'Henoeh' rog
2	
3 (Gevoelig)	
4	
5 (Verdraagsaam)	95M1 (primêre <i>Th distichum</i> / 4x "Henoeh" amfiploïed)
6	
7 (Baie verdraagsaam)	
8	<i>Th disticum</i>
9 (Hoogs verdraagsaam)	

2.3 Chromosoomtellings op T₁F₁-plante (Populasie A).

Twee weke na plant, is die chromosoomgetalle van die T₁F₁-sade bepaal. Twee of meer wortelpunte, elk 1 tot 2 cm lank, is met 'n skoon skêr geknip en in skoon, genommerde, 18mm x 50mm botteltjies bevattende 4-5ml koue, dubbel gedistilleerde water geplaas. Wortelpunte is normaalweg tussen 08h00 en 10h30 gesny. Die botteltjies met wortelpunte is vervolgens op gebreekte ys in 'n polistireenhouer geplaas en vir 29 uur gestoor in 'n koelkamer met 'n temperatuur van 4°C. Die water is die volgende dag tussen 13h00-15h00 afgesuig en die wortels gefikseer in 2ml, vars aangemaakte fikseermiddel (3 dele metanol : 1 deel propioonsuur). Die wortels is vir ten minste 2 dae gelos by kamertemperatuur. Die fikseermiddel is daarna afgesuig en vervang met 5ml gedistilleerde water vir 30 minute. In die tyd is botteltjies met 1N HCl verhit tot 60°C in 'n verhitingsblok. Die wortels is oorgedra na die 1N HCl by 60°C vir 7½ min. Hierna is die wortels oorgedra na gedistilleerde water vir 1-2 min om die hidrolise van die DNA te stop. Die gedistilleerde water is vervang met 1ml leuko-basiese fuchsien (aangemaak volgens Darlington en La Cour, 1960) en in 'n yskas gestoor vir 2 ure. Hierna is die leuko-basiese fuchsien afgesuig en die wortels twee maal gespoel met gedistilleerde water vir 1-5 min. Die wortels is toe oorgeplaas in natriumasetaat buffer (3,16 g natriumasetaat en 3,47 ml ys-asynsuur in 1 liter gedistilleerde water, pH= 4,5). Die buffer-oplossing is verplaas met 1-2ml gefiltreerde 2½% 'pecticlear' oplossing (0,5g 'pecticlear' vanaf Serevac en 0,2g peptone in pH 4,5 natriumasetaat buffer oplossing) vir 30 min by 37°C. Die 'pecticlear' oplossing is afgesuig en die wortels is gestoor in gedistilleerde water in 'n yskas.

Die gekleurde wortelpunt is afgesny en op 'n skoon voorwerpglasie geplaas in 'n druppel Rosner 1% asyn-karmyn (voorbereiding van die 1% asyn-karmyn: 1g karmyn in 55ml gedistilleerde water waarby 45ml ys-asynsuur bygevoeg is na 5 minute. Die oplossing is stadig gekook in 'n reflux-kondenseerder vir 4 ure en gefiltreer wanneer koud. Die wortelpunt is fyn gedruk met 'n houtstampertjie en met 'n dekglasie bedek. Die voorwerpglasie is in gevoude filtreerpapier geplaas en saggies gedruk om die oortollige asyn-karmyn te verwyder. Die chromosome is daarna getel onder 100x- vergroting met 'n groen filter in die filterhouer.

2.4 DNA-ekstraksie van die T₁F₁- en F₂-plantmateriaal (Populasies A en B).

DNA-ekstraksies is gebaseer op 'n gewysigde protokol van Doyle en Doyle (1990). Gevriesdroogde blare is gebruik. Blaarmonsters is geknip ongeveer drie weke na ontkieming. Nadat die blaarweefsel met vloeibare stikstof gevries is, is die monsters in 'n vriesdroër geplaas vir 5 dae. Ongeveer 500 mg van die gevriesdroogde blare is fyngemaal en 10 ml, vooraf-verhitte (60°C) CTAB (1.4M NaCl, 0.2% v/v beta-merkaptotoetanol, 20mM EDTA, pH 8.0 en 100mM Tris-HCl, pH 8.0) is bygevoeg. Die monsters is vir 60 min by 60°C (waterbad) ge-inkubeer. Na ekstraksie met 1 volume chloroform-isoamiel alkohol (24:1 v:v) is die monsters versigtig maar deeglik gemeng en vir 10 min by 5000rpm (kamertemperatuur) gesentrifugeer. Die waterige oplossing is oorgedra na 'n skoon sentrifugebuis en 2/3 volume yskoue isopropanol is bygevoeg en versigtig gemeng om die nukleïensure te presipiteer. Die monsters is toe vir 60 min by -20°C ge-inkubeer en daarna vir 10 min by 5000rpm (10-25°C) gesentrifugeer. Die bolaag is afgegooi en die sentrifugaat is vir ten minste 20 min met 15ml wasbuffer (76% etanol en 10mM ammoniumasetaat) gewas. Die suspensie is vir 10 min by 12000rpm afgeswaai, die bolaag is afgegooi en die sentrifugaat is gedroog. Die droë sentrifugaat is geresuspendeer in 1ml gedistilleerde water en 1µl Rnase (10mg/ml) is bygevoeg, waarna dit vir 30 min by 37°C ge-inkubeer is. Die oplossing is toe met 2 volumes gedistilleerde water (2ml) verdun en 1ml 7.5M ammoniumasetaat (pH 7.7) en 2.5 volumes koue etanol (10ml) is bygevoeg en versigtig gemeng vir die presipitering van die DNA. Hierna is die suspensie vir 10 min by 12000 rpm afgeswaai, gedroog en weer gesuspendeer in 1ml gedistilleerde water. Die monster is oorgedra na 'n 2.2ml-sentrifugebuis en 500µl fenol en 500µl chloroform:isoamielalkohol (24:1 v/v) is bygevoeg waarna dit versigtig gemeng is. Na sentrifugasie vir 10 min by 12000rpm is die bolaag oorgedra na 'n nuwe 2.2ml-

sentrifugebuis. Een ml chloroform:isoamielalkohol (24:1 v/v) is bygevoeg en vir 10 min by 12000rpm gesentrifugeer. Die DNA is gepresipiteer met 1/5 volume 10M ammoniumasetaat en 2 volumes 100% etanol vir 60 min by -20°C. Na sentrifugering vir 35 min by 12000rpm (4°C) is die bolaag afgetrek en 1ml, 70% etanol is bygevoeg. Na sentrifugasie (4°C) vir 30 min by 12000rpm (die stap herhaal) is die sentrifugaat gedroog in 'n 37°C-oond en geresuspendeer in 150µl gedistilleerde water.

Die genomiese DNA-konsentrasie is bepaal met 'n Hoefer DynaQuant 200 Fluorometer en bevestig met behulp van 0.6% agarose gel (0.5 x TBE laaibuffer) onder 'n ultravioletlig.

2.5 Analise van lukraak-geamplifiseerde polimorfiese DNAs (RAPDs, Populasies A en B).

2.5.1 Inleiers.

Sintetiese oligonukleotied inleiers met lukrake volgordes is beskikbaar vanaf "Operon TechnologiesTM" (Alimede, Kalifornië) en word versprei as inleier stelle met 20 inleiers per stel. Die 60 inleiers wat getoets is op die F₂-en T₁F₁-lyne, se volgorde data word in Tabel 2.5 gelys.

TABEL 2.5 Volgorde data van die 60 Operon inleier stelle.

Inleier Kode OPA-stel	Volgorde 5' tot 3'	Inleier Kode OPK-stel	Volgorde 5' tot 3'
OPA 1	CAGGCCCTTC	OPK 1	CATTCGAGCC
OPA 2	TGCCGAGCTG	OPK 2	GTCTCCGCAA
OPA 3	AGTCAGCCAC	OPK 3	CGAGCTTAGG
OPA 4	AATCGGGCTG	OPK 4	CCGCCCAAAC
OPA 5	AGGGGTCTTG	OPK 5	TCTGTGCGAGG
OPA 6	GGTCCCTGAC	OPK 6	CACCTTTCCC
OPA 7	GAAACGGGTG	OPK 7	AGCGAGCAAG
OPA 8	GTGACGTAGG	OPK 8	GAACACTGGG
OPA 9	GGTAACGCC	OPK 9	CCCTACCGAC
OPA 10	GTGATCGCAG	OPK 10	GTGCAACGTG
OPA 11	CAATCGCCGT	OPK 11	AATGCCCCAG
OPA 12	TCGGCGATAG	OPK 12	TGGCCCTCAC
OPA 13	CAGCACCCAC	OPK 13	GGTTGTACCC
OPA 14	TCTGTGCTGG	OPK 14	CCCGCTACAC
OPA 15	TTCCGAACCC	OPK 15	CTCCTGCCAA
OPA 16	AGCCAGCGAA	OPK 16	GAGCGTCGAA
OPA 17	GACCGCTTGT	OPK 17	CCCAGCTGTG
OPA 18	AGGTGACCGT	OPK 18	CCTAGTCGAG
OPA 19	CAAACGTCGG	OPK 19	CACAGGCGGA
OPA 20	GTTGCGATCC	OPK 20	GTGTCGCGAG

TABEL 2.5 (Vervolg)

Inleier kode OPL-stel	Volgorde 5' tot 3'
OPL 1	GGCATGACCT
OPL 2	TGGGCGTCAA
OPL 3	CCAGCAGCTT
OPL 4	GACTGCACAC
OPL 5	ACGCAGGCAC
OPL 6	GAGGGAAGAG
OPL 7	AGGCGGGAAC
OPL 8	AGCAGGTGGA
OPL 9	TGCGAGAGTC
OPL 10	TGGGAGATGG
OPL 11	ACGATGAGCC
OPL 12	GGGCGGTACT
OPL 13	ACCGCCTGCT
OPL 14	GTGACAGGCT
OPL 15	AAGAGAGGGG
OPL 16	AGGTTGCAGG
OPL 17	AGCCTGAGCC
OPL 18	ACCACCCACC
OPL 19	GAGTGGTGAC
OPL 20	TGGTGGACCA

2.5.2 Amplifikasie.

RAPDs is baie sensitief vir kontaminasie en dus is al die RAPD-reaksies uitgevoer in 'n laminêre vloeikabinet. Die RAPD-amplifikasie-reaksies is uitgevoer in ge-outoklaveerde 0.5 ml dun-wand PCR-reaksie buise. Optimale amplifikasie fragmente is verkry met 15ng templaar-DNA en 10 pmol inleier in 'n 25µl reaksie-mengsel. Buffer ("Advanced Biotechnologies", Londen) is bygevoeg tot 'n finale konsentrasie van 10% van die reaksie-volume (2,5µl). Die buffer bevat 160 mM (NH₄)₂SO₄, 670mM Tris-HCl (pH 8.8 by 25°C) en 0.1% Tween-20. Saam met die 2.5 mM van elke deoksinukleotiedtrifosfaat (dNTPs), is 2.5 mM MgCl₂ en 0.5 eenhede AB *Taq* DNA-polimerase ("Advanced Biotechnologies", Londen) gebruik in die reaksie-mengsel. Die program van die amplifikasie-siklus was soos

volg: 60 sek. by 94°C, 20 sek. by 35°C en 60 sek. by 72°C vir 45 siklusse en eindig met 'n 10 min siklus by 72°C om die onvoltooide fragmente te voltooi.

Na die amplifikasie-reaksie is 20µl van die RAPD-amplifikasie produk en 5.0 µl 'blue' laaibuffer tipe IV (0.25% bromofenol blou en 40% m/v sukrose in water – Sambrook et al. 1989) gelaai op 'n 1.4% LE agarose gel. Die loopbuffer het bestaan uit 0.5 x TBE (5 x TBE per liter: 54g Tris-basis, 27.5g boorsuur en 20ml 0.5M EDTA pH 8.0) en ethidiumbromied (10 µl/dm³) en die gel is geloop teen 100 Volt vir 2½ -3 ure. Die RAPD-produkte is gevisualiseer met 'n "ultraviolet transilluminator" (UVP Inc) of 'n "Biorad Gel Doc 1000" sisteem.

2.6 Analise van geamplifiseerde fragment lengte polimorfisme (AFLP, Populasie B).

2.6.1 Inleiers

Die inleiers wat gebruik is word gelys in Tabel 2.6. en is verkry vanaf GIBCO/BRL. 'n Totaal van 22 inleier kombinasies is gebruik om molekulêre merkers te identifiseer wat geassosieer kan word met soutverdraagsaamheidsgene in *Th. distichum* en die resultate te vergelyk met die C-band studies van die chromosome (Marais et al. 2001, ongepubliseerd).

2.6.2 Amplifikasie.

AFLPs is uitgevoer volgens die protokol van Zabeau & Vos (1993) soos aangepas deur Donini et al (1997). Templaats DNA (500ng) is verteer met 5U *Sse* 8387I (Pharmacia) en 5U *Mse* (New England Biolabs) in 'n volume van 40µl. Die mengsel is ge-inkubeer vir 3 ure by 37°C voor ligering met 5 pmol *Sse* aansluiters en 5 pmol *Mse* aansluiters. Die monsters is oornag ge-inkubeer by 37 °C.

Amplifikasie is uitgevoer met 'n "Hybaid Omnigene Cyclor". 'n 1:9 verdunning in 1xTE_{0.1} van die voor-amplifikasie produk is geamplifiseer met *Sse* en *Mse* inleiers. Na 'n 10x verdunning van die PCR produk, is 5µl gebruik vir 'n tweede PCR met *Mse*+2 of *Mse*+3 en *Sse*+1 of *Sse*+2 oligomeer inleiers. Die *Sse* inleiers is met [γ - ³³P]ATP (Vos et al. 1995)

gemerk. Gedenatureerde, gemerkte PCR produk (5μ) is gelaai op 'n 6% poliakriëlamied gel (6M ureum in 1xTBE buffer) en ge-ektroforeer in 1x TBE buffer teen 80W vir omtrent 3 uur. Die gel is gedroog op Whatmann 3MM papier vir $1\frac{1}{2}$ uur by 80°C . Die gedroogde gel is blootgestel aan Biomax MR negatiewe (Kodak) vir 5 dae en dan ontwikkel.

Tabel 2.6 Sse en Mse inleier kombinasies van die AFLP-merker versameling.

	S02-C	S04-T	S12-AC
M11-AA		+	
M12-AC		+	
M13-AG		+	
M14-AT		+	+
M15-CA		+	+
M16-CC		+	
M17-CG		+	+
M18-Ct		+	+
M19-GA	+	+	+
M21-GG	+	+	
M22-GT		+	
M32-AAC	+	+	
M53-CCG		+	
M74-CGT		+	
M88-TGC	+	+	
M90-TGT	+	+	

2.6 Blaar waterretensie as 'n seleksie maatstaf vir soutverdraagsaamheid (Populasie A).

Volledig ontwikkelde vlagblare van die F_2 - en T_1F_1 -plante, saam met 95M1 en 'Hench' rog, is tussen 08h00 en 10h00 geknip. Die vars gewig (g) van elke blaar (drie blare van elke genotipe per herhaling) is gemeet en die blare is dan vir 24 uur aan 'n droograk in die laboratorium by kamertemperatuur gehang. Die laboratoriumtemperatuur was konstant ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) vir die duur van die eksperiment. Die blare is weer geweeg en toegelaat om nog 24 uur in die laboratorium te hang, waarna dit weer geweeg is. Die blare is daarna in 'n oond (45°C) vir 24 uur gedroog en geweeg (droë gewig). Die persentasie waterretensie na

24 uur en na 48 uur is bereken. Die prosedure is 2 keer (verskillende geleenthede) herhaal met die volle stel genotipes.

2.7 Korrelasie analises.

Eenvoudige korrelasie analises van die merker genotipes is gebruik om die koëffisiënt van bepaling (R^2) vir elke verwantskap te kry en die proporsie van die totale fenotipiese variansie wat deur elke merker verklaar word, te bepaal. Al die berekeninge is uitgevoer op 'n sigblad met 'n Microsoft® Excel 97 program.

3. RESULTATE

3.1 Karakterisering van T₁F₁- en F₂-plante ten opsigte van soutverdraagsaamheid en chromosoomtellings van (Populasie A).

100 T₁F₁-sade is ontkiem en 67 van die mees groeikragtiges is gekloon en saam met 10 plante van apomiktiese oorsprong (Tabel 2.1) gesouttoets. Die oorspronklike *Th. distichum* / "Henoeh" hibried (95M1, hoogs soutverdraagsaam) en "Henoeh" (sout sensitief) is ingesluit as kontroles. Die chromosoomgetalle van die T₁F₁- en F₂-plante word weergegee in Tabel 3.1. Die meeste van die plante (75%) het 21 chromosome gehad terwyl die origes onderskeidelik 22,20,19 of 18 chromosome gehad het en sommige F₂-plante se chromosoomgetalle is hierna verdubbel deur kolgisien behandeling. Dit lyk of die T₁F₁-plante meestal twee stabiele R-genome het plus 'n lukrake stel van ongeveer 7 J₁^d - J₂^d chromosome.

Toe die gekloonde plante hul vroeë vlagblaar stadium bereik het, is 2 tot 4 herhalings, saam met die kontroles, blootgestel aan stelselmatige verhoogde soutkonsentrasies (Tabel 2.2). "Henoeh" was die gevoeligste lyn. Eerste tekens van sout skade word reeds waargeneem by 'n EC van 14. Verskille in sout-gevoeligheid was duidelik sigbaar by 34 dSm⁻¹ waar die meeste soutgevoelige plante begin afsterf en blaar-verbruining toon. Ongeveer 30-40 dae na aanvang van die eksperiment het die soutsensitiewe, "Henoeh," kontroles heeltemal afgesterf. Die res van die plante kon toe volgens verskillende grade van soutverdraagsaamheid geklassifiseer word met behulp van 'n empiriese skaal (Tabel 2.3) deur hulle te vergelyk met die soutverdraagsame kontrole (95M1). Omdat al die plante steriel is, en elk 'n lukraak groep van ongeveer 7 *Thinopyrum* chromosome besit, moes souttoetsing gebaseer word op klone. Vanweë die uiteenlopende groeiwyses en planttipes wat betrokke was, was dit nie moontlik om 'n volledige stel klone gelyktydig te toets nie. Die klone is daarom in sewe subgroepe ge-evalueer. Die klone binne 'n subgroep was nagenoeg in dieselfde groeistadium met die aanvang van souttoetsing. Vir elke genotipe binne 'n subgroep was daar minstens 2 herhalings.

Die soutverdraagsaamheid van die T₁F₁- en F₂-plante het baie gevarieer, van 2 tot 7 (Tabel 3.1). Die variasie kan primêr toegeskryf word aan die bydrae van verskillende *Th. disticum* chromosome wat op 'n lukrake manier behou is saam met die rog chromosome.

Die waargenome variasie kan verder verklaar word in terme van die heterogeniteit tussen die plante ten opsigte van die rog chromosome wat hulle besit. Na die oorspronklike wye kruising is die eerste terugkruising na 'Henoeh' rog gedoen met stuifmeel van verskillende rog genotipes. Rog is 'n kruisbestuivende gewas met 'n selfonverenigbaarheids meganisme en is hoogs heterogeen. Dit kan ook verwag word dat die soutverdraagsaamheidsmetings 'n eksperimentele foutkomponent sal insluit. Vanweë die aard van die materiaal en beperkte herhaling wat moontlik was, kon hierdie foutfaktor nie uitgeskakel word nie. Sewe van die 67 plante het gemiddelde lesings van 6 of 7 gehad; dus 10% van die getoetsde plante was baie soutverdraagsaam, 27 plante het lesings van 5.75 tot 4.5 gehad, met ander woorde 40% van die plante was verdraagsaam, 24 plante (36%) was gevoelig (lesings van 4.25 tot 2.25) en 10 plante (15%) was uiters gevoelig met lesings van 2. Daar kan dus afgelei word dat omtrent 50% van die getoetsde plante verskillende grade van soutverdraagsaamheid getoon het en omtrent 50% was soutgevoelig. Die soutverdraagsaamheidstoetse onderskei duidelik tussen hoogs soutverdraagsame plante en soutgevoelige plante.

3.2 Blaarwaterretensie.

Die primêre hibried (95M1) het die hoogste oorspronklike water inhoud in die blare (% van droë gewig) en ook die hoogste persentasie waterretensie (32%) getoon, gevolg deur genotipes 95M1-115 (29%), 95M1-64 (28%), 95M1-131 (26%), 95M1-126 (22%) en 95M1-79 (21%). In Figuur 3.1 word die plante met die hoogste persentasie waterretensie (in elke afsonderlike eksperiment) weergegee saam met die primêre hibried (95M1) en "Henoeh". Slegs 20 plante (30%) het 'n waterretensie van 10% of hoër gehad en 26 plante (40%) het 'n persentasie waterretensie van onder 5% gehad. Vyftien plante se waterretensie kon nie gemeet word nie as gevolg van die feit dat die plante nie herwin kon word na die soutverdraagsaamheidstoetse nie. Eenvoudige korrelasie analises het aangedui dat soutverdraagsaamheid en blaarwaterretensie goed met mekaar korreleer ($r=0.40$) met 'n p-waarde van 0.003849.

Epikutikulêre was speel 'n belangrike rol in plant-waterverhoudings. Die waslaag verlaag die tempo van transpirasie van die plant weefsel (Uddin & Marshall, 1988). In die

eksperiment is dieselfde gevind, die plante met 'n opmerklik digte epikutikulêre waslaag was ook die plante met die hoogste waterretensie (95M1-115; 95M1-64; 95M1-131; 95M1-95; 95M1-110; 95M1-44). Daar was egter ook uitsonderings waar die plant hoë blaarwaterretensie gehad het sonder 'n epikutikulêre waslaag (95M1-126; 95M1-79; 95M1-83) en plante met 'n epikutikulêre waslaag wat lae blaarwaterretensie gehad het (95M1-104; 95M1-20; 95M1-128).

Tabel 3.1 Soutverdraagsaamheidsdata, chromosoom getalle en persentasie blaarwaterretensie van die T₁F₁- en F₂-plante.

Lyn:	Sout: '	H ₂ O- Retensie:	Chromo- soomgetal:	Lyn:	Sout:gem.:	H ₂ O- Retensie:	Chromo- soomgetal:
95M1-79	7 (7;7;7;7)	21%	21	95M1-88	6.25 (7;6;6;6)	10.7%	21
95M1-104	6.25 (6.5;6)	8% *	21	95M1-110	6.25 (7;6;6;6)	20% *	21
95M1-91	6.13 (6;6.5;6;6)	3%	22	95M1-74	6 (7;6;6.5)	3%	20
95M1-124	6 (6;6)	16%	21	95M1-95	5.75 (6;6;6;5)	19% *	21
95M1-11	5.75 (6;6;6;5)	3%	42	95M1-21	5.75 (6;6;6;5)	18%	42
95M1-109	5.75 (6;6.5)	1%	21	95M1-123	5.75 (6;6;6;5)	8%	21
95M1-131	5.75 (6;6;6;5)	26% *	21	95M1-66	5.25 (6;5;5;5)	12%	21
95M1-18	5.25 (6;5;5;5)	17% *	?	95M1-101	5 (6;5;4;4)	12% *	21
95M1-87	4.75 (5;5;5;4)	11% *	21	95M1-1	4.75 (6;5;4;4)	16% *	?
95M1-20	4.75 (5;5;5;4)	4% *	?	95M1-128	4.75 (6;5;4;4)	6% *	21
95M1-134	4.75 (6;5;5;3)	0%	20	95M1-136	4.5 (5;4)	20% *	21
95M1-71	4.5 (5;5;4;4)	?	21	95M1-64	4.5 (5;5;4;4)	28% *	21
95M1-19	4.5 (5;5;4;4)	3%	42	95M1-57	4.25 (5;4;4;4)	4%	20
95M1-15	4.25 (5;4;4;4)	?	42/84	95M1-107	4.25 (5;4;4;4)	3%	20
95M1-115	4.25 (5;4;4;4)	29% *	21	95M1-89	4.25 (5;4;4;4)	1%	21
95M1-10	4 (5;4;4;3)	2%	42	95M1-114	4 (4;4;4;4)	11%	20
95M1-54	4 (4;4)	14% *	21	95M1-138	4 (4;4)	2%	18

Tabel 3.1 Vervolg

95M1-102	3.75 (4;4;4;3)	2%	21	95M1-47	3.75 (4;3;5)	?	21
95M1-52	3.5 (4;4;3;3)	2%	21	95M1-53	3.5 (4;3)	9%	21
95M1-116	3.5 (5;3;3;3)	2%	20	95M1-83	3.5 (4;3)	19%	20
95M1-137	3.5 (4;3)	3%	21	95M1-49	3.5 (4;3)	4%	20
95M1-44	3.5 (4;3)	20% *	20	95M1-51	3.25 (5;3;2;2)	?	21
95 M1-17	3.25 (4;3;3;3)	0%	42	95M1-86	3.25 (4;3;3;3)	?	19
95M1-72	3.13 (4;3.5;3;2)	13% *	22	95M1-94	3 (4;2)	1%	21
95M1-103	3 (3;3;3;3)	?	21	95M1-67	3 (3;3;3;3)	0%	21
95M1-42	3 (4;2)	?	21	95M1-113	3 (4;2)	1%	21
95M1-126	2.75 (3;3;3;2)	22%	21	95M1-93	2.75 (3;3;3;2)	?	21
95M1-105	2.75 (3;3;3;2)	?	20	95M1-108	2.5 (3;2)	0%	20
95M1-63	2.5 (3;3;2;2)	?	21	95M1-129	2.25 (3;2;2;2)	?	18
95M1-120	2 (2;2)	3%	18	95M1-92	2 (2;2;2;2)	1%	21
95M1-106	2 (2;2;2;2)	3%	21	95M1-99	2 (2;2;2;2)	1%	20
95M1-40	2 (2;2;2;2)	12% *	21	95M1-42	2 (2;2)	?	19
95M1-9	2 (2;2;2;2)	0%	40	95M1-85	2 (2;2)	1%	21
95M1-133	2 (2;2)	4%	20	95M1-55	2 (2;2)	?	21

* Epikutikulêre waslaag op die blaaroppervlakte

· Gemiddelde soutverdraagsaamheid gevolg deur die individuele metings (in hakies)

3.3 Identifisering van molekulêre merkers vir *Thinopyrum* chromosome wat bydra tot soutverdraagsaamheid.

3.3.1 RAPD analyses van die T₁F₁- en F₂-plante (Populasie A).

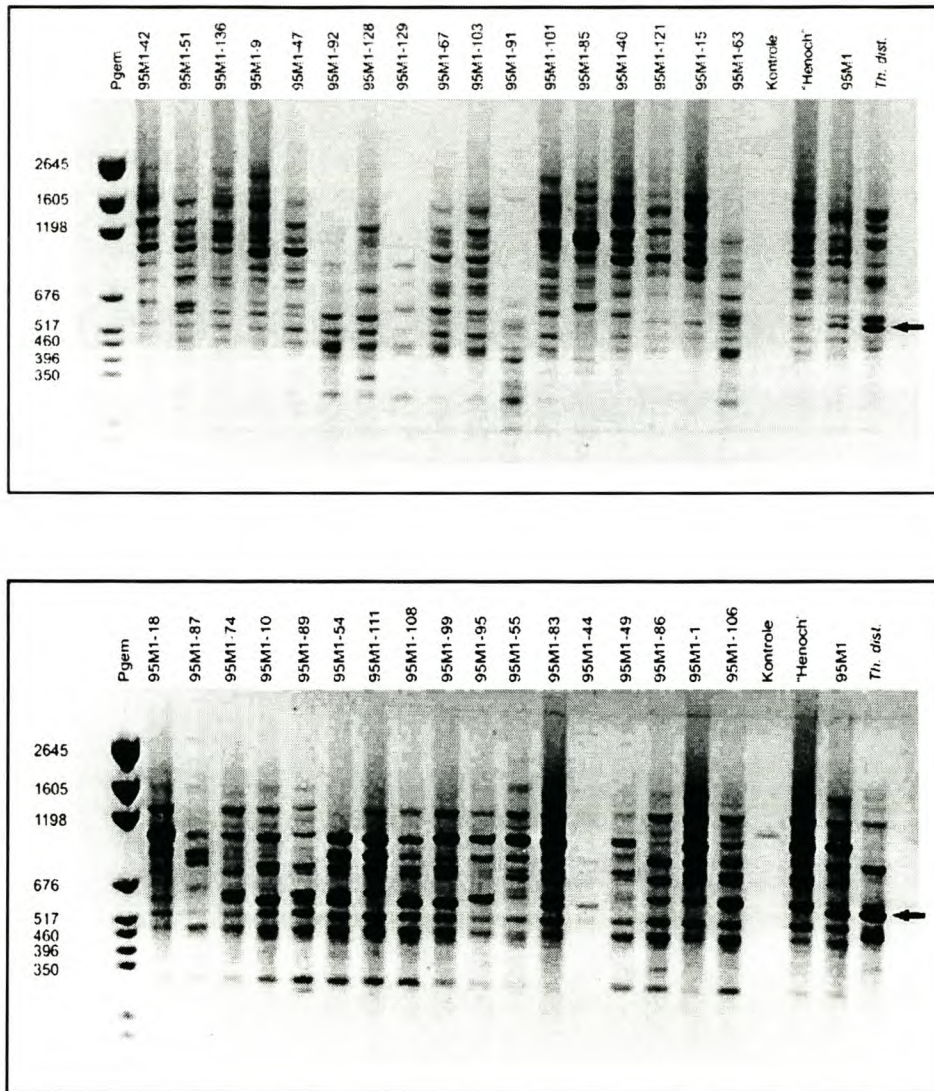
Sestig inleiers is gebruik vir die amplifikasie reaksies van populasie A en die amplifikasieprodukte is geskei met agarose gel elektroforese. PCR-fragmente is waargeneem met ethidium bromied onder 'n ultraviolet lig. Polimorfiese bande is geïdentifiseer as daardie bande wat in *Thinopyrum distichum* en die primêre hibried (95M1) teenwoordig is, maar nie in "Henoeh" nie. Twaalf inleiers het duidelike, ontleedbare polimorfiese fragmente opgelewer (Tabel 3.2), wat as moontlike merkers gebruik kan word vir die identifisering van chromosome wat bydra tot soutverdraagsaamheid.

Tabel 3.2 Opsomming van polimorfiese RAPD-fragmente.

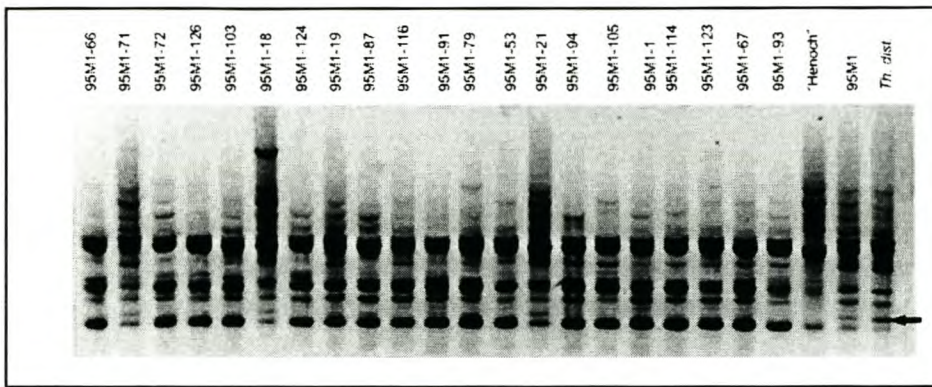
Inleier	Grootte (±bp)	Inleier	Grootte (±bp)
OPK 14	650	OPL 3	1400
OPK 17	650	OPL 4	1000
OPK 11	1020	OPL 5	500
OPK 6	1060	OPA 16	2300
OPK 1	400	OPA 18	670
OPL 17	1020	OPA 20	1060

Tussen 2 en 13 bande (gemiddeld 7) is verkry met Operon inleier stel K, tussen 5 en 16 bande (gemiddeld 10) met Operon inleier stel L en tussen 4 en 10 bande (gemiddelde 6) met Operon inleier stel A. Ongeveer 460 duidelik onderskeibare fragmente is geproduseer waarvan 12 (3%) fragmente polimorfies was.

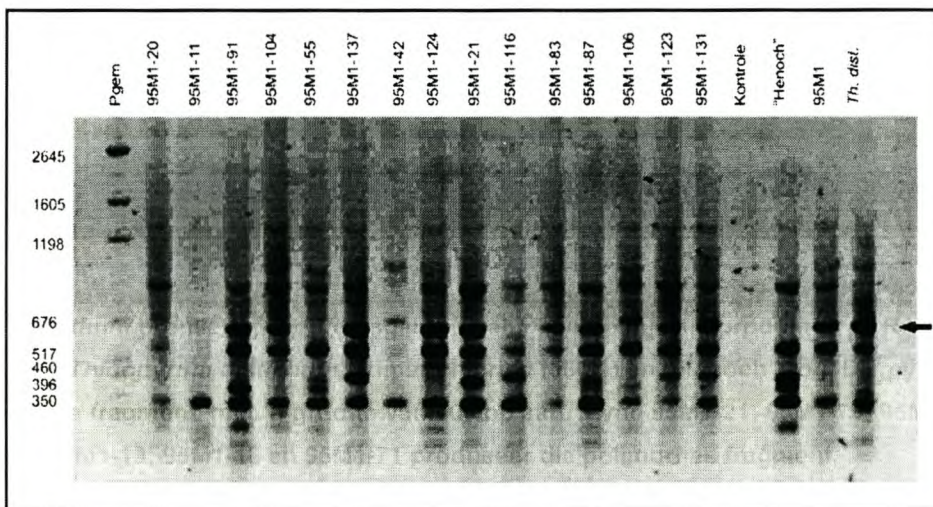
Die eerste polimorfisme is geïdentifiseer met RAPD-inleier OPK 14 (5'-CCCGCTACAC-3') en het 'n fragment geproduseer wat ongeveer 650 basispare groot is (Figuur 3.2). OPK-inleier 14 produseer polimorfismes by die 12 mees soutverdraagsame plante, maar ook by plante met middelmatige en lae soutverdraagsaamheid (Tabel 3.3).



Figuur 3.2 Ethidium bromied gekleurde agarose gel met amplifikasie produkte van RAPD inleier OPK 14 met *Thinopyrum distichum*, primêre hibried (95M1) en "Henoch" rog. Die pGem-leer gee 'n aanduiding van die relatiewe grootte van die verskillende fragmente. Die pyltjie dui die polimorfiese fragment met 'n grootte van 650bp aan. Lyne 95M1-18; 95M1-10; 95M1-54; 95M1-108; 95M1-99; 95M1-83; 95M1-44; 95M1-51; 95M1-136; 95M1-9; 95M1-92; 95M1-128; 95M1-67; 95M1-103; 95M1-21; 95M1-15 en 95M1-63 produseer die polimorfiese fragment.



Figuur 3.3 Ethidium bromied gekleurde agarose gel met amplifikasie produkte van RAPD inleier OPK 1 met *Thinopyrum distichum*, primêre hibried (95M1) en "Henoch" rog. Die pyltjie dui die polimorfiese fragment met 'n grootte van 400 bp aan. Lyne 95M1-21; 95M1-79; 95M1-91; 95M1-87; 95M1-19; 95M1-18 en 95M1-71 produseer die polimorfies fragment.



Figuur 3.4 Ethidium bromied gekleurde agarose gel met amplifikasie produkte van RAPD inleier OPK 17 met *Thinopyrum distichum*, primêre hibried (95M1) en "Henoch" rog. Die pGem-leer gee 'n aanduiding van die relatiewe grootte van die verskillende fragmente. Die pyltjie dui die polimorfiese fragment met 'n grootte van 650bp aan. Lyne 95M1-131; 95M1-123; 95M1-87; 95M1-83; 95M1-21; 95M1-124; 95M1-137; 95M1-104; 95M1-91; 95M1-138; 95M1-88; 95M1-110; 95M1-109; 95M1-18; 95M1-95 en 95M1-79 produseer die polimorfies fragment..

3.3.2 Korrelasie analyses.

Eenvoudige korrelasie analyses van die merker genotipes met soutverdraagsaamheid is gedoen om vas te stel watter merkers die beste met soutverdraagsaamheid korreleer. Die koëffisiënt van bepaling (R^2) vir elke verwantskap is gebruik om die proporsie van die totale fenotipiese variansie wat deur elke merker verklaar word te beraam (Tabel 3.4). Al hierdie verwantskappe was hoogs betekenisvol.

Tabel 3.4 Die koëffisiënt van bepaling en proporsie van variansie vir soutverdraagsaamheid verklaar deur elke polimorfiese merker.

Merker:	(R^2):	Variansie:	P-waarde:
OPA 18	0.162291207	16%	0.000798
OPA 20	0.110547947	11%	0.00638
OPK 14	0.157092173	15.7%	0.000986
OPK 17	0.222705289	22%	6.33E-5
OPK 1	0.175585491	17.5%	0.00462
OPL 17	0.138308703	13.8%	0.002107
OPL 5	0.137423296	13.7%	0.002184
OPA 16	0.132769008	13.3%	0.002632
OPL 3	0.071981443	7%	0.0294
OPL 4	0.183554699	18.3%	0.000332
OPK 11	0.058032646	5.8%	0.051357
OPK 6	0.050583455	5%	0.069434

Die korrelasie analyses dui aan dat OPK17 (22%) en OPL 4 (18.3%) die merkers is wat die grootste persentasie van die variansie vir soutverdraagsaamheid verklaar. Merkers OPL 3, OPK 11 en OPK 6 verskaf weer die minste inligting ten opsigte van soutverdraagsaamheid. Merkers wat sterker korreleer met soutverdraagsaamheid mag moontlik geamplifiseer word op *Thinopyrum* chromosome met gene vir soutverdraagsaamheid.

Korrelasie analyses van die merker genotipes met blaarwaterretensie is ook gedoen, maar geen betekenisvolle verwantskappe is verkry nie, behalwe OPA-inleier 20 wat 'n koëffisiënt van bepaling (R^2) van 9% (P-waarde 0.02545) gehad het.

3.3.3 AFLP analise van populasie B.

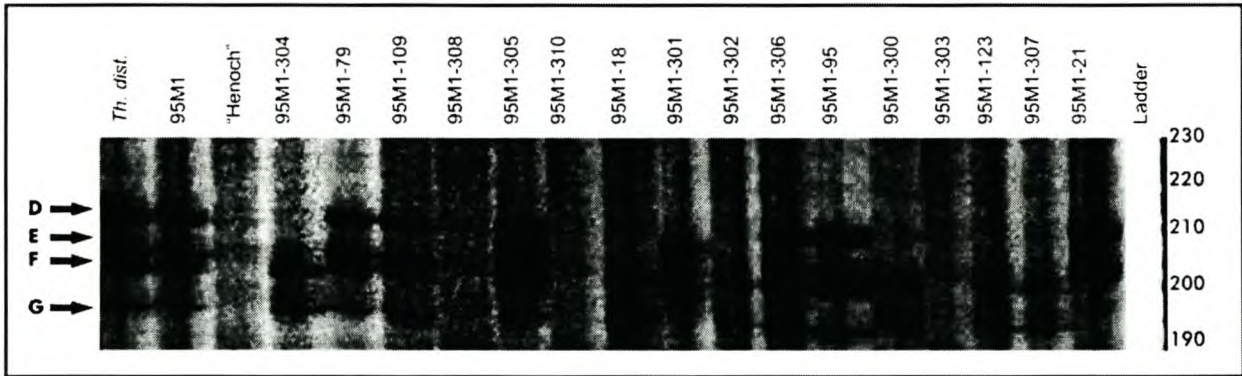
Twee-en-twintig AFLP inleier kombinasies is gebruik om polimorfiese bande te identifiseer tussen *Th. distichum*, die primêre hibried (95M1) en "Henoeh" rog (Tabel 3.5). Amplifikasie produkte is geskei op poli-akriëlamied gels en gevisualiseer met outoradiografie.

Tabel 3.5 Kombinasies van AFLP inleiers en die aantal polimorfismes verkry.

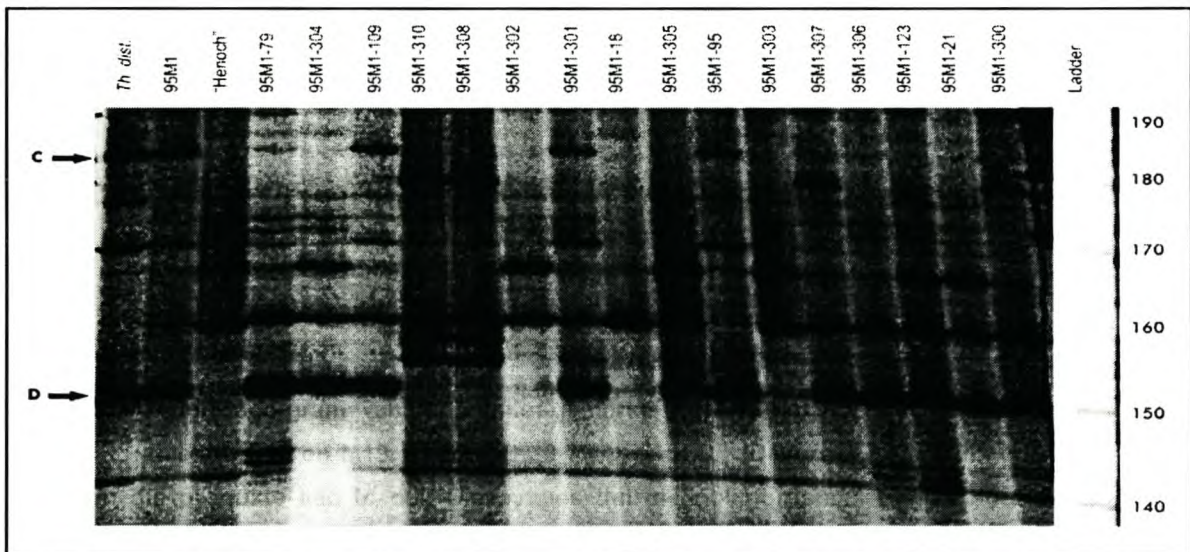
	Sse 8387I Selektiewe Inleiers		
	S02+C	S04+T	S12+AC
M11+AA		1	
M12+AC		3	
M13+AG		GEEN	
M14+AT		GEEN	4
M15+CA		GEEN	3
M17+CG		2	5
M18+CT			2
M19+GA	1	2	7
M21+GG	1		
M32+AAC	GEEN	1	
M53+CCG		4	
M74+GGT		5	
M88+TGC	3	6	
M90+TGT	2	2	
Aantal Polimorfismes	7	26	21

Agttien van die 22 AFLP-inleier kombinasies het polimorfiese fragmente gegenereer. Ongeveer 2000 duidelik onderskeibare fragmente is geproduseer waarvan 54 (3%) polimorfiese fragmente was. Kombinasies S04;Mse het gemiddeld 3 polimorfismes per kombinasie gelewer. Kombinasies S12;Mse het 4.2 polimorfismes per kombinasie gelewer. In laasgenoemde groep was kombinasie S12;M19 (Figuur 3.5) die suksesvolste en het dit alleen 7 polimorfismes getoon. Figuur 3.5 dui slegs 4 van die 7 polimorfismes

aan, maar daar kan duidelik onderskei word tussen die aan- of afwesigheid van die polimorfiese fragment. By polimorfisme D (± 210 bp) is dit duidelik dat lyne 95M1-79, 95M1-109, 95M1305, 95M1-306, 95M1-95 en 95M1-21 die fragment besit. Die minste polimorfismes is verkry met kombinasies So2;Mse, waar slegs 7 polimorfismes waargeneem is. 'n Opsomming van al die AFLP resultate word weergegee in Tabel 3.6.

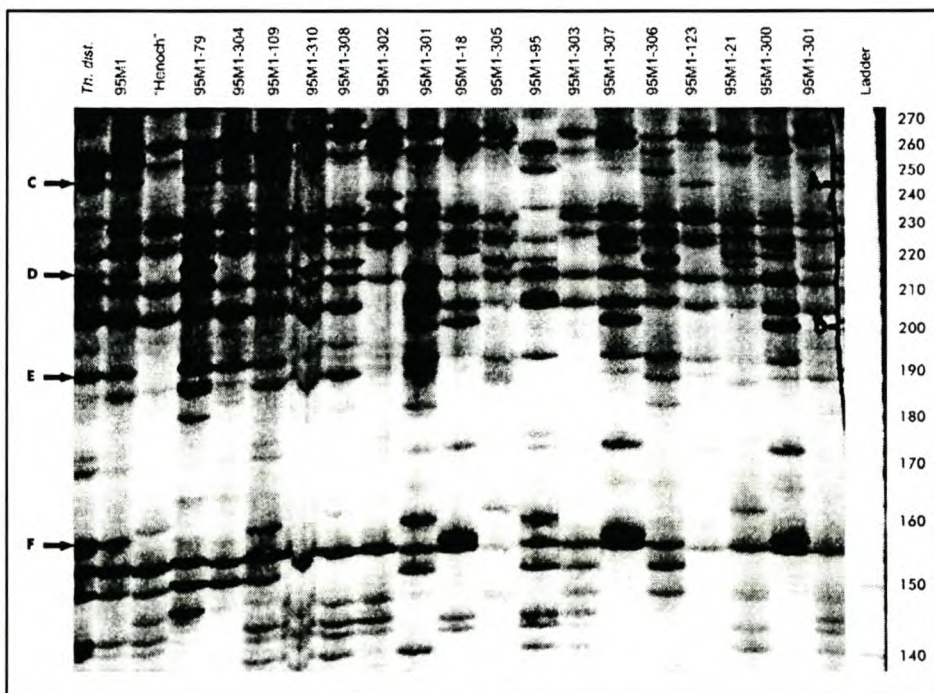


Figuur 3.5 Outoradiogram van radioaktief-gemerkte DNA-fragmente wat geamplifiseer is deur AFLP-inleiers S12 en M19. 'n GIBCO 30-330bp AFLP™ DNA leer is gebruik om die groottes van die produkte aan te dui. Die pyltjies dui die polimorfismes tussen soutverdraagsame oer, 95M1 en soutsensitiewe oer (Henoch) aan.



Figuur 3.6 Outoradiogram van radioaktief-gemerkte DNA-fragmente wat geamplifiseer is deur AFLP-inleiers S04 en M53. 'n GIBCO 30-330bp AFLP™ DNA leer is gebruik om die groottes van die produkte aan te dui. Die pyltjies dui die polimorfismes tussen soutverdraagsame oer, 95M1 en soutsensitiewe oer (Henoch) aan.

Twee duidelike polimorfismes word ook getoon in Figuur 3.6. Polimorfisme C van AFLP-inleier kombinasie S04 en M53 is 'n polimorfiese fragment (180bp) wat slegs teenwoordig is by *Th. distichum* en by 95M1, 95M1-301, 95M1-95, 95M1-79 en 95M1-109. Polimorfisme D toon ook duidelike variasie vir die aan- en afwesigheid van die fragment. Figuur 3.7 toon 'n gedeelte van die profiel gegenereer met die inleier kombinasie S04;M88. Vier duidelike polimorfiese fragmente is sigbaar. Plante 95M1-301, 95M1-95, 95M1-79 en 95M1-109 het byvoorbeeld 'n polimorfiese fragment (F) van 160bp. As daar gekyk word na 'n opsomming van al die Populasie B AFLP resultate (Tabel 3.6) en Figure 3.6 en 3.7 is dit opvallend dat sekere plante (95M1-79, 95M1-95 en 95M1-109) soos die primêre hibried (95M1) en *Th. distichum* altyd die polimorfiese fragment besit.



Figuur 3.7 Outoradiogram van radioaktief-gemerkte DNA-fragmente wat geamplifiseer is deur AFLP-inleiers S04 en M88. 'n GIBCO 30-330bp AFLP™ DNA leer is gebruik om die groottes van die produkte aan te dui. Die pyltjies dui die polimorfismes tussen soutverdraagsame ouer, 95M1 en soutsensitiewe ouer (Henoch) aan.

Tabel 3.6 Opsomming van al die AFLP-inleier polimorfismes van Populasie B.

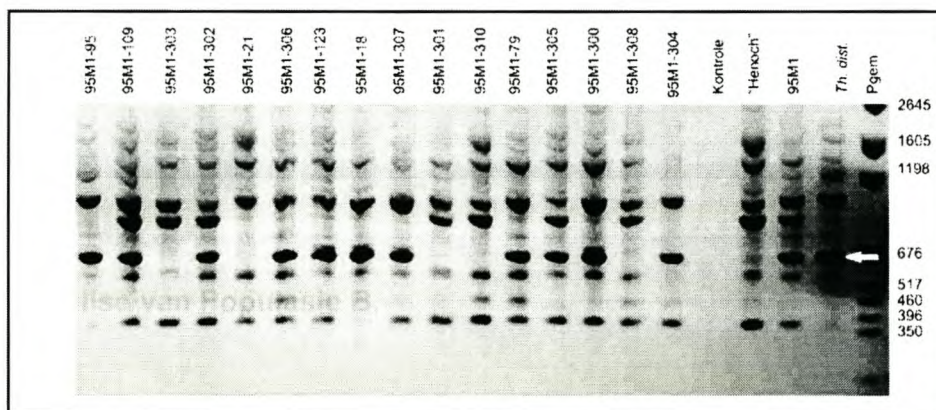
Soutbestande kloon 95M1-

Inleier kombinasie	-304	-308	-300	-301	-305	-306	-303	-307	-21	-95	-310	-18	-123	-79	-302	-109
S04:M11A	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
S04:M12A	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
B	-	+	-	?	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
C	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
S04:M13	Geen															
S04:M14	Geen															
S04:M15	Geen															
S04:M17A	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
S04:M19A	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
B	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
S04:M32A	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
S04:M53A	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
B	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+
C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
D	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
S04:M74A	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	?	+	-	+	-	+
B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
D	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
E	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
S04:M88A	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
B	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
C	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
D	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
E	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	?	-	+
F	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
S04:M90A	+	-	?	-	+	?	-	-	?	+	-	-	?	+	-	+
B	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
S12:M14A	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	?	+	-	+
B	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	?	+	-	+
C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
S12:M15A	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
B	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
C	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
S12:M17A	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	?	-	-	+
B	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
C	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
D	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
E	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
S12:M18A	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
B	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
S12:M19A	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

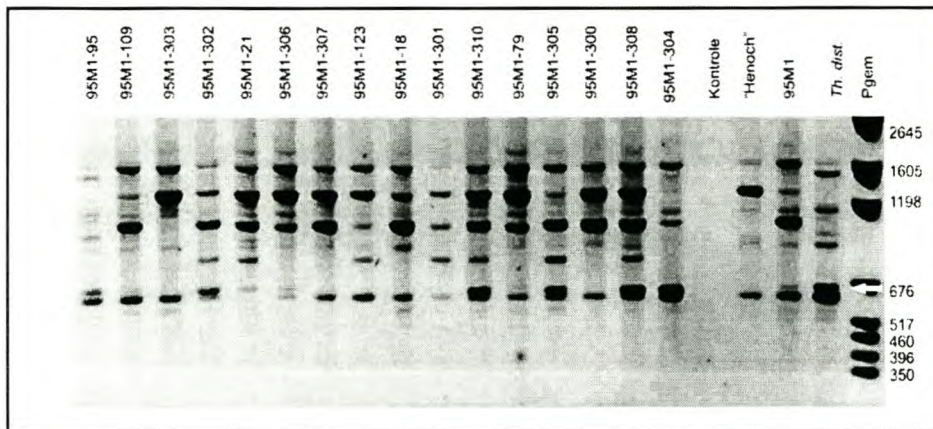
C	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
D	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
E	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
F	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
G	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
S02:M19A	+	-	+	+	+	+	-	+	+	?	-	+	-	+	+	+
S02:M21A	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
S02:M88A	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
B	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
C	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
S02:M90A	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
B	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+

3.3.4 RAPD analise van Populasie B.

RAPD ontleding is uitgevoer op Populasie B met 9 van die 12 polimorfiese RAPD-inleiers wat in Populasie A geïdentifiseer is in 'n verdere poging om merkers met soutverdraagsaamheid te assosieer.



Figuur 3.8 Ethidium bromied gekleurde agarose gel met amplifikasie produkte van RAPD inleier OPK 17 met *Thinopyrum distichum*, primêre hibried (95M1), "Henoch" rog en 16 soutbestande klone. Die pyl dui die polimorfisme aan en 'n pGem leer dui die basispaar groottes aan.



Figuur 3.9 Ethidium bromied gekleurde agarose gel met amplifikasie produkte van RAPD inleier OPK 14 met *Thinopyrum distichum*, primêre hibried (95M1), "Henoch" rog en 16 soutbestande klone. Die pyl dui die polimorfisme aan en 'n pGem leer dui die basispaar groottes aan.

Volgens die korrelasie analise (Tabel 3.4) van die vorige datastel was inleier OPK 17 die duidelikste, mees herhaalbare en insiggewendste inleier. Uit Figuur 3.8 blyk dit dat die polimorfisme baie duidelik is. Sekere plante uit Populasie B was ook in Populasie A en het ooreenstemmende polimorfismes getoon. Plante 95M1-79, 95M1-21, 95M1-109, 95M1-123 en 95M1-18 is positief vir die polimorfisme in beide Populasie A en B. Die resultate van die tweede stel RAPD data word opgesom in Tabel 3.7. Al die plante van Populasie B is soutverdraagsaam en indien die merker geassosieer is met 'n kritieke chromosoom word verwag dat die meeste plante wat geamplifiseer word met OPK 17, positief sal wees vir die 650bp polimorfiese fragment en dit is wel so. Twaalf van die 16 soutverdraagsame plante het wel die polimorfisme getoon.

Die OPK 14 fragment kon nie konsekwent korrek geïdentifiseer word nie. Slegs 1 van die 6 plante wat in Populasie A positief was vir die polimorfisme het dieselfde polimorfisme in Populasie B getoon. Die resultaat mag moontlik toegeskryf word aan swak herhaalbaarheid van die RAPD tegniek en twyfel oor die toewysing van swak geamplifiseerde bande. Die polimorfiese fragment was in beide gevalle van dieselfde basispaar grootte.

Tabel 3.7 RAPD resultate van Populasie B.

Lyn:	OPK14	OPK17	OPK6	OPL 4	OPL 3	OPL17	OPA16	OPA18	OPA20
M1-304	+	+	+		+		+	+	+
M1-308	+			+		+			
M1-300		+	+	+			+	+	
M1-301				+	+	+			
M1-305	+	+	+	+	+		+		
M1-306		+	+		+	+	+		+
M1-303						+			
M1-307		+					+		
M1-21		+	+		+		+		
M1-95	+	+	+	+		+			+
M1-310	+			+		+			
M1-18		+	+			+		+	
M1-123		+	+	+	+	+	+	+	
M1-79		+	+		+	+	+	+	+
M1-302	+	+	+						
M1-109		+	+	+		+	+	+	+
Totale # aanwesig	6/16	12/16	11/16	8/16	7/16	10/16	9/16	6/16	5/16

4. BESPREKING

Vooruitgang met teling vir soutverdraagsaamheid in akkerbou-gewasse is stadig vir 'n paar redes, nl. (i) lae seleksie doeltreffendheid, (ii) beperkte kennis van die genetika van soutverdraagsaamheid en (iii) 'n swak begrip van die interaksies tussen versouting en die omgewing (Akbar, 1986; Gregorio & Senadhira, 1995). Molekulêre merkers word toenemend gebruik vir genetiese kartering, genomiese vingerafdrukke, die bepaling van genetiese verwantskappe en merker ondersteunde seleksie (Xie et al., 2000). Ontrafeling van die oorerwingswyse van soutverdraagsaamheid en kartering van die gene betrokke sal teling vir die kenmerk baie vergemaklik. Polimerase ketting reaksie (PKR) tegnologie het gelei tot die ontwikkeling van veelsydige merkertegniese soos RAPDs en AFLPs wat al hoe meer gebruik word in gewas-verbeterings-programme. Molekulêre merkers wat nou gekoppel is met gene van belang kan gebruik word om seleksie te vergemaklik en landmerke daar te stel vir die fisiese opsporing van gene vir soutverdraagsaamheid (Martin et al., 1994).

4.1 Karakterisering van T_1F_1 - en F_2 -plante (Populasie A).

4.1.1 Evaluering van T_1F_1 - en F_2 -plante ten opsigte van soutverdraagsaamheid.

Die soutverdraagsaamheid van die T_1F_1 - en F_2 -plante het baie gevarieer (Tabel 3.1) met lesings tussen 2 en 7 op die empiriese skaal. Van die 67 plante wat gesouttoets is, was 33 (50%), matig of hoogs soutbestand (lesings van 7 tot 4.5). Die res van die plante was gevoelig of uiters gevoelig vir sout (lesings van 4.25 tot 2). Daar was 'n duidelike fenotipiese verskil in die soutverdraagsame en die soutsensitiewe plante na die souttoetse. Die chromosoomgetalle van die T_1F_1 - en F_2 -plante het getoon dat die meeste van die plante 21 chromosome het, wat aansluit by die bevindinge van Marais & Marais (1998) dat die plante 'n volledige stel rog chromosome (14) het met ± 7 lukrake *Th. distichum* chromosome. Volgens Dvůřák et al. (1988) dra verskeie chromosome van *Th. elongatum* by tot soutverdraagsaamheid. Die wye variasie in soutverdraagsaamheid wat waargeneem is in Populasie A is in ooreenstemming met wat verwag word van 'n kenmerk wat deur veelvuldige chromosome beheer word. Dit volg dan dat sekere plante meer

voordelige chromosoom kombinasies het ten opsigte van soutverdraagsaamheid, wat die variasie in die soutverdraagsaamheid van die populasie kan verduidelik.

4.1.2 Identifisering van RAPD-merkers ten opsigte van soutverdraagsaamheid.

Twaalf van die 60 RAPD-inleiers (20%) wat suksesvol geamplifiseer is het duidelike, ontleedbare polimorfiese fragmente opgelewer. Drie persent van die geamplifiseerde fragmente was polimorfies. Die af- of aanwesigheid van 'n polimorfisme by die plante het gestrek oor soutverdraagsame tot soutsensitiewe plante en daar was geen duidelike opsigtelike assosiasie van 'n RAPD polimorfisme met soutverdraagsaamheid nie (Tabel 3.3). Daar is wel 'n patroon ten opsigte van sekere plante wat die *Thinopyrum* polimorfisme besit het vir elke polimorfiese inleier nl. 95M1-79, 95M1-88, 95M1-95, 95M1-21 en 95M1-109. Daar is ook 'n paar plante, 95M1-110 en 95M1-18, wat die *Thinopyrum* polimorfisme besit het vir 10 of 11 van die polimorfiese inleiers. Al hierdie plante is hoogs soutverdraagsaam en toets positief vir feitlik al die RAPD-fragmente. Korrelasie analise het daarop aangedui dat veral 2 merkers (OPK 17 en OPK 6) wat skynbaar met verskillende chromosome geassosieerd is, sterk gekoppel is aan soutverdraagsaamheid. Die analise dui daarop dat selfs meer van die merkers mag ko-segregeer met chromosome wat kodeer vir soutverdraagsaamheid. Die data is in ooreenstemming met wat verwag sou word indien verskeie chromosome bydra tot die kenmerk. Die inleiers wat polimorfiese fragmente produseer vir die meeste soutverdraagsame plante (OPK 17 en OPK 14) produseer ook polimorfiese fragmente by plante wat middelmatig of baie sensitief is vir sout.

In die studie kon geen RAPD-merkers ge-identifiseer word wat slegs 'n fragment amplifiseer op soutverdraagsame plante nie. Dit word verwag indien verskeie chromosome elk 'n bydra maak tot die kenmerk terwyl die bydraes van individuele chromosome min of meer van dieselfde orde is. Daar is dus wel korrelasie tussen sommige RAPD-merkers en soutverdraagsaamheid, maar dit is moeilik om 'n absolute verband te bewys en te gebruik as 'n merker vir *Th. distichum* chromosome wat die gene vir soutbestandheid dra.

Daar kan meer as een rede wees vir die voorkoms van 'n kritieke merkerfragment in soutsensitiewe plante. Eerstens mag 'n plant net 'n substel van die kritieke chromosome bevat en nog steeds 'n betekenisvolle vlak van soutverdraagsaamheid hê. Net so mag die

insluiting van slegs een kritieke chromosoom in 'n plant onvoldoende wees om betekenisvolle soutverdraagsaamheid daaraan te verleen. 'n Groot probleem van RAPD-tegnologie is die evaluering van die gels en dit is soms moeilik om die teenwoordigheid van 'n swak geamplifiseerde fragment te bevestig. Hierdie fragmente kan beoordeel word as teenwoordig in sekere monsters en afwesig in ander, al is die fragment teenwoordig in beide monsters, maar as gevolg van klein variasies in PKR kondisies sal die fragment geamplifiseer word teen verskillende tempos. Derdens, rog is 'n baie geneties diverse gewas en daar bestaan bewyse vir aansienlike binne-kultivar heterogeniteit. Dus, die RAPD-inleiers mag soms rogpolimorfismes opwys wat nie in die kontroles sigbaar was nie. Dit is ook moontlik dat chromosoom oorkruising (tussen *Thinopyrum* homoeoloë) en herrangskikking kon plaasvind tydens terugkruising, wat die data nog verder sal kompliseer. Nog 'n moontlike rede kan wees dat daar 'n tweede fragment van dieselfde grootte teenwoordig is maar die twee bande kom van verskillende plekke in die genoom.

4.2 Korrelasie tussen soutverdraagsaamheid en blaarwaterretensie van Populasie A.

Twee-en-twintig plante het 'n waterretensie persentasie van meer as 10% gehad en het gewissel van hoogs soutverdraagsaam tot soutsensitief (Tabel 3.1). Veertien van die 22 (64%) plante het 'n soutverdraagsaamheidstelling van 4.5 of beter getoon. Vyftien van die 22 plante met 'n waterretensie hoër 10% het ook 'n epikutikulêre waslaag gehad. Dus, 14 uit 67 plante (21%) het 'n hoë blaarwaterretensie en soutverdraagsaamheid getoon. Slegs 36 % van die plante met 'n hoë blaarwaterretensie was nie soutverdraagsaam nie. Met korrelasie analises is gewys dat blaarwaterretensie en soutverdraagsaamheid goed met mekaar vergelyk, $r=0.40$.

Korrelasies is ook uitgewerk om te sien of daar enige verwantskap tussen die RAPD-merkers en blaarwaterretensie is. OPA 20 het 'n R^2 van 9% (P-waarde = 0.025145) getoon. Die orige merkers het glad nie gekorreleer met blaarwaterretensie nie.

4.3 Identifisering van molekulêre merkers vir *Thinopyrum* chromosome met gene vir soutverdraagsaamheid (Populasie B).

4.3.1 Karakterisering van Populasie B ten opsigte van AFLP-merkers.

AFLP-merkers het die voordeel bo RAPD-merkers dat baie meer polimorfiese DNA-merkers waargeneem kan word en 'n groter aantal volgordes geamplifiseer kan word per reaksie. AFLP-merkers is ook meer herhaalbaar. Vir die redes word die AFLP-tegniek baie meer gebruik vir die konstruksie van hoë-digtheids-koppelingskaarte van plant-genome en die posisionele klonering van belangrike gene.

Twee-en-twintig AFLP-inleier kombinasies is geamplifiseer op 'n kleiner soutverdraagsame populasie (B) van 15 plante. Vier-en-vyftig polimorfismes is verkry en vergelyk met ongepubliseerde kariotipe data van Marais & Marais (2001, ongepubliseerde data) in 'n verdere poging om merkers vir die kritieke soutverdraagsaamheids gene te vind. Marais & Marais (2001, ongepubliseerde data) het met die C-band tegniek die 14 *Thinopyrum* chromosome ge-groepeer in 7 homoeoloë pare wat hulle arbitrêr van I tot VII genommer het.

Tabel 4.1 Identifisering (C-bande) van die sewe *Th distichum* chromosome wat teenwoordig is by 15 soutverdraagsame plante (Marais & Marais, 2001, ongepubliseerde data).

95M1	<i>Thinopyrum distichum</i> Chromosoom nommer													
	I		II		III		IV		V		VI		VII	
-304	●		●		●			●	●		●		●	
-308	●		●		●			●	●		●			●
-300		●	●		●		●			●	●		●	
-301		●		●	●			●		●	●		●	
-305	●		●		●			●	●		●			●
-306	●		●		●			●	●		●			●
-303	●			●	●		●		●			●	●	
-307	●			●	●		●		●			●		●
-21	●		●		●		●		●		●		●	
-95	●		●		●		●		●		●			●
-310	●			●	●		●		●			●	●	
-18	●		●		●			●	●		●		●	
-123	●		●		●			●	●		●		●	
-79	●		●		●		●		●		●		●	
-302	●		●		●		●		●			●	●	

Met die uitsondering van homoeoloë paar IV, het een van die chromosome altyd teen 'n hoër frekwensie in die groep van 15 plante voorgekom. Die implikasie is dat sodanige chromosome gene vir soutverdraagsaamheid besit en dat 6 chromosome moontlik kodeer vir die kenmerk.

Van die 54 polimorfismes wat verkry is met AFLP-merker kombinasies is vier ge-identifiseer wat goed ooreenstem met die resultate in Tabel 4.1. Inleier kombinasies

S04;M17 (A) en S02;M90 (A) vergelyk baie goed met die verspreiding van *Th.* chromosoom IIa (Tabel 4.2). Wat opvallend is, is dat beide inleier kombinasies dieselfde geamplifiseerde fragment profiel het, wat toon dat hulle waarskynlik areas op dieselfde *Th.* chromosoom amplifiseer. AFLP-inleier kombinasie S012;M17 (D) en S04;M74 (E) vergelyk weer met *Th.* chromosoom VIa.

Die inleier kombinasies stem nie 100% met die resultate in Tabel 4.1 ooreen nie. Die redes hiervoor kan wees dat die verspreiding van merkers toevallig naby aan die chromosoom verspreiding is, dat daar 'n fout gemaak is met die identifisering van die polimorfismes of dat daar 'n fout gemaak is met die identifisering van die chromosome. Tydens terugkruising het die homoeoloë van die J_1^d en J_2^d genome gereeld bivalente gevorm wat normaal geskei het om gamete met 7 *Thinopyrum* chromosome daar te stel. Op hierdie tydstip sou daar oorkruisings kon geskied het wat tot gevolg sou hê dat die polimorfiese streek van een homoeoloog na 'n ander verplaas word wat ook die verskille kan verduidelik.

Tabel 4.2 Vergelyking van AFLP-resultate (Populasie B) met resultate van Marais & Marais (2001, ongepubliseerde data).

95M1-	<i>Th.</i> Chromosoom		AFLP-inleier kombinasies			
	IIa	VIa	S04:M17 A	S02;M90 A	S012;M17 D	S04;M74 E
-304	+	+	+	+	+	+
-308	+	+			+	
-300	+	+	+	+	+	+
-301		+			+	+
-305	+	+	+	+	+	+
-306	+	+	+	+		+
-303						
-307			+	+		+
-21	+	+			+	
-95	+	+	+	+	+	+
-310					+	
-18	+	+	+	+	+	+
-123	+	+	+	+	+	+
-79	+	+	+	+	+	+
-302	+		+	+		+
-109	?	?	+	+	+	+
			9/11 ¹	9/11 ¹	10/11 ²	9/11 ²

¹ Frekwensie polimorfismes wat ooreenstem met die verspreiding van chromosoom IIa

² Frekwensie polimorfismes wat ooreenstem met die verspreiding van chromosoom VIa

4.3.2 Karakterisering van Populasie B ten opsigte van RAPD-merkers.

Nege van die 12 polimorfismes wat verkry is met die RAPD-merkers van Populasie A is op die soutverdraagsame Populasie B geamplifiseer.

Twee AFLP-inleier kombinasies is verkry wat goed ooreenstem met die verspreiding van *Th.* chromosoom IIa (Tabel 4.3). OPK 17 en OPK6 stem goed ooreen met *Th.*

chromosoom IIa, veral OPK 6 wat slegs verskil met die afwesigheid van een geamplifiseerde fragment by 95M1-308. Volgens die korrelasie analise het OPK 17 (22%) sterker assosiasie met soutverdraagsaamheid in Populasie A getoon. Dit lyk egter of beide RAPD-inleiers areas op dieselfde *Th.* hromosoom IIa amplifiseer en gebruik kan word as 'n merker vir die betrokke chromosoom. Volgens Marais & Marais (2001, ongepubliseerde data) speel chromosoom II waarskynlik 'n groot rol by soutverdraagsaamheid.

Tabel 4.3 Vergelyking van RAPD-resultate (Populasie B) met resultate van Marais & Marais (2001, ongepubliseerde data).

95M1-	<i>Th.</i> Chromosoom	RAPD-inleier	
	IIa	OPK 17	OPK 6
-304	+	+	+
-308	+		
-300	+	+	+
-301			
-305	+	+	+
-306	+	+	+
-303			
-307		+	
-21	+	+	+
-95	+	+	+
-310			
-18	+	+	+
-123	+	+	+
-79	+	+	+
-302	+	+	+
-109	?	+	+

5. GEVOLGTREKING

Verskeie chromosome dra by tot soutverdraagsamheid (Zhong & Dvůrák, 1995). Marais & Marais se voorlopige data suggereer ook dat tot 6 chromosome 'n effek mag hê. Die maksimale effek is moontlik wanneer al die kritieke chromosome in dieselfde plant voorkom. Onvolledige stelle/kombinasies gee laer vlakke van soutverdraagsamheid en slegs een stel *Thinopyrum* chromosome se sout-gene is aktief, wat die variasie in soutverdraagsamheid by verskillende plante verduidelik.

In die studie is, met behulp van souttoetse, plante ge-identifiseer wat soutverdraagsaam en soutsensitief is. Hierdie plante is verder met molekulêre merkers (RAPD en AFLP) gekarakteriseer ten opsigte van hul soutverdraagsamheid. Twaalf RAPD merkers is geïdentifiseer wat goed korreleer met soutverdraagsamheid. Die herhaalbaarheid van die merkers was nie altyd konsekwent nie, maar nog steeds is daar twee RAPD merkers (OPK 17 en OPK 6) geïdentifiseer wat baie nou gekoppel word aan 'n chromosoom wat bydra tot soutverdraagsamheid (Marais & Marais, 2001, ongepubliseerde data). Daar is ook vier AFLP merkers (S04:M17 ; S02:M90 ; S012:M17 ; S04:M74) geïdentifiseer wat nou gekoppel is aan twee verskillende *Thinopyrum distichum* chromosome (IIa en VIa) wat moontlik bydra tot soutverdraagsamheid. Die interpretasie van die merkers word bemoeilik deur die heterogeniteit tussen die plante wat betref die agtergrond rog chromosome en die chromosoom herrangskikking wat plaasvind tydens terugkruisings. Hierdie potensiële merkers is sal die poging om kritieke gene vir soutverdraagsamheid oor te dra na ander verboude gewasse vergemaklik.

6. Verwysingslys

- Aceves, N.E., Stolz, L.H. & Mehuys, G.R. 1975. Effects of soil osmotic potential produced with two salt species on plant water potential, growth and grain yield of wheat. *Plant Soil*. **42**: pp. 619-628.
- Adams, P., Thomas, J.C., Vernon, D.M., Bohnert, H.J. en Jensen, R.G. 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol*. **33**: pp. 1215-1223.
- Ahmad, S. 1990. Soil salinity and water management – keynote address. In: Proc. of the Indo.-Pak. Workshop on Soil Salinity and Water Management. Dir. General, Int. Waterlogging and Salinity Research Inst. pp. 3-18.
- Akbar, M. & Yabuno, T. 1977. Breeding for saline resistant varieties of rice. IV. Inheritance of delayed-type panicle sterility induced by salinity. *Jpn. J. Breed*. **27**: pp. 237-240.
- Akbar, M. 1986. Breeding for salinity tolerance in rice. In: Pp. 37-55. Ahmad, R. & San Pietro, A. (eds.). Prospects for Biosaline research Proceedings of US-Pakistan Biosaline Research Workshop Karachi Pakistan.
- Alam, S.M. 1990. Effect of salinity stress on the growth, yield and chemical composition of rice. *Pak. J. Sci. Ind. Res*. **33**: pp. 292-300.
- Amtmann, A. & Sanders, D. 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Ad. in Bot. Res*. **29**: pp. 75-111.
- Aronson, J.A. 1989. HALOPH: A data base of salt tolerant plants of the world. Arid land studies, University of Arizona, Tucson, AZ.
- Arthur, L., Ozias-Akins, P. & Hanna, W.W. 1993. Female sterile mutant in pearl millet: Evidence for initiation of apospory. *J. Hered*. **84**: pp. 112-115.
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. in Plant Sci*. **13**: pp. 17-42.
- Ashraf, M., McNeilly, T. en Bradshaw, A.D. 1986. Heritability of NaCl tolerance at the seedling stage in seven grass species. *Euphytica* **35**: pp. 935-940.
- Asins, M.J., Breto, M.P., Cambra, M. & Carbonell, E.A. 1993. Salt tolerance in *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet*. **86**: pp. 737-743.
- Asker, S.E. & Jerling, L., 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Baker, D.A. & Hall, J.L. 1988. Introduction and general principles. Pp. 1-. In: Baker D.A. & Hall J.L. (eds.). Solute transport in plant cells and tissues. Longman Scientific & Technical, Harlow, England.
- Balsamo, R. & Thomson, W. 1993. Ultrastructural features associated with secretion in the salt glands of *Frankenia grandifolia* and *Avicennia germinans*. *Am. J. Bot.* **80**: pp. 1276-1283.
- Balsamo, R. & Thomson, W. 1996. Isolation of mesophyll and secretory cell protoplast of the halophyte *Ceratostigma plumbaginoides* (L): a comparison of ATPase concentration and activity. *Plant Cell Rep.* **15**: pp. 418-422.
- Bashaw, E.C. 1962. Problems and possibilities of apomixis in the improvement of tropical forage grasses. *Tropical Forages in Livestock Production Systems*. Am. Soc. Agron. Spec. Pub. **24**: pp. 23-30.
- Batie, S.S. & Healey, R.G. 1983. The future of American agriculture. *Sci. Am.* **248**: pp. 27-35.
- Beatty, K.D. & Ehlig, C.F. 1973. A technique for testing and selecting for salt tolerance in sugarbeet. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* **17**: pp. 295-299.
- Binzel, M.L. 1989. Mechanisms of adaption to salinity in cultured glycophyte cells. Pp. 139-157. In: Cherry, J.H. (ed.). *Environmental stress in plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Binzel, M.L., Hasegawa, P.M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A.K. & Bressan, R.A. 1987. Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol.* **84**: pp. 1408-1415.
- Binzel, M.L., Hess, F.D., Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M. 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* **86**: pp. 607-614.
- Blatt, M.R. 1993. Hormonal control of ion channel gating. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **44**: pp. 543-567.
- Blits, K.C., Gallagher, J.L. 1990. Salinity tolerance of *Kosteletzkya virginica*. *Plant Cell Environ.* **13**: pp. 419-425.
- Bohnert, H., Nelson, D.E. & Jensen, R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* **7**: pp. 1099-1111.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnich, M. & Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: pp. 314-331.
- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* **218**: pp. 443-448.
- Bressan, R.A., Singh, N.K., Handa, A.K., Mount, R., Clithero, J. & Hasegawa, P.M. 1987. Stability of altered genetic expression in cultured plant cells adapted to salt. Pp. 41-

57. In: Monti, L., Porceddore, E. (eds.). Drought resistance in plants: physiological and genetic aspects. Commission of the European Communities, Brussels.
- Briens, M., Lahrer, F. 1983. Sorbitol accumulation in *Plantaginaceae*: Further evidence for a function in stress tolerance. *Z. Pflanzenphysiol.* **110**: pp. 447-458.
- Brugnoli, E. & Lanterni, M. 1991. Effect of salinity on stomatal conductance photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt tolerant *Gossypium hirsutum* L. and salt sensitive *Phaseolus vulgaris* L. C non-halophyte. *Plant Physiol.* **95**: pp. 628-635.
- Bushuk, W. 1976. History, World Distribution, Production, and Marketing. In: Bushuk, W. (ed.), RYE. Pp. 1-7.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. & Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *BioTechnology* **9**: pp. 553-557.
- Canny, M.J. 1995. Apoplastic water and solute movement: new rules for an old space. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: pp. 215-236.
- Cauderon, Y. 1966. Genome analysis in the genus *Agropyron*. In: Proc. 2nd Int. Wheat Genet. Symp., Lund Sweden *Hereditas suppl.* **2**: pp 218-234.
- Cauderon, Y. 1979. Use of *Agropyron* species for wheat improvement. In: Proc. Conf. Broadening the Genetic Base of Crops, Pudoc Wageningen, pp 175-186.
- Cervera, M.T., Gusmao, J., Steenackers, M., Peleman, J., Storme, V., Van den Broeck, A. Van Montagu, M. & Boerjan, W. 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larcici-populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.* **93**: pp 733-737.
- Cheeseman, J.M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* **87**: pp. 547-550.
- Christiansen, M. B. 1982. World environmental limitations to food and fiber culture. In: Christiansen, M.B. & Lewis, C. F. (eds.). *Breeding plants for less favourable environments*. John Wiley & Sons, New York.
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroer, R., Van den Bulche, M., Bauw, G., Van Montagu, M. & Caplan, A. 1990. Characterization of rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell.* **2**: pp. 19-27.
- Clarke, J.M. & Townley-Smith. 1986. Heritability and relationship to yield of excised-leaf water retention in durum wheat. *Crop Sci.* **26**: pp. 289-292.

- Clarke, J.M., Romagosa, I., Jana, S., Srivastava, J.P. & McCaig, T.N. 1989. Relationship of excised-leaf water loss rate and yield of durum wheat in diverse environments. *Can. J. Plant Sci.* **69**: pp. 1075-1081.
- Cramer, G.R. 1994. Response of Maize (*Zea mays* L.) to salinity. In Pp. 449-459. Passarakli, M. (ed.). *Handbook of plant and crop stress*, Marcel Decker Inc., New York.
- Cramer, G.R., Epstein, E. & Lauchli, A. 1989. Na-Ca interaction in barley seedlings: Relationship to ion transport and growth. *Plant Cell Environ.* **12**: pp. 551-558.
- Cramer, G.R., Lynch, J., Lauchli, A. & Epstein, E. 1987. Influx of Na⁺, K⁺ en Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings: Effects of supplemental Ca²⁺. *Plant Physiol.* **83**: pp. 510-516.
- Cramer, G.R., Abdel-Basset, R. & Seeman, T.R. 1990. Salinity-Ca interactions on root growth and osmotic adjustment of two corn cultivars differing in salt tolerance. *J. Plant Nutr.* **13**: pp. 1453- .
- Cushman, S., DeRocher, E., Bonhert, H. 1989. Gene expression during adaptation to salt stress. Pp. 173-203. In: Katermann, F. (ed.) *Environmental injury to plants*. Academic Press, New York.
- Deodikar, G.B. 1963. Rye, *Secale cereale*, Linn. Indian Council Agr. Res.: New Delhi.
- Devos, K.M. & Gale, M.D. 1992. The use of RAPD DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **84**: pp. 567-572.
- Dewey, D.R. 1960. Salt tolerance of 25 strains of *Agropyron*. *Agronomy.* **52**: pp. 631-635.
- Dewey, D.R. 1984. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. In: Gene manipulation in plant improvement, Ed. Gustafson J.P., 16th Stadler Genetics Symposium, New York, pp. 209-279.
- Darlington, C.D. & La Cour, L.F. 1960. *The handling of chromosomes*. George Allan & Unwin Ltd., London.
- Donini, P., Elias, M.L., Bougourd, S.M. & Koebner, R.M.D. 1997. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome* **40**: pp. 521-526.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* **12**: pp. 13-15.
- Dracup, M. 1991. Increasing salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanisms. *Aust. J. Plant. Physiol.* **18**: pp. 1-15.

- Dudley, J.W. 1993. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci.* **33**: pp. 660-668.
- Dvůřák, J. 1980. Homoeology between *Agropyron Elongatum* chromosomes and *Triticum aestivum* chromosomes. *Can. J. Genet. Cytol.* **22**: pp. 237-259.
- Dvůřák, J., Edge, M. & Ross, K. 1988. On the evolution of the adaptation of *Lophopyrum elongatum* to growth in saline environments. *PNAS (US)* **85**: pp. 3805-3809.
- Dvůřák, J., Noaman, M., Goyal, S. & Gorham, J. 1994. Enhancement of the salt tolerance of *Triticum turginum* L. by the Kna 1 locus from the *Triticum aestivum* L. chromosome 4D by homoeologous recombination. *Theor. Appl. Genet.* **87**: pp. 872-877.
- Elgin, J.H., Miksche, J.P. (ed.) 1992. Proc. of the Apomixis Workshop, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-104.
- Elzam, O.E. & Epstein, E. 1969. Salt relations of two grass species differing in salt tolerance. Growth and salt content at different salt concentrations. *Agrochimica* **13**: pp. 190.
- Epstein, E. 1985. Salt-tolerant crops: origins, development and prospects of the concept. *Plant Soil.* **89**: pp. 187-198.
- Epstein, E. en Rains, D.W. 1987. Advances in salt tolerance. *Plant Soil.* **99**: pp. 17-29.
- Epstein, E., Norlyn, J.D., Rush, D.W., Kingsbu, R.W., Kelley, D.B., Cunningham, G.A. & Wrona, A.F. 1980. Saline culture of crops: A genetic approach. *Science* **210**: pp. 399-404.
- Evans, L.T. 1993. *Crop Evolution, Adaptation and Yield*. Cambridge University Press: Cambridge.
- Everard, J.D., Gucci, R., Kann, S., Flore, J.A. en Loescher, W.H. 1994. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery *Apium graveolens* L. at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.* **106**: pp. 282-292.
- Feldman, M. 1988. Cytogenetic and molecular approaches to alien gene transfer in wheat. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge 1988. pp. 23-32.
- Feldman, M. & Sears, E.R. 1981. The wild gene resources of wheat. *Scientific American.* **244**: pp. 102-112.
- Flowers, T.J. 1985. Physiology of halophytes. *Plant Soil.* **89**: pp. 41-56.
- Flowers, T.J., Flowers, S.A. & Hajibagheri, M.A. 1990. Salt tolerance in the halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Tateoka. *New Phytol.* **114**: pp. 675-684.
- Flowers, T.J., Troke, P.F. & Yeo, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**: pp. 89-121.

- Flowers, T.J. & Yeo, A. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**: pp. 75-91.
- Flowers, T.J. & Yeo, A.R. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? *Aust. J. Plant Physiol.* **22**: pp. 875-884.
- Fooland, M.R. 1996. Genetic analysis of salt tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Breed.* **115**: pp. 245-250.
- Fooland, M.R. 1997. Genetic basis of physiological traits related to salt tolerance in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Breed.* **116**: pp. 53-58.
- Fooland, M.R., Arulsekar, S. & Rodriguez, R.L. 1995. Applications of polymerase chain reaction (PCR) in plant genome analysis. Pp. 281-298. In: Gamborg OL, Phillips GC (eds.). *Fundamental methods of plant cell, tissue and organ culture and laboratory operations*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Fooland, M.R. & Jones, R.A. 1991. Genetic analysis of salt tolerance during germination in *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* **81**: pp. 321-326.
- Fooland, M.R. & Jones, R.A. 1993. Mapping salt-tolerance genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) using trait-based marker analysis. *Theor. Appl. Genet.* **87**: pp. 184-192.
- Forster, B.P. 1992. Genetic engineering for stress tolerance in the tribe Triticeae. *Proc. of the Royal Soc. Of Edinburgh.* **99B**: pp. 89-106.
- Forster, B.P., Phillips, M.S., Miller, T.E., Baird, E. en Powell, W. 1990. Chromosomal location of genes controlling tolerance to salt (NaCl) and vigour in *Hordeum vulgare* and *H. chilense*. *Heredity* **66**: pp. 99-107.
- Freitas, H. & Breckle, S. 1992. Importance of bladder hairs for salt tolerance. *Flora. Morphol. Geobot. Oekophysiol.* **187**: pp. 283-297.
- Gale, M.D. & Miller, T.E. 1987. The introduction of alien genetic variation in wheat. Pp. 173-210. In: Lupton, F.G.H. (ed.). *Wheat breeding – Its scientific basis*. Chapman & Hall, London.
- Geiger, H.H. 1990. Wege, Fortschritte und Aussichten in der Hybridzüchtung. In: Haug, G., Schuhmann, G. & Fischbeck, G. (Eds.), *Pflanzenproduktion im Wandel*, pp 41-72. VCH Verlagsges., Weinheim.
- Geiger, H.H., Becker, H.C. & Moegenstern, K. 1982. Performance and phenotypic stability of different hybrid types in winter rye. *Crop Sci.* **22**: pp. 340-344.
- Ghassemi, F., Jakeman, A.J. & Nix, H.A. 1995. *Salinisation of land and water resources*. CAB Int., Wallingford, 526 pp.

- Gill, B.S., Browder, L.E., Hatchett, G.H., Harvey, T.L., Martin, T.J., Raupp, W.J., Sharma, H.C. & Waines, J.G. 1983. Disease and insect resistance in wild wheats. Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto 1983. pp. 785-792.
- Glass, A.D.M. 1983. Regulation of ion transport. Ann. Rev. Plant Physiol. **83**: pp. 311-326.
- Glenn, E.P. & Brown, J.J. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. Crit. Rev. in Plant Sci. **18**: pp. 227-255.
- Gorham, J. 1988. Genetics of sodium uptake in wheat. In: Pp. 845-849. Miller, T.E. & Koebner (eds.) Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp., Cambridge, UK.
- Gorham, J. 1993. Genetics and physiology of enhanced K/Na discrimination. Pp. 151-159. In: Randall, P. (ed.) Genetic aspects of plant mineral nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Gorham, J. 1994. Salt tolerance in the *Triticeae*: K/Na discrimination in some perennial wheatgrasses and their amphiploids with wheat. J. Exp. Bot. **45**: pp. 441-447.
- Gorham, J., McDonnell, E., Budrewicz, E. & Wyn Jones, R.G. 1985. Salt tolerance in the *Triticeae*: Growth and solute accumulation in leaves of *Thinopyrum Bessarabicum*. J. Exp. Bot. **36**: pp. 1021.
- Gorham, J. & Wyn Jones, R.G. 1989. Utilization of Triticeae for improving salt tolerance in wheat. In: Proc. Int. Symp. Evaluation and utilization of genetic resources in wheat improvement. CARDA, Aleppo.
- Gorham, J. & Wyn-Jones, R. 1993. Utilization of Triticeae for improving salt tolerance in wheat. Pp. 27-34. In: Lieth, H. & Masoom, A. (eds.) Towards the rational use of high salinity tolerant plants, Vol. 2. Kluwer, Dordrecht.
- Greenway, H. & Munns, R. 1980. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. **31**: pp. 149-190.
- Gregorio, G.B. & Senadhira, D. 1995. Rapid screening for salinity tolerance in rice. In: Pp. 758-759. Ishii, R. & Horie, T. (eds.) Proceedings of the 2nd Asian Crop Science Centre. Fukui, Japan.
- Grumet, R. & Hanson, A.D. 1986. Genetic evidence of an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. Aust. J. Plant Physiol. **13**: pp. 356-364.
- Guy, R., Reid, D. & Krause, H. 1980. Shifts in carbon isotope ratios of two C₃ halophytes under natural and artificial conditions. Oecologia **44**: pp. 241-247.
- Hale, M.G. & Orcutt, D.M. 1987. The physiology of plants under stress. In: Pp. 1-206. John Wiley & Sons, State Univ. VA, USA.
- Hanna, W.W. & Bashaw, E.C. 1987. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. Crop Sci. **27**: pp. 1136-1139.

- Hanna, W.W. & Powell, J.B. 1973. Stubby head, an induced facultative apomict in pearl millet. *Crop Sci.* **13**: pp. 726-728.
- Hanna, W.W., Dujardin, M., Ozias-Akins, P. & Arthur, L. 1992. Transfer of apomixis in *Pennisetum*. In: Pp. 30-33. Proc. Apomixis Workshop. Atlanta, GA.
- Hanna, W.W., Schertz, K.F. & Bashaw, E.C. 1973. Apospory in *Sorghum Bicolor* (L.) Moench. *Science* **170**: pp. 338-339.
- Hanna, W.W., Powell, J.B., Millot, J.C. & Burton, G.W. 1973. Cytology of obligate sexual plants in *Panicum maximum* Jacq. And their use in controlled hybrids. *Crop. Sci.* **13**: pp. 695-697.
- Hanson, A.D. & Burnet, M. 1994. Evolution and metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in higher plants. Pp. 291-302. In: Cherry, J.H. (ed.) Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants. NATO Series, Vol H86. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hartung, W. & Davies, W.J. 1994. Abscisic acid under drought and salt stress. In: Pp. 401-411. In: Pessarakli, M. (ed.) Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hermesen, J.G. 1980. Breeding for apomixis in potato: Pursuing a utopian scheme. *Euphytica*. **29**: pp. 595-607.
- Hirayama, O. & Mihara, M. 1987. Characterization of membrane lipids of higher plants different in salt-tolerance. *Agric Biol. Chem.* **51**: pp. 3215-3221.
- Hoffman, F. & Wenzel, G. 1981. Selfcompatibility of microspore-derived double-haploid rye lines and single grain selection for alkylresorcinol content. *Theor. Appl. Genet.* **60**: pp. 129-133.
- Hoffman, G.J. & Rawlins, S.L. 1970. Design and performance of sunlit climate chambers. *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* **13**: pp. 656-660.
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**: pp. 519-524 .
- Hyder, S.Z. & Greenway, H. 1965. Effects of Ca^{2+} on plant sensitivity to high NaCl concentrations. *Plant Soil.* **23**: pp. 258-260.
- Jacobsen, T. & Adams, R.M. 1958. Salt and silt in ancient Mesopotamian agriculture. *Science.* **128**: pp. 1251-1258.
- Jacobson, L., Hanapel, R.J., Moore, D.P. & Shealle, M. 1961. Influence of calcium on selectivity of ion absorption process. *Plant Physiol.* **36**: pp. 58- .
- Jacoby, B. 1964. Functions of bean roots and stems in sodium retention. *Plant Physiol.* **39**: pp. 445.

- Jeschke, W.K. 1984. K/Na exchanges at cellular membranes, intercellular compartementation of cations, and salt tolerance. In: Pp. 37-66. Staples, R.C., Toenniessen, G.H., (eds.) Salinity tolerance in Plants: strategies for crop improvement, Wiley, New York.
- Jiang, J., Friebe, B. & Gill, B.S. 1994. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*. **73**: pp. 199-212.
- Jones, R.G.W., Storey, R. 1981. Betaines. Pp. 172-204. In: Paleg, D., Aspinall, D. (eds.) Physiology and biochemistry of drought resistance in plants, Academic Press, Sydney.
- Jordan, W.R., Shouse, P.J., Blum, A., Miller, F.R. & Monk, R.L. 1984. Environmental physiology of sorghum: II. Epicuticular wax load and cuticular transpiration. *Crop Sci.* **24**: pp. 1168-1173.
- Kawasaki, T. & Moritsugo, M. 1978. Effects of Calcium on salt injury in plants. In: Maize and bean. Ber. Ohara. Inst. Landwirtsch Biol. Okayama Univ. **17**: pp. 73-81.
- Khatun, S. en Flowers, T.J. 1995. Effect of salinity on seed set in rice. *Plant, Cell Environ.* **18**: pp. 61-87.
- Kimber, G. & Feldman, M. 1987. Wild Wheat: an Introduction. Col. Agric. Univ. Mo., Columbia Mo. Spec. Rep. pp. 353.
- Kimber, G. 1984. Technique selection for the introduction of alien variation in wheat. *Z Pflanzenzuechtg.* pp.15-21.
- Kovda, V.A. & Szabolcs, I. 1979. Modelling of soil salinization and alkalization, *Agrokem. Talatjan*, **28**: Suppl.
- Kramer, D. 1984. Cytological aspects of salt tolerance in higher plants. Pp. 3-15. In: Staples, R., Toenniessen, G.H. (eds.) Salinity tolerance in Plants: strategies for crop improvement, Wiley, New York.
- Kuiper, P.J.C. 1984. Functioning of plant cell membranes under saline conditions: membrane lipid composition and ATPase. Pp. 77. In: Staples, R.C. & Toenniessen, G.H. (eds.). Salinity tolerance in plants – Strategies for crop improvement. John Wiley & Sons, New York.
- Kuiper, P.J.C. 1984. The response of plant cell membranes to salinity and low temperatures. Pp. 231-245. In: Boudet, A.M., Alibert, G., Marigo, G. en Lea, P.J. (eds.). Membranes and compartmentation in the regulation of plant functions. Annual Proc. of the Phytochemical Society of Europe, 24. Clarendon, Oxford.
- Kuiper, P.J.C. 1985. Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. *Physiol. Plant* **64**: pp. 118-122.

- Lahaye, P.A. & Epstein E. 1971. Calcium and salt tolerance by bean plants. *Physiol. Plant.* **25**: pp. 213-229.
- Lande, R. & Thompson, R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics.* **124**: pp. 743-756.
- Lander, E.S. & Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics.* **121**: pp. 185-199.
- Lauchli, A. & Epstein, E. 1990. Plant responses to saline and sodic conditions. In: Pp 113-137 Tanji, K.K. (ed.). *Agricultural Salinity Assessment and Management*, ASCE Manuals and Reports on Engineering Practice No. 71. Amer. Soc. Civil Eng., New York, NY.
- Leach, R., Wheeler, K., Flowers, T. & Yeo, A. 1990. Molecular markers for ion compartmentation in cells of higher plants. *J. Exp. Bot.* **41**: pp. 1089-1094.
- Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Atfield, P.V. & Watson, K. 1997. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology.* **18**: pp. 30-36.
- Littlejohn, G.M. & Pienaar, R.deV. 1994. *Thinopyrum distichum* chromosome morphology and C-band distribution. *Theor. Appl. Genet.* **88**: pp. 949-955.
- Littlejohn, G.M. 1988. Salt tolerance of amphiploids and derivatives of crosses between wheat and wild *Thinopyrum* species. In: Miller TE, Koebner RMD (eds). *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp*, Cambridge, UK. Pp 845-850.
- Longstretch, D.J. & Nobel, P.S. 1979. Salinity effect on leaf anatomy. Consequences of photosynthesis. *Plant Physiol.* **63**: pp. 700-703.
- Löve, A. 1982. Genetic evolution of the wheatgrasses. *Biol. Zentrbl.* **101**: pp. 199-212.
- Löve, A. 1984. Conspectus of the *Triticeae*. *Triticeae Feddes.Repert.* **95**: pp. 425-521.
- Lunin, J., Gallatin, M.H. & Batchelder, A.R. 1963. Saline irrigation of several vegetable crops at various growth stages. I. Effect on yields. *Agron. J.* **55**: 107-114.
- Lynch, J. & Lauchli, A. 1984. Potassium transport in salt-stressed barley roots. *Planta* **161**: pp. 295-301.
- Maas, E.V. & Nieman, R.H. 1978. Physiology of plant tolerance to salinity. Pp. 277-299. In: Jung GA (ed.). *Crop tolerance to suboptimal land conditions*. Am. Soc. Agron. Special Publ. 32, Madison, Wisconsin.
- Maathuis, F.J.M. & Prins Patch-clamp studies in cells membranes of higher plants, *Acta Bot. Nerl.* **40**: pp. 197-219.

- Maathuis, F.J.M., Flowers, T.J. & Yeo, A.R. 1992. Sodium chloride compartmentation in leaf vacuoles of the halophyte *Suaeda maritima* L. Dum. and its relation to tonoplast permeability. *J. Exp. Bot.* **43**: pp. 1219-1223.
- Magistad, O.C., Ayers, A.D., Wadleigh, C.H. & Gauch, H.G. 1943. Effect of salt concentration, kind of salt, and climate on plant growth in sand cultures. *Plant Physiol.* **18**: pp. 151-166.
- Mahmood, A. & Quarrie, S.A. 1993. Effects of salinity on growth, ionic relations and physiological traits of wheat, disomic addition lines from *Thinopyrum bessarabicum*, and two amphiploids. *Plant breeding.* **110**: pp. 265-276.
- Marais, G.F. & Marais, A.S. 1998. Attempt to further shorten the *Lr19-149* translocated segment of wheat. Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. Pp. 89-91.
- Marais, G.F., Marais, A.S. & Badenhorst, P.C. 1998. Hybridization of *Thinopyrum distichum* and *Secale cereale*. *Plant Breeding.* **117**: pp. 107-111.
- Martin, B., Nienhuis, J. & King, G. 1989. RFLP polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science.* **243**: pp. 1725-1728.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H. & Wu, T. 1994. Map-based cloning of protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science.* **262**: pp. 1432-1436.
- Martinoia, E., Schramm, M., Flugge, U. & Kaiser, G. 1987. Intracellular distribution of organic acids and inorganic anions in mesophyl cells: transport mechanisms in the tonoplast. Pp. 407-416. In: Marin, B. (ed.). *Plant Vacuoles*. NATO ASI Series, Plenum Press, New York.
- Matile, P. 1988. Biochemistry and function of vacuoles. *Annu. Plant Physiol.* **29**: pp. 193-213.
- McCue, K.F. & Hanson, A.D. 1990. Drought and salt tolerance: towards an understanding and appresiation. *Trends Biotechnol.* **8**: pp. 358-362.
- McGuire, P.E. & Dvorak, J. 1981. High salt tolerance potential in wheatgrasses. *Crop Science.* **21**: pp. 702-705.
- Michelmore, R.W., Paran, I. & Kesseli, R.V. 1991. *Proc. Natl. Acad. Res.* **8**: pp. 4321-4325.
- Miyamoto, S. 1996. Salt tolerance, water use and potential irrigation scheduling of halophytes. Pp. 181-220. In: Choukr-Allah, R., Malcolm, C. & Hamdy, A. (eds.). *Halophytes and Biosaline Agriculture*. Marcel Dekker, New York.

- Morant-Avice, A., Houchi, R., Jurvilliers, P. & Tremblin, G. 1999. Use of photosynthesis and transpiration for early selection of salt tolerant triticales. *Photosynthetica*. **36**: pp. 465-469.
- Munns, R. 1994. Physiological processes limiting growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* **16**: pp. 15-24.
- Nevo, E., Gorham, J. & Beiles, A. 1992. Variation for Na uptake in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides* in Israel: salt tolerance resources for wheat improvement. *J. Exp. Botany*. **43**: pp. 511-518.
- Nieman, R.H. & Poulsen, L.L. 1971. Plant growth suppression on saline media: Interactions with light. *Bot. Gaz.* **132**: pp. 14-21.
- Niu, X., Zhu, J.K., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* **109**: pp. 735-742.
- Nobel, P.S. 1991. Physiochemical and environmental plant physiology. In: Academic press, New York.
- Noble, C.L. & Rogers, N. 1993. Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Dev. Plant Soil Sci.* **50**: pp. 127-135.
- Nogler, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. In: Johri, B.M. (ed.). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, New York.
- Norlyn, J.D. 1980. Breeding salt-tolerant crop plants. Pp. 293-309. In: Staples RC & Tonniessen GA (eds.). *Salinity tolerance in plants: Strategies for crop improvement*. John Wiley & Sons, New York.
- O'Leary, J.W. 1984. The role of halophytes in irrigated agriculture. Pp. 397-414. In: Staples R.C & Toenniessen G.A. (eds.). *Salinity tolerance in plants*. John Wiley & Sons, New York.
- Omielan, J.A., Epstein, E. & Dvorak, J. 1991. Salt tolerance and ion relations of wheat as affected by individual chromosomes of salt-tolerant *Lophopyrum elongatum*. *Genome*. **34**: pp. 961-974.
- Oppenheimer, H.R. 1960. Adaptation to drought: Xerophytism. In: Pp. 105-138. *Reviews of Research*. UNESCO, Paris.
- Ozias-Akins, P., Lubbers, E.L. & Hanna, W.W. 1992. Molecular research on apomixis in *Pennisetum*. In: Pp. 34-35. *Proc. Apomixis Workshop*, Atlanta, GA.
- Paleg, L.G., Stewart, G.R. en Starr, R. 1985. The effect of compatible solutes in proteins. *Plant Soil*. **89**: pp. 46-57.

- Pasternak, D. 1982. Biosaline research in Israel: Alternative solutions to a limited fresh water supply. Pp. 39-58. In: San Pietro A. (ed.). Biosaline Research, Plenum Press, New York.
- Paterson, A.H., Damon, S., Hewitt, J.D., Rabinowitch, H.D., Lincoln, S.E., Lander, E.S. & Tanksley, S.D. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato, and environment. *Genetics*. **127**: pp. 181-197.
- Peeler, T.C., Stephenson, M.B., Einsphar, K.J., Thompson Jr, G.A. 1989. Lipid Characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media varying salinity. *Plant Physiol.* **89**: pp. 970-976.
- Penner, G.A., Chong, J., Wight, C.P., Molnar, S.J. & Fedak, G. 1993. Identification of a RAPD marker for the crown rust resistance gene *Pc68* in oats. *Genome*. **36**: pp. 818-820.
- Petrov, D.F. (ed.) 1984. Apomixis and its role in evolution and breeding. [Translated from Russian by Amerind Publishing Co., Pvt. Ltd., New Delhi for USDA and National Science Foundation].
- Pienaar, R.deV. 1981. Genome relationships in wheat x *Agropyron distichum* (Thunb) Beauv. Hybrids. *Z Pflanzenzeucht*. **87**: pp 193-212.
- Pienaar, R.deV. 1983. Cytogenetic studies in *Triticum-Elytrigia* amphiploid hybrids. In: Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto, Japan. pp. 327-333.
- Pienaar, R.deV. 1990. Wheat x *Thinopyrum* hybrids. In: Baja YPS (ed). Wheat, biotechnology in agriculture and forestry 13. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 167-217.
- Pienaar, R.deV., Littlejohn, G.M. & Sears, E.R. 1988. Genomic relationships in *Thinopyrum*. *S.A.J. Bot.* **54**: pp. 541-550.
- Pilet, P.E. 1983. Control of root growth endogenous IAA and ABA. Pp. 15-24. In: Jackson, M.B. & Steal, A.D. (eds.). Growth regulators in root development, British Plant Growth Regulator Group, Wantage.
- Pollard, A. en Wyn Jones, R.G. 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Plant* **14**: pp. 292-298.
- Prioul, J.P., Quarrie, S., Causse, M. & de Vienne, D. 1997. Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. *J. of Exp. Botany*. **48**: pp. 1151-1163.
- Rafalski, J.A., Tingey, S.V. & Williams, J.G.K. 1994. RAPD markers – new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information*. **3**: pp. 645-648.

- Rea, P.A., Yongcheol, K., Sarafian, V., Poole, R.J., Davies, J.M. & Sanders, D. 1992. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *TIBS* **17**: pp. 348-353.
- Reuveni, M., Colombo, R., Lerner, H.R., Pradet, A. & Poljakoff-Mayber, A. 1987. Osmotically induced proton extrusion from carrot cells in suspension culture. *Plant Physiol.* **85**: pp. 383-388.
- Robinson, S.P., Downton, J.W., John, D. & Millhouse, J.A. 1983. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt stressed spinach. *Plant Physiol.* **73**: pp. 238-242.
- Roupe van der Voort, J.N.A.M., Van Zandvoort, P., van Eck, H.J., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., Draaistra, J., Gommers, F.J., Jacobsen, E., Helder, J. & Bakker, J. 1997. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* **255**: pp. 438-447.
- Rozema, J., Zaheer, S., Niazi, B., Linders, H. & Broekman, R. 1993. Salt tolerance of *Beta vulgaris* L.: a comparison of the growth of sea-beet and fodder-beet in response to salinity. Pp. 193-198. In: Lieth, H. & Masoon, A. (eds.). Towards the rational use of high salinity tolerant plants, Vol 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Rubio, F., Gassman, W. & Schroeder, J. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**: pp. 1660-1663.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. Mullis, K.B. & Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: pp. 487-491.
- Sakamoto, S. 1973. Patterns of phylogenetic differentiation in the tribe *Triticeae*. *Seiken Ziho.* **39**: pp. 6-16.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Second edition., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saranga, Y., Cahanern A., Zamir, D., Marani, A. & Rudich, J. 1992. Breeding tomatoes for salt tolerance – inheritance of salt tolerance and related traits in interspecific populations. *Theor. Appl. Genet.* **84**: pp. 390-396.
- Schachtman, D. & Schroeder, J. 1994. Structure and transport mechanisms of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: pp. 655-658.
- Schachtman, D., Tyerman, T., & Terry, B. 1991. The K⁺/Na⁺ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. *Plant Physiol.* **97**: pp. 598-605.

- Schachtman, D.P. en Munns, R. 1992. Sodium accumulation in leaves of *Triticum* species that differ in salt tolerance. *Aust. J. of Plant Physiol.* **19**: pp. 331-340.
- Schertz, K.F. 1992. Apomixis in sorghum. *Proc. Apomixis Workshop. Atlanta, G.A.* Pp. 40-42.
- Schirmer, U. & Breckle, S. 1982. The role of bladders for salt removal in some *Chenopodiaceae* species. Pp. 215-232. In: Sen, D. & Rajpurohit, K. (eds.), *Tasks for Vegetation Science*, Dr. W. Junk, The Hague.
- Schroeder, J.I., Ward, J.M. & Gassmann, W. 1994. Perspectives on the physiological and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for cation uptake. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: pp. 441-471.
- Schubert, S. & Läuchli, A. 1990. Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. *Plant Soil.* **123**: pp. 205-209.
- Sears, E.R. 1981. A wheat mutation conditioning an intermediate level of homoeologous chromosome pairing. *Can. J. Genet. Cytol.* **24**: pp. 715-719.
- Shan, X., Blake, T.K. & Talbert, L.E. 1999. Conversions of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.* **98**: pp. 1072-1078.
- Shannon, M.C. 1984. Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. Pp. 231-254. In: Staples, R.C. en Toenniessen, G.H. (eds.). *Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement*. Wiley, New York.
- Shannon, M.C. 1985. Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant Soil.* **89**: pp. 227-241.
- Shannon, M.C. 1987. Salinity – An environmental constraint on crop production. 4th Aust. Agron. Soc. Conf., La Trobe Univ., Melbourne, Australia, Aug. 24-17.
- Shannon, M.C. 1990. Genetic approaches for developing economic salt-tolerant crops. Pp. 161-185. In: Tanji, K.K. (ed.). *Agricultural salinity assessment and management*. American Society of Civil Engineers, New York.
- Shen, B., Jensen, R.G. & Bohnert, H.J. 1997. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.* **115**: pp. 527-532.
- Shen, Z., Shen, Q., Liang, Y. en Liu, Y. 1994. Effect of nitrogen on the growth and photosynthetic activity of salt-stressed barley. *J. Plant Nutr.* **17**: pp. 787-799.
- Singh, N.K., Bracker, C.A., Hasegawa, P.M., Handa, A.K., Buckel, S., Hermodson, M.A., Pfankock, E., Regnier, F. & Bressan, R.A. 1987. Characterization of osmotin. *Plant Physiol.* **85**: pp. 529-536.
- Skerrett, M. en Tyerman, S.D. 1994. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplast derived from wheat roots. *Planta* **192**: pp. 295-305.

- Skroch, P. & Nienhuis, J. 1995. *Theor. Appl. Genet.* **91**: pp. 1086-1091.
- Smirnoff, C., Thonke, B. en Popp, M. 1990. The compatibility of D-pinitol and 1D-1-O-methyl-mucoinositol with malate dehydrogenase activity. *Bot. Acta.* **103**: pp. 270-273
- Smith, R.L. 1972. Sexual reproduction in *Panicum maximum* Jacq. *Crop Sci.* **12**: pp. 624-627.
- Storey, R. & Wyn Jones, R.G. 1975. Betaine and coline levels in plants and their relationship to NaCl stress. *Plant Sci. Lett.* **4**: pp. 161.
- Storey, R., Gorham, J., Pitman, M.C., Hanson, M.G. & Gage, D. 1993. Responses of *Melanthera biflora* to salinity and water stress. *J. Exp. Bot.* **44**: pp. 1551-1561.
- Stuber, C.W., Lincoln, S.E., Wolff, D.W., Helentjaris, T. & Lander, E.S. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* **132**: pp. 823-839.
- Subbarao, G.V., Johansen, C., Kumar-Rao, J.V.D.K. & Jana, M.K. 1990. Salinity tolerance in F1 hybrids of pigeonpea and a tolerant wild relative. *Crop Sci.* **30**: pp. 785-788.
- Sumaryati, S., Negrutiu, I. en Jacobs, M. 1992. Characterization and regeneration of salt- and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). *Theor. Appl. Genet.* **83**: pp. 613-619.
- Szabolcs, I. 1991. Soil salinity and biodiversity In: The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture, Hawksworth, D.L. (ed.), CAB International, Wallingford, U.K.
- Tal, M. 1984. Physiological genetics of salt resistance in higher plants: studies on the level of the whole plant and isolated organs. Pp. 301-320. In: Staples, R.C. en Toenniessen, G.H. (eds.). *Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement*. Wiley, New York.
- Tal, M. 1985. Genetics of salt tolerance in higher plants: theoretical and practical considerations. *Plant Soil.* **89**: pp. 199-226.
- Tanksley, S.D. & Rick, C.M. 1980. Isozyme gene linkage map of tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* **57**: pp. 161-170.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Review Genet.* **27**: pp. 205-233.
- Thimann, K.V. 1977. *Hormones in the whole life of plants*. Pp. 12-27. Univ. Massachusetts Press, Amhurst, MA.
- Thomas, J.C. & Bohnert, H.J. 1993. Salt stress perception and plant growth regulation in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **103**: pp. 1299-1304.

- Uddin, M.N. & Marshall, D.R. 1988. Variation in epicuticular wax content in wheat. *Euphytica*. **38**: pp. 3-9.
- Vaadia, Y. 1976. Plant hormones and water stress. *Phil. Trans. Roy. Soc. London Series B*. **273**: pp. 513-522.
- Voight, P.W. 1971. Discovering of sexuality in *Eragrostis curvula* (Schrad). *Crop Sci.* **11**: pp. 424-425.
- Volkmar, K.M., Hu, Y. en Steppuhn, H. 1998. Physiological responses of plants to salinity: A review. *Can. J. Plant Sci.* **78**: pp7. . 19-27
- 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 Research*. **23**: pp. 4407-4414.
- Vuylsteke, M., Mank, R., Antonise, R., Bastiaans, E., Senior, M.L., Stuber, C.W., Melchinger, A.E., Lubberstedt, T., Xia, X.C., Stam, P., Zabeau, M. & Kuiper, M. 1999. Two high-density AFLP linkage maps of *Zea Mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **99**: pp. 921-935.
- Waisel, Y. 1972. Estimation of water stresses in the root zone by the double-root system technique. *Isr. J. Bot.* **18**: pp. 123-128.
- Walton, M., Wright, S. & Hookstra, G. 1996. A comparison of genetic similarity estimates among 16 maize inbred lines based upon RFLP and AFLP data. *Linkage Analysis*. Salt Lake City. UT 84119.
- Warne, T.R., Dale, L. 1995. The analysis of genetically and physiologically complex traits using ceratopteris: A case study of NaCl-Tolerant mutants. *Int. J. Plant Sci.* **156**: pp. 374-384.
- Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using the PCR arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: pp. 7213-7218.
- Wenzel, G., Hoffmann, F. & Thomas, E. 1977. Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. *Theor. Appl. Genet.* **51**: pp. 81-86.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: pp. 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1993. Pp. 704-740. In: Wu, R. (ed.). *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orlando, Florida, vol 218.
- Winter, E. & Preston, J. 1982. Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* IV. Ion measurement by x-ray microanalysis in unfixed, frozen hydrated leaf cells at various stages of salt treatment. *Aust. J. Plant. Physiol.* **9**: pp. 251.

- Winter, E. 1982. Salt tolerance of *Trifolium alexandrinum* L. III. Effects of salt on ultrastructure of phloem and xylem transfer cells in petioles and leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**: pp. 239.
- Winter, H., Robinson, D.G. en Heldt, H.W. 1993. Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta.* **191**: pp. 180-190.
- Winter, S.R., Musick, J.T. & Porter, K.B. 1988. Evaluation of screening techniques for breeding drought-resistant winter wheat. *Crop Sci.* **28**: pp. 512-516.
- Wyn Jones, R.. en Gorham, J. 1983. Osmoregulation. Pp. 35-38. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. en Ziegler, H. (eds.) *Physiological plant ecology. Encyclopaedia of Plant Physiology.* Vol. 12C. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Wyn-Jones, R.G. & Gorham, J. 1986. The potential for enhancing the salt tolerance of wheat and other important crop plants. *Outlook Agric.* **15**: pp. 33-39.
- Wyn-Jones, R.G. & Gorham, J. 1989. Use of physiological traits in breeding for salinity tolerance. Pp. 95-106. In: Baker, F.W.G. (ed.). *Drought resistance in cereals.* CAB International, Wallingford, UK.
- Xie, J.H., Lu, J., Zhuang, J.Y., Lin, H.X., Qian, H.R., Gao, M.W. & Zheng, K.L. 1997. Identifying different types of de-differentiated microspores from indica-japonica F1 hybrids with subspecies-differentiating RFLP probes in rice. *Theor. Appl. Genet.* **94**: pp. 34-38.
- Yang, Y.W., Newton, R.J. en Miller, F.R. 1990. Salinity tolerance in *Sorghum* I. Whole plant response to sodium chloride in *S. bicolor* and *S. halepense*. *Crop Sci.* **30**: pp. 775-781.
- Yeo, A.R. en Flowers, T.J. 1989. Selection for physiological characters – examples from breeding for salt tolerance. Pp. 217-234. In: Jones, H. Flowers, T. en Jones, M. (eds.). *Plants under stress.* Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Yeo, A.R., Yeo, M.E. & Flowers, T.J. 1988. Selection of lines with high and low sodium transport from within varieties of an inbreeding species, rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* **110**: pp. 13-19.
- Zabeau, M. & Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application EP 0534858.
- Zhong, G.Y. & Dvůrák, J. 1995. Chromosomal control of the tolerance of gradually and suddenly imposed salt stress in the *Lophopyrum elongatum* and wheat, *Triticum aestivum* L., genomes. *Theor. Appl. Genet.* **90**: pp. 229-236.