

Ontwikkeling van 'n koringkwekery met gestapelde, spesie-verhaalde roesweerstand

deur
Elsabet Wessels

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



Studieleier: Mnr Willem Botes
Fakulteit AgriWetenskappe
Departement Genetika

Desember 2010

VERKLARING

Deur hierdie verhandeling elektronies in te lewer, verklaar ek dat die geheel van die werk hierin vervat, my eie, oorspronklike werk is, en dat ek dit nie vantevore, in die geheel of gedeeltelik, ter verkryging van enige kwalifikasie aangebied het nie.

Desember 2010

Kopiereg © 2010 Universiteit van Stellenbosch

Alle regte voorbehou

OPSOMMING

Koringroes lewer jaarliks 'n beduidende bydrae tot die totale impak van siektes wat volhoubare koringverbouing belemmer. Die mees eenvoudige en koste-effektiewe verweer teen hierdie siektes is genetiese weerstand, wat deur weerstandsgene vanaf koring, sowel as wilde verwante spesies, bewerkstellig word. Die stapeling van weerstandsgene in 'n enkele lyn word as 'n onontbeerlike praktyk om duursame weerstand tot stand te bring, geag.

Hierdie studie het ten doel gehad om 'n reeks verdubbelde haploïede (VH) koringlyne te ontwikkel wat kombinasies van wilde spesie gene vir roesweerstand bevat. Roesweerstandsgene *Lr19* (7BL), *Sr31/Lr26/Yr9/Pm8* (1BS) en *Lr54/Yr37* (2DL) is deur middel van kruisings gekombineer. Telerslyne wat oor komplekse weerstand beskik wat *Lr24/Sr24* (3DL), *Lr34/Yr18* (7D), *Sr36* (2BS) en *Sr2* (3BS) insluit, is gebruik. Merker-bemiddelde seleksie (MBS) is gebruik om populasies vir bogenoemde gene te tipeer. 'n Ingeteelde populasie is vanaf die geselekteerde lyne met behulp van die VH metode (mielie-bestuiwing tegniek) ontwikkel, waarna die lyne molekulêr vir die weerstandsgentranslokasies waaroor hul beskik, gekarakteriseer is.

Die studie het 27 lyne met diverse genetiese profiele opgelewer. Sewe lyne bevat vier weerstandsgentranslokasies (*Lr24/Sr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr2* en *Lr19* of *Sr31*) elk, 11 lyne beskik oor kombinasies van drie gene elk, ses bevat twee gene elk en slegs drie lyne beskik oor 'n enkele translokasie (*Lr24/Sr24*). Die realiteit dat die roespatogene reeds drie van die weerstandsgene in die finale populasie – *Lr19*, *Sr31* en *Sr24* – oorkom het, benadruk die waarde van die gebruik van nie-hoofgeenweerstand vir die daarstelling van duursame weerstand. Die fokus behoort toenemend meer op die aanwending van kwantitatiewe kenmerk-loci (QTL) vir hierdie doel te val en sal sodoende teweegbring dat MBS bydra tot die ontwikkeling van meer duursame weerstand.

Die waarde van die integrasie van MBS en VH in kombinasie met konvensionele telingsmetodiek is reeds internasionaal vir die versnelling van kultivarontwikkeling aangetoon en word ook deur hierdie studie herbevestig.

ABSTRACT

Wheat rust is a significant contributor to the total impact of diseases on sustainable wheat production. Genetic resistance, produced by using resistance genes from wheat and other related wild species, is the simplest and most cost-effective way to guard against these diseases. The pyramiding of resistance genes in a single line is a vital practice in bringing about durable resistance.

This study aimed to develop a series of doubled haploid (DH) wheat lines containing combinations of wild species genes for rust resistance. Rust resistance genes *Lr19* (7BL), *Sr31/Lr26/Yr9/Pm8* (1BS) and *Lr54/Yr37* (2DL) were combined by means of crossing. Breeders' lines which have complex resistance including *Lr24/Sr24* (3DL), *Lr34/Yr18* (7D), *Sr36* (2BS) and *Sr2* (3BS), were used. Marker assisted selection (MAS) was used to type populations for the abovementioned genes. Using the DH method (maize pollination technique), an inbred population was developed from the selected lines, after which the lines were characterised molecularly for the resistance gene translocations which they contain.

The study produced 27 lines with diverse genetic profiles. Seven lines contain four translocations (*Lr24/Sr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr2* and *Lr19* or *Sr31*) each, 11 lines contain three genes each, six lines contain two genes each and only three lines contain a single translocation (*Lr24/Sr24*). The reality that rust pathogens have already overcome three of the resistance genes in the final population – *Lr19*, *Sr31* and *Sr24* – is a clear indication of the value of using non-major gene resistance for bringing about durable resistance. The focus should fall ever more greatly upon the application of quantitative trait loci (QTL) for this purpose, which will result in MAS contributing to the development of more durable resistance.

The value of the integration of MAS and DH in combination with conventional breeding practices in breeding programmes has already been illustrated internationally for increasing the rate of cultivar development and this is reaffirmed by this study.

LYS VAN AFKORTINGS

%	persent
°C	grade Celsius
2,4D	2,4-dichlorofenoksie-asynsuur
2n	diploïed
A	Adenien
ABC-vervoerder	ATP-bindingskasset-vervoerder
AFLP's	geamplifiseerde-fragment-lengte-polimorfismes
ATP	adenosientrifosfaat
<i>Avr</i> -allele	avirulensie allele
<i>Avr</i> -geenprodukte	avirulensie geenprodukte
<i>avr</i> -gene	avirulensiegene
<i>Avr</i> -proteïene	avirulensie proteïene
B ₂ F ₃	tweede terugkruising, derde filiale generasie
B ₃ F ₂	derde terugkruising, tweede filiale generasie
BAC	bakteriële kunsmatige chromosoom
BGRI	<i>Borlaug Global Rust Initiative</i>
BME	beta-merkptoetanol
bp	basispare
BRIC	Brasilië, Rusland, Indië en China
bv.	byvoorbeeld
C	sitosien
CIMMYT	<i>International Maize and Wheat Improvement Centre</i>
cm	sentimeter
cM	Sentimorgan
Cresol Rooi	o-Cresolsulfoneftaleen
"CS"	"Chinese Spring"
CSM2A	"Chinese Spring" monosomies 2A
CSM2B	"Chinese Spring" monosomies 2B
CSM2D	"Chinese Spring" monosomies 2D
CTAB	N-setiel-N, N, N-trimetiel-ammoniumbromied
cv.	kultivar

DArT	Diversiteits-reeks tegnologie
dH ₂ O	gedistilleerde water
DKM	1000-korrelmassa
DNS	deoksiribonukleïensuur
dNTP's	dinukleotiedtrifosfate
(Edms) Bpk	eiendoms beperk
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
EPN	enkelpitnageslagseleksie
EST's	uitgedrukte-volgorde-etikette
EtBr	ethidiumbromied
F	voorwaartse inleier
F ₁	eerste filiaal
F ₂	tweede filiaal
f. sp.	<i>forma specialis</i>
Fig.	Figuur
FISH	fluoresserende <i>in situ</i> hibridisasie
g	gram
G	Guanien
GA ₃	gibberelliensuur
gDNS	genomiese DNS
GISH	genomiese <i>in situ</i> hibridisasie
GRO	groeireguleerder-oplossing
h	uur
ha	hektaar
HCl	soutsuur
HK	helmknopkulture
HLII	Hyperladder II molekulêre massa merker
HR	hipersensitiwiteitsreaksie
<i>hrp</i> -gene	harpiengene
Hrp-proteïene	harpiene
Hz	Hertz
Inc.	<i>Incorporated</i>
ISBP	invoegingsetel-gebaseerde-polimorfisme
IT	infeksietipe

km	kilometer
ℓ	liter
L	laan
LNR-KGI	Landbounavorsingsraad – Kleingraaninstituut
<i>Lr19</i> ⁺	<i>Lr19</i> positief
<i>Lr19</i> ⁻	<i>Lr19</i> negatief
LRR	leusienryke herhalende residue
Ltn	blaarpunt nekrose
M	molaar
MB	mielie-bestuiwing
MBI	merker-bemiddelde introgressie
MBS	merker-bemiddelde seleksie
MBT	merker-bemiddelde terugkruising
McGISH	multikleur genomiese <i>in situ</i> hibridisasie
mg	milligram
MgCl ₂	magnesiumchloried
min	minute
mℓ	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolaar
MR	matig bestand
MS	matig vatbaar
MS-medium	Murashige & Skoog medium
N	normaal
NaCl	natriumchloried
NADPH-oksidasie	nikotienamied-adenien-dinukleotiedfosfaat
Na ₂ EDTA	etileendiamientetra-asynsuur-dinatrium sout
NaOAc	natriumasetaat
NBS	nukleotiedbindingsetel
ng	nanogram
NH ₄ NO ₃	ammoniumnitraat
NIL's	nabye isogeniese lyne
NWMMP	<i>National wheat molecular marker program</i>
P	waarskynlikheid

<i>P. triticina</i>	<i>Puccinia triticina</i>
PKR	polimerasekettingreaksie
PSK	pseudo-swart kaf
<i>pth</i> -gene	patogenisiteitsgene
QTL	kwantitatiewe kenmerk-lokus
R	terugwaartse inleier
RAPD's	lukraak-geamplifiseerde-polimorfiese DNS'e
RFLP's	restriksie-fragment-lengte-polimorfismes
RGA	weerstandsgeneanaloo
<i>R</i> -gene	weerstandsgene
RNS	ribonukleïensuur
rpm	revolusies per minuut
R-proteïene	weerstandspoteïene
RSA	Republiek van Suid-Afrika
SAM's	selektief-geamplifiseerde-mikrosatelliete
SCAR's	volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde-streke
sek	sekondes
SFP's	enkel-kenmerk polimorfismes
SNP's	enkel-nukleotiedpolimorfismes
<i>Sr31</i> ⁺	<i>Sr31</i> positief
SSR's	eenvoudige-volgorde-herhalings
STM's	volgorde-gemerkte-mikrosatelliete
STS's	volgorde-gemerkte-setels
T	Tiamien
T _m	annelingstemperatuur
<i>Taq</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris boraat EDTA
TE	Tris-EDTA
TF ₁	nageslag van terugkruising (eerste filiale generasie)
TF ₂	nageslag van terugkruising (tweede filiale generasie)
TIR-domeine	Toll/interleukin-1 reseptor-domeine
Tris-Cl	Tris-chloried
U	eenhede
µg	mikrogram

μl	mikroliter
μM	mikromolaar
UV	ultraviolet
var.	variasie
VH	verdubbelde haploïede
<i>viz.</i>	<i>videlicet</i>
VPW	volwasse plant weerstand
VPW-gene	volwasse plant weerstandsgene
VSA	Verenigde State van Amerika
v/v	volume per volume
w/v	gewig per volume
X	protease teiken proteïen

LYS VAN SPESIENAAM AFKORTINGS

<i>Ae. bicornis</i>	<i>Aegilops bicornis</i>
<i>Ae. kotschy</i>	<i>Aegilops kotschy</i>
<i>Ae. longissima</i>	<i>Aegilops longissima</i>
<i>Ae. searsii</i>	<i>Aegilops searsii</i>
<i>Ae. sharonensis</i>	<i>Aegilops sharonensis</i>
<i>Ae. speltoides</i>	<i>Aegilops speltoides</i>
<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Aegilops umbellulata</i>
Poaceae Barnh.	Poaceae Barnhart
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>T. comosum</i>	<i>Triticum comosum</i>
<i>T. dicoccum</i>	<i>Triticum dicoccum</i>
<i>T. monococcum</i>	<i>Triticum monococcum</i>
<i>T. speltoides</i>	<i>Triticum speltoides</i>
<i>T. tauschii</i>	<i>Triticum tauschii</i>
<i>T. timopheevii</i>	<i>Triticum timopheevii</i>
<i>T. turgidum</i>	<i>Trtiticum turgidum</i>
<i>T. umbellulatum</i>	<i>Triticum umbellulatum</i>
<i>T. ventricosum</i>	<i>Triticum ventricosum</i>
<i>Th. distichum</i>	<i>Thinopyrum distichum</i>
<i>Th. elongatum</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>
<i>Th. intermedium</i>	<i>Thinopyrum intermedium</i>
<i>Th. ponticum</i>	<i>Thinopyrum ponticum</i>
Triticeae Dum.	Triticeae Dumortier

BEDANKINGS

Hiermee wil ek graag die volgende persone en instansies innig bedank vir hul bydrae tot die voltooiing van my studie:

- My Skepper, wat getrou is en plante laat groei wanneer die tyd ryp is;
- My studieleier, mnr Willem Botes, vir sy leiding, insig, kennis en kreatiwiteit. Dit was 'n voorreg om daarin te deel;
- My ouers, Wouter en Betsie, vir hul liefde, ondersteuning, aansporing en geloof in my, en my sussie, Woutrine, wat altyd met 'n glimlag opstaan;
- Marius Swart, vir die afgelope agt jaar;
- Aletta Eksteen, vir die hulp in die laboratorium, maar bowenal haar vriendskap en kameraadskap;
- Me Marizanne Horn, vir waardevolle gesprekke;
- Die tegniese personeel van die Planteteeltlaboratorium – Louise van der Merwe, Henzel Saul, Corrie Oosthuizen, André Julius, Elize Casper, Elvin Titus en Charles Touti;
- Prof Frans en me Ansie Marais, vir twee jaar se leiding en ondersteuning tydens my nagraadse studies;
- My medestudente in die Planteteeltlaboratorium, wat elke lang dag korter maak en elke middagete 'n fees; en
- Die Wintergraantrust en Harry Crossley, vir finansiële ondersteuning.

INHOUDSOPGAWE

VERKLARING	ii
OPSOMMING	iii
ABSTRACT	iv
LYS VAN AFKORTINGS	v
LYS VAN SPESIENAAM AFKORTINGS.....	x
BEDANKINGS	xi
LYS VAN FIGURE	xv
LYS VAN TABELLE	xvi
1. INLEIDING	1
2. LITERATUUROORSIG	4
2.1 Koringroes	4
2.1.1 Simptome en gevolg van roesinfeksie	4
2.1.2 Lewensiklus van koringroes	5
2.1.3 Blaarroes	6
2.1.4 Stamroes	7
2.1.5 Streeproes	9
2.1.6 Verandering in die genetiese samestelling van roes.....	11
2.1.7 Bekamping van koringroes	12
2.2 Genetiese weerstand.....	13
2.2.1 Weerstand en patogenisiteit	13
2.2.2 Tipes weerstand.....	14
2.2.3 Die molekulêre basis van weerstand	16
2.3 Die aanwending van genetiese weerstand.....	22
2.3.1 Die belangrikheid van genetiese hulpbronne	22
2.3.2 Bronne van genetiese variasie.....	23

2.3.3	Die oordrag van wilde spesie translokasies na koring	26
2.3.4	Die opsporing van wilde spesie translokasies na oordrag	28
2.3.5	Die daarstelling van langdurige weerstand teen roessiektes	32
2.4	Die ontwikkeling van ingeteelde lyne	36
2.4.1	Verdubbelde haploïede (VH)	37
2.4.2	Vergelyking tussen VH en ander metodes vir die ontwikkeling van ingeteelde lyne	41
2.5	Weerstandsgentranslokasies wat in hierdie studie gebruik is.....	42
2.5.1	<i>Lr19</i>	42
2.5.2	<i>Sr31</i> -kompleks.....	44
2.5.3	<i>Lr54/Yr37</i>	45
2.5.4	<i>Lr24/Sr24</i>	47
2.5.5	<i>Lr34/Yr18</i>	48
2.5.6	<i>Sr36</i>	49
2.5.7	<i>Sr2</i>	50
3.	MATERIAAL EN METODEDES.....	52
3.1	Oorsigtelike samevatting.....	52
3.2	Plantmateriaal.....	56
3.3	Genomiese DNS-ekstraksie en -kwantifisering	56
3.4	Molekulêre merkers.....	57
3.5	Optimisering van molekulêre merkers	59
3.6	Ontwikkeling van verdubbelde haploïede	62
3.7	Saailing roestoetse.....	63
3.8	Kleur van wortelpunte vir chromosoomtellings	64
3.9	Finale vermeerdering en karakterisering van ingeteelde lyne	65
4.	RESULTATE EN BESPREKING	66
4.1	Ontwikkeling van 'n heterogene kruisingspopulasie	66

4.1.1	Genomiese DNS ekstraksie vanuit ouerplante	66
4.1.2	Optimisering van molekulêre merkers.....	66
4.1.3	Tipering van ouerplante met molekulêre merkers vir addisionele gene	73
4.1.4	Maak van eerste generasie kruisings en die tipering van die nageslag	75
4.1.5	Tipering van 2007-US-063 met molekulêre merkers.....	78
4.1.6	Kruising van geselekteerde 07M81 plante met 2007-US-063 en tipering van nageslag	79
4.2	Ontwikkeling van ingeteelde lyne	83
4.2.1	Identifisering van plante geskik vir gebruik in VH ontwikkeling	83
4.2.2	Eerste poging vir VH ontwikkeling.....	84
4.2.3	Tweede poging vir VH ontwikkeling	90
4.3	Karakterisering van ingeteelde lyne	94
5.	SAMEVATTING	97
6.	VERWYSINGS	99
7.	ADDENDUM A.....	116

LYS VAN FIGURE

Figuur 2.1 Lewensiklus van die koringgroesswam (Singh <i>et al.</i> , 2002).	5
Figuur 2.2 Eenvoudige voorstelling van 4 moontlike scenarios vir weerstandsreaksie aktivering volgens die reseptor-ligand model (aangepas uit Beynon, 1997).....	21
Figuur 2.3 Diagrammatiese voorstelling van 4 modelle vir die aktivering van 'n weerstandsreaksie na geen-vir-geen interaksies (aangepas uit Bonas & Lahaye, 2002).	22
Figuur 3.1 Diagrammatiese voorstelling van die verloop van die studie.	55
Figuur 4.1 Optimisering van STSLr19 ₁₃₀ , molekulêre merker vir Lr19.	67
Figuur 4.2 Optimisering van iag95, molekulêre merker vir Sr31.	68
Figuur 4.3 Optimisering van SCAR ₄₁₀ , molekulêre merker vir Lr54/Yr37.....	69
Figuur 4.4 Optimisering van SCS73719, molekulêre merker vir Sr24/Lr24.	70
Figuur 4.5 Optimisering van csLV34 en <i>cssfr1</i> , molekulêre merkers vir Lr34/Yr18.	71
Figuur 4.6 Optimisering van stm773, molekulêre merker vir Sr36.	72
Figuur 4.7 Optimisering van X3B028F08 en <i>gwm533</i> , molekulêre merkers vir Sr2.	73
Figuur 4.8 Tipering van ouerplante vir addisionele gene.	74
Figuur 4.9 Tipering van geselekteerde 07M81 plante vir addisionele gene.	77
Figuur 4.10 Tipering van lyn 2007-US-063 met molekulêre merkers.....	79
Figuur 4.11 Tipering van geselekteerde 07M82 plante met Lr24/Sr24 en Lr34/Yr18.	82
Figuur 4.12 Bevestiging van haploïedie in plant 7.15-26 (2).....	85
Figuur 4.13 Haploïede plantjies wat onvoldoende groei toon.	86
Figuur 4.14 Diagrammatiese voorstelling van die aantal VH plante per geenkombinasie.	96
Figuur 7.1 Tipering van VH plante lyne 1-3 vir weerstandsgeentranslokasies.....	116
Figuur 7.2 Tipering van VH plante lyne 4-7 vir weerstandsgeentranslokasies.....	117
Figuur 7.3 Tipering van VH plante lyne 8-11 vir weerstandsgeentranslokasies.....	117
Figuur 7.4 Tipering van VH plante lyne 12-15 vir weerstandsgeentranslokasies... ..	118
Figuur 7.5 Tipering van VH plante lyne 16-19 vir weerstandsgeentranslokasies... ..	118
Figuur 7.6 Tipering van VH plante lyne 20-23 vir weerstandsgeentranslokasies... ..	119
Figuur 7.7 Tipering van VH plante lyne 24-27 vir weerstandsgeentranslokasies....	120
Figuur 7.8 Tipering van VH plante lyne 28-29 vir weerstandsgeentranslokasies... ..	120

LYS VAN TABELLE

Tabel 2.1 Opsomming van die virulensie/avirulensie profiel van die stamroesras TTKS (Ug99) en enkele nuwe variante.....	9
Tabel 2.2 Die basiese aannames van die geen-vir-geen konsep.....	17
Tabel 3.1 Positiewe- en negatiewe kontroles (heksaploïede koring) wat gebruik is vir die bevestiging van die merkers wat in hierdie studie gebruik is.	53
Tabel 3.2 Opsomming van die molekulêre merkers wat in hierdie studie gebruik is.	58
Tabel 3.3 PKR reaksievolumes (in μl) vir die gebruik van die onderskeie molekulêre merkers.....	61
Tabel 3.4 PKR reaksiekondisies vir die onderskeie merkers.....	61
Tabel 3.5 Avirulensie/virulensie data vir elk van die roesrasse wat gebruik is (aangepas uit Le Maitre, 2010).....	63
Tabel 3.6 Klassifikasie van roestoets infeksietipes (aangepas uit McIntosh <i>et al.</i> , 1995).	64
Tabel 4.1 Opsomming van tipering van 07M81 vir <i>Lr19</i> en <i>Sr31</i>	75
Tabel 4.2 Opsomming van gene waaroor die geselekteerde 07M81 plante beskik.	78
Tabel 4.3 Opsomming van tipering van 07M82 vir <i>Lr19</i> en <i>Sr31</i>	80
Tabel 4.4 Resultate van saailing roestoetse.....	84
Tabel 4.5 Resultate van eerste poging vir VH ontwikkeling.	85
Tabel 4.6 Resultate van tweede poging vir VH ontwikkeling.	91
Tabel 4.7 P-waardes na t-toetsing (gelyke variansies) om verskille in haploïede embryo en -plant-produksie tussen die twee pogings, asook tussen die tweede poging en die kontroles, te bepaal.....	92
Tabel 4.8 Resultate van die tipering van die VH plante vir die weerstandsgeentranslokasies.	95

1. INLEIDING

Koring (*Triticum aestivum*) is een van die wêreld se mees belangrike voedselgewasse. Die waarde daarvan as stapelvoedsel word geïllustreer deur die groot invloed wat die verbouing daarvan op voedselsekuriteit uitoefen. Tesame met mielies en rys verskaf dit 60% van die wêreld se totale voedsel (Tilman *et al.*, 2002). Die wêreldbevolking staan tans op ongeveer 6.90 biljoen en daar word voorspel dat hierdie getal na 7.67 biljoen sal styg teen 2020. Teen 2050 sal daar na raming 9.14 biljoen mense die planeet bewandel (FAOSTAT, 2010). Hierdie bevolkingsgroei, tesame met 'n toenemend groter wordende middelklas in die BRIC-lande, en ook Suid-Afrika (Keown, 2008), plaas druk op koringverbouing. Dit is dus voor die hand liggend dat koringverbouing tot sy maksimum potensiaal aangewend behoort te word.

Verskeie faktore belemmer egter direk en indirek hierdie ideaal. Van hierdie faktore sluit in swak verbouingspraktyke soos monokulture en abiotiese stressors soos die versouting van landbougrond (Tilman *et al.*, 2002), 'n jaarlikse afname in die hoeveelheid beskikbare, bewerkbare landbougrond (FAOSTAT, 2010), asook verskeie biotiese stressors. Onder laasgenoemde groep is die koringroessiektes een van die vernaamste bedreigings. Hierdie siektes is daartoe in staat om 'n produksiegebied in totaliteit lam te lê en teen 'n verbysterende tempo te versprei, soos wat geïllustreer word deur die uitbraak van die stamroesras Ug99 in 1999 in Uganda (Singh *et al.*, 2006) en die meer onlangse streeproesbedreiging in Oos-Afrika, Wes-Australië en die VSA (Hovmøller *et al.*, 2008). Dit is dus noodsaaklik dat koringkultivars oor 'n mate van weerstand teen hierdie siektes beskik ten einde opbrengspotensiaal te beskerm en insetkoste as gevolg van 'n toename in chemiese bespuiting te beperk.

Koringteling teen roessiektes word reeds etlike dekades toegepas. Beduidende vordering is en word steeds op hierdie gebied gemaak. Weerstandsteling word as onontbeerlik in die meeste teelprogramme geag. Gesien in die lig van die snelle evolusie van nuwe roesrasse, is dit noodsaaklik dat nuwe genetiese variasie voordurend in die koringgenoom bekendgestel word. Die wilde verwante spesies van koring is geïdentifiseer as 'n omvangryke bron van nuwe variasie vir weerstand teen

koringroes (Zhang *et al.*, 2007). Vir plantetelers val die klem op teling vir duursame weerstand, wat gebaseer word op die samevoeging van gene wat 'n kleiner, maar meer langdurige effek op weerstand uitoefen (Duveiller *et al.*, 2007). Daar is voorgestel dat hierdie gene saam met hoofgene (vir volledige weerstand) in 'n geenpiramiede gekombineer word ten einde duursame weerstand teweeg te bring (Pink, 2002).

Die ontwikkeling van molekulêre merkers word met groot sukses aangewend om die opsporing van hierdie translokasies (en gene afkomstig van die broodkoringgenoom self) na oordrag te bewerkstellig. Die suksesvolle oordrag van sodanige translokasies en die daarstelling van stabiele uitdrukking van weerstand in die nageslag kan egter etlike jare neem. Dit word gevolg deur die intelingsproses wat tot 'n verdere ses jaar in beslag neem. Die verdubbelde haploïede tegniek kan laasgenoemde proses na 'n enkele jaar verkort, sonder dat die agronomiese kwaliteit van die lyne ingeboet word (Guzy-Wróbelska & Szarejko 2003).

Merker-bemiddelde seleksie en verdubbelde haploïede is reeds internasionaal suksesvol in koringteelprogramme vir die versnelling van die kultivarontwikkelingsproses gekombineer (Kuchel *et al.*, 2007). Nuwe spesie-verhaalde bronne van weerstand word tans meer algemeen beskikbaar gestel en die haalbaarheid van soortgelyke benaderings in 'n Suid-Afrikaanse konteks word dus toenemend 'n werklikheid. Dit is egter van belang dat weerstandsgeentranslokasies wat plaaslik beskikbaar is in 'n genetiese agtergrond wat geskik is vir die Suid-Afrikaanse omgewingtoestande en voldoen aan die streng broodkoring kwaliteitsvereistes, geïnkorporeer moet word ten einde 'n meer geskikte produk te ontwikkel.

Die doel van hierdie studie was om 'n reeks verdubbelde haploïede koringlyne te ontwikkel wat kombinasies van wilde spesie translokasies vir roesweerstand bevat. Dit is gedoen deur:

- (a) Roesweerstandsgene *Lr19* (7BL), *Sr31/Lr26/Yr9/Pm8* (1BS) en *Lr54/Yr37* (2DL) met behulp van kruisings in nuwe lyne te kombineer. Plaaslik ontwikkelde gevorderde telerslyne wat oor komplekse weerstand beskik (wat *Lr24/Sr24* (3DL), *Lr34/Yr18* (7D), *Sr36* (2BS) en *Sr2* (3BS) insluit) het, is

gebruik. Molekulêre merkers is gebruik om populasies vir bogenoemde translokasies te tipeer;

(b) 'n Ingeteelde populasie vanaf die geselekteerde lyne te ontwikkel. Dit is met behulp van die verdubbelde haploïede metode (mielie-bestuiwing tegniek) uitgevoer; en

(c) Die ingeteelde lyne molekulêr te karakteriseer vir die weerstandsgeentranslokasies waaroor hul beskik.

2. LITERATUUROORSIG

2.1 Koringroes

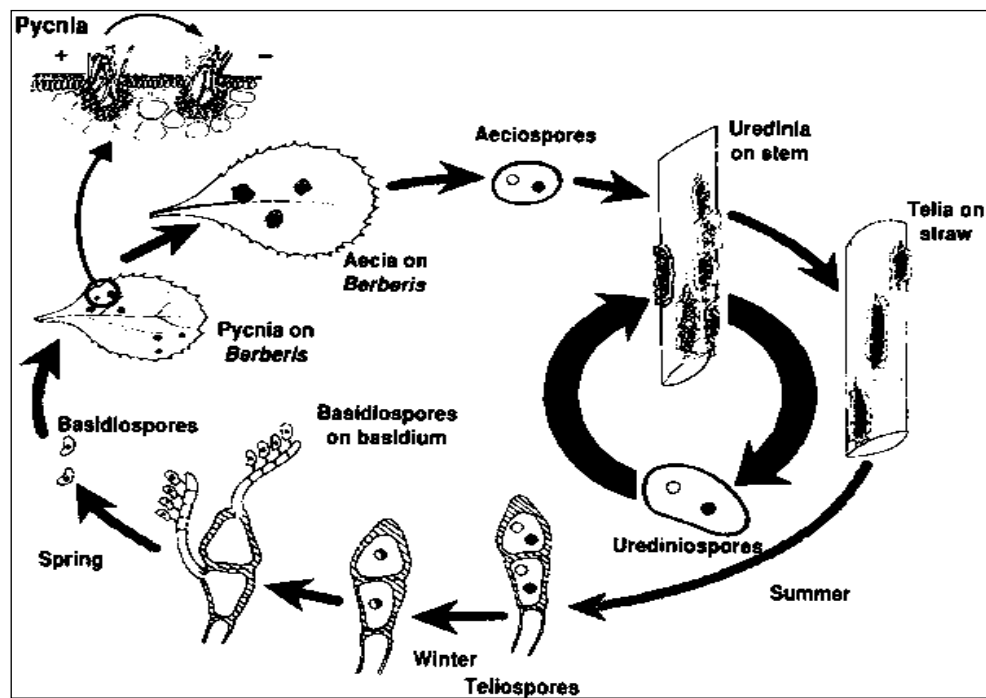
Koringroessiektes is 'n probleem wat jaarliks groot skade aan talle koringoeste wêreldwyd aanrig en wat as van die belangrikste koringsiektes beskou word. Die roespatogene is swamme wat aan die genus *Puccinia* behoort. Drie verskillende roessiektes, naamlik blaarroes (veroorzaak deur *Puccinia triticina*), stamroes (veroorzaak deur *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) en streeproes (veroorzaak deur *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), word onderskei. Hierdie swamme verskil van mekaar ten opsigte van morfologie, optimale groeitoestande en infeksiesimptome. Fisiologies-verskillende rasse (patotipes) van elk van hierdie swamme kan op grond van hul virulensie/avirulensie profiel teenoor spesifieke roesweerstandsgene in 'n stel differensiële koringgashere onderskei word. (Kolmer, 2005)

2.1.1 Simptome en gevolg van roesinfeksie

Die koringroesswamme is gedwonge parasiete en kan slegs op lewende gashere oorleef. Blaarroes- en streeproes-simptome kom hoofsaaklik op die blare voor, terwyl stamroes beide die blare en die stamme aantast. Die tipiese diagnostiese simptome van roes is die ontwikkeling van roeskleurige puisies in die gevalle van blaar- en stamroes, en langwerpige sporkolonies (met die voorkoms van geel strepe op die blaar) in die geval van streeproes. Roesinfeksie veroorsaak verlaagde vlakke van fotosintese en verhoogde vlakke van transpirasie en respirasie in die plant en manifesteer uiteindelik in verminderde lewenskragtigheid, laer saadset, verrimpelde saad en swak wortelgroei. Besmette plante neig om meer vatbaar te wees vir sekondêre infeksies. Roesinfeksie verlaag verder ook die waarde van koring as weidingsgewas, deurdat dit 'n verlies aan blaarmassa teweegbring en die plante minder smaaklik en selfs giftig vir diere word. (Wiese, 1987)

2.1.2 Lewensiklus van koringroes

Koringroesswamme beskik oor beide geslagtelike- en ongeslagtelike lewensstadia. Die lewensiklus van 'n roesswam behels vyf spoorfases, waarvan drie op 'n alternatiewe gasheer plaasvind (Fig. 2.1).



Figuur 2.1 Lewensiklus van die koringroesswam (Singh *et al.*, 2002).

Gedurende die groeiseisoen ontwikkel uridia wat uridiospore bevat op die koringplant. Uridiospore is geharde strukture en kan oor groot afstande deur wind en reën vervoer word. Dit speel dus 'n verneme rol in die verspreiding en epidemiese vermeerdering van die patogeen. Die spore ontkiem wanneer dit met water op die plant in aanraking kom. Dit lei tot die ontwikkeling van 'n kiembuis en die daaropvolgende infeksie van die gasheer. Die swam vermeerder baie vinnig by wyse van verskeie ongeslagtelike voortplantingssiklusse deur die verloop van die groeiseisoen. Namate die groeiseisoen (somer) tot 'n einde kom, ontwikkel teliospore in die uridia. Dit is die spoorfase waarin die swam oorwinter. In die lente ontkiem die teliospore, waarna meiose plaasvind en haploïede basidiospore ontwikkel. Die basidiospore infekteer die alternatiewe gasheer en spermatia ontwikkel uit die basidiospore. Binne die spermatia ontwikkel spermatiaspore van verskillende

paringstipes ((+) of (-)). Spermatiaspore van verskillende paringstipes smelt saam om 'n dikarioon te vorm. Hierdie proses is belangrik vir genetiese rekombinasie en variasie in die swam. Die dikarion ontwikkel tot 'n aecium, wat aeciospore produseer. Laasgenoemde infekteer voorts koringplante in die nabye omgewing en sodoende word die lewensiklus voltooi. (Knott, 1989)

2.1.3 Blaarroes

Blaarroes word ook bruinroes, dwergroes of oranjeroes genoem. Hierdie swam hou wêreldwyd 'n groot bedreiging in vir koringverbouing en is die algemeenste en wydste verspreid van die drie roessiektes. Verliese as gevolg van blaarroes is normaalweg klein, maar kan tot 30% persent beloop in ernstige gevalle. Blaarroes is veral 'n groot probleem in Noord-Afrika, Sentraal- en Suidoos-Asië, Oos-Europa en Noord- en Suid-Amerika. (Singh *et al.*, 2002) In 'n studie wat oor 'n tydperk van 10 jaar uitgevoer is in 22 ontwikkelende lande (waar altesaam meer as 100 000 ha koring verbou word), het opbrengsverliese te wete aan blaarroes na skatting 3.7% beloop (Marasas *et al.*, 2004). Ongeveer 40-60 verskillende rasse van die patoëen word jaarliks in Noord-Amerika geïdentifiseer (Kolmer, 2005).

Die ontwikkeling van ronde, oranje-rooi uridia van ongeveer 0.2 cm in deursnee op die boonste oppervlak van blare is kenmerkend van infeksie deur *P. triticina*. Die uridia word dikwels deur 'n chlorotiese vlek omring. Die blare bly normaalweg vir 'n wyle groen, maar word bruin en nekroties namate meer uridiospore gevorm word. Klein, swart vlekies kom normaalweg op die onderkant van blare voor in gevorderde stadia van infeksie in vatbare kultivars. *P. triticina* floreer in areas met 'n gemiddelde temperatuur tussen 15 en 22°C en waar dou vir ten minste 6h van die dag teenwoordig is. In gunstige omstandighede kan 'n nuwe generasie spore binne sewe tot tien dae geproduseer word, wat die ontwikkeling van epidemies versnel. (Scott, 1990) 'n Verdere faktor wat tot die ontwikkeling van epidemies bydra, is dat inokulum tussen seisoene oorgedra kan word, mits koel temperature gehandhaaf word en koring of 'n geskikte alternatiewe gasheer beskikbaar is (Duveiller *et al.*, 2007). Epidemies versprei egter normaalweg nie oor groot areas nie, aangesien minder uridiospore gevorm word in vergelyking met ander koringroese. Blaarroes verkies *T. aestivum* as primêre gasheer, maar word ook soms op gars en

triticale (*X Triticosecale* Wittmack) aangetref. Die vernaamste alternatiewe gashere is spesies van die genus *Thalictrum*. (Singh *et al.*, 2002)

2.1.4 Stamroes

Stamroes word ook swartroes genoem, na aanleiding van die swart kleur van die uridia nadat teliospore ontwikkel het. Dit kan tot 50% van 'n oes binne 'n enkele maand vernietig (Singh *et al.*, 2002). Die vroegste opgetekende stamroesepidemie in Suid-Afrika het in 1726 voorgekom. Daarna het vele verwoestende epidemies gevolg, vernaam in die Vrystaat in die 1957/58 seisoen. In die laat 1970's het die vrystelling van "SST66" en "SST44", twee bestande koringkultivars, stamroes onder beheer gebring. (Lombard, 1986) Verskeie epidemies het ook Australië en Noord-Amerika tussen 1900 en 1960 geteister (Kolmer, 2005). Die siekte is egter tot 'n groot mate onder beheer gebring, danksy die voorkomende ontwikkeling van hoogs weerstandbiedende kultivars en die uitroei van die swam se alternatiewe gashere, vernaam die suurbessie (*Berberis vulgaris*). Hierdie plant was 'n belangrike bron van inokulum vroeg in die seisoen en talle nuwe kombinasies van gene vir virulensie en aggressiwiteit het op die suurbessie ontwikkel. (Singh *et al.*, 2002)

Desnieteenstaande het 'n nuwe, hoogs virulente stamroesras, Ug99 (ook bekend as TTKS volgens die Noord-Amerikaanse nomenklatuur (Wanyera *et al.*, 2006)), in 1999 in Uganda ontwikkel. Hierdie ras hou groot bedreiging vir koringverbouing in, aangesien dit virulent is teen een van die belangrikste en mees algemeen-gebruikte weerstandsgene, *Sr31*. Verskeie ander belangrike weerstandsgene, waaronder *Sr38*, is reeds oneffektief teen Ug99 (Tabel 2.1). Selfs meer kommerwekkend was die snelle verspreiding van die virulente rasse na die hooglande van Oos-Afrika – Kenia, Ethiopië, Eritrea en Tanzanië. (Singh *et al.*, 2006) In 2009 is Iran by hierdie groep lande gevoeg nadat ras TTKSK in 'n provinsie waar stamroes nog nie vantevore opgemerk is nie, geïdentifiseer is (Nazari *et al.*, 2009). Ook in Suid-Afrika is daar rede tot kommer. Pretorius *et al.* (2010) het in 'n onlangse verslag 'n nuwe stamroesras, PTKST, in Greytown, Suid-Afrika geïdentifiseer. Die ras is verwant aan die Ug99 familie en virulent teen beide *Sr24* en *Sr31*. Wat meer is, het meer as 45.63% van die Suid-Afrikaanse koringkultivars wat met hierdie ras geïnokuleer is, vatbaar daarvoor getoets, wat kommerwekkend is. Navorsers vrees dat Ug99, en

selfs meer virulente verwante rasse, verder na die groter Asië en die Amerikas sal versprei (Singh *et al.*, 2006). In 'n inisiatief deur die Borlaug Global Rust Initiative (BGRI) is 'n elektroniese platform, "RustMapper", vir navorsers en die publiek geskep om die verspreiding van Ug99 te besigtig. Die platform bevat onder meer ook voorspellings van toekomstige migrasieroetes van die patogeen, die rasse wat by verskillende lokaliteite aangeteken is en 'n aanduiding van die graad van infeksie daarmee saam. RustMapper is aanlyn beskikbaar by: <http://apps.cimmyt.org/gis/rustmapper/Index.htm>.

Die aanvanklike simptome van stamroesinfeksie is lang, maer, oranje-rooi uridia op die blare, blaarskedes en/of stamme van die plant. In vergelyking met blaarroes, vereis stamroes 'n langer douperiode, meer lig en warmer toestande vir infeksie. Dit het dikwels tot gevolg dat koringaanplantings eers op 'n gevorderde stadium deur stamroes ingeneem word. Lente-aanplantings van koring is gevolglik meer vatbaar vir stamroes as dié wat in die winter geplant is. Om hierdie rede word kultivars wat vroeg reeds volwassenheid bereik dikwels gesaai in 'n poging om verliese te verminder. (Scott, 1990) Meer as 10 000 uridiospore kan daaglik deur 'n enkele stamroesuridium geproduseer word, maar slegs een uit elke 10 slaag daarin om 'n plant te infekteer. Die swam het die vermoë om strawwe winters met temperature onder vriespunt te oorleef (Singh *et al.*, 2002). Stamroes word hoofsaaklik op koring en triticale aangetref, maar ook in 'n mindere mate op gars, rog, kweekgras, wildegars en hawer (Scott, 1990).

Tabel 2.1 Opsomming van die virulensie/avirulensie profiel van die stamroesras TTKS (Ug99) en enkele nuwe variante.

Variant	Virulensie#	Avirulensie#
TTKS (Ug99)	<i>Sr5, Sr6, Sr7a, Sr7b, Sr8a, Sr8b, Sr9a, Sr9b, Sr9d, Sr9e, Sr9f, Sr9g, Sr10, Sr11, Sr12, Sr15, Sr16, Sr17, Sr18, Sr19, Sr20, Sr21, Sr23, Sr30, Sr31, Sr34, Sr38, Sr41, Sr42, SrWld-1</i>	<i>Sr2, Sr13, Sr14, Sr22, Sr24, Sr25, Sr26, Sr27, Sr28, Sr29, Sr32, Sr33, Sr35, Sr36, Sr37, Sr39, Sr40, Sr43, Sr44, Sr45, SrTmp, SrTt-3, Sr1A.1R</i>

Nuwe variante	Weerstandgene waartoe virulent	Land waar opgemerk
TTKSK	<i>Sr5, Sr6, Sr7b, Sr8a, Sr9a, Sr9b, Sr9d, Sr9e, Sr9g, Sr10, Sr11, Sr21, Sr30, Sr31, Sr38, SrMcN</i>	Kenia (Jin <i>et al.</i> , 2008)
TTKST	<i>Sr5, Sr6, Sr7b, Sr8a, Sr9a, Sr9b, Sr9d, Sr9e, Sr9g, Sr10, Sr11, Sr21, Sr24*, Sr30, Sr31, Sr38, SrMcN</i>	Kenia (Jin <i>et al.</i> , 2008)
TTTSK	<i>Sr21, Sr31, Sr36</i>	Kenia (Jin <i>et al.</i> , 2009)
PTKST (2SA107)	<i>Sr5, Sr6, Sr7b, Sr8a, Sr8b, Sr9a, Sr9b, Sr9d, Sr9e, Sr9g, Sr10, Sr11, Sr16, Sr17, Sr24, Sr30, Sr31, Sr34, Sr38, Sr41, SrMcN</i>	Suid-Afrika (Pretorius <i>et al.</i> , 2010)

#Aangepas uit Singh *et al.*, 2006 & Jin *et al.*, 2007.

*Weerstandgene wat in vetdruk aangedui word was voorheen effektief in die land waar die nuwe variant opgemerk is. Dit is moontlik dat TTKS (en ander variante) reeds in ander lande virulent is tot hierdie gene.

2.1.5 Streeproes

Streeproes, wat ook as geelroes bekend staan, is net soos sy eweknieë daartoe in staat om groot skade aan te rig. Oesverliese kan soveel as 50% na strawwe infeksie en selfs 100% in uiterste situasies beloop (Singh *et al.*, 2002). In Suid-Afrika is opbrengsverliese van tot 65% in die verlede in proewe aangeteken (Pretorius *et al.*, 2007). Streeproes is in Augustus 1996 vir die eerste maal in Suid-Afrika waargeneem (Pretorius *et al.*, 1997). Dit word in meer as 60 lande aangemeld en is veral 'n bedreiging in Oos-Afrika, die Verre-Ooste, Wes-Asië en Wes-Europa. In 'n verontrustende waarneming is twee nuwe, uiters aggressiewe streeproesrasse tussen 2000 en 2002 in Noord-Amerika, Australië en Europa geïdentifiseer. Die nuwe rasse het binne 'n kort tydperk wêreldwyd versprei en is ook in areas wat voorheen as ongunstig vir streeproesinfeksie beskou is, opgemerk. Dit blyk dat hierdie rasse by

hoër temperature as wat voorheen as optimaal beskou is, oorleef het. Warm gebiede soos die tropiese hooglande van Oos-Afrika, Wes-Australië en die oostelike dele van die VSA het onverwags die voorkoms van stamroes aangeteken. (Hovmøller *et al.*, 2008) Die Noord-Amerikaanse roespopulasie het by temperature so hoog as 28°C tot drie maal meer spore per puisie as ouer isolate geproduseer (Milus *et al.*, 2009). Hierdie bevindinge beklemtoon die belangrikheid van voortdurende verbetering van streeproesweerstand.

Die simptome van streeproes is vroeër in die seisoen sigbaar as dié van blaar- en stamroes, omdat gematigde temperature optimaal vir roesontwikkeling is. Infeksie deur streeproes is op die blare tussen die nerwe sigbaar en word gekenmerk deur lang, geel strepe wat bestaan uit streeproesuridia wat ronde, oranje-geel uridiospore produseer. Swart telia kan teen die einde van die seisoen in die nekrotiese areas op die blare ontwikkel (Sing *et al.*, 2002). Infeksie vereis hoë ligintensiteit en gematigde temperature tussen 7 en 15°C. Om hierdie rede is dit in die verlede vernaam in hoogliggende gebiede, langs die noordelike breedtegrade en in koeler jare opgemerk (Murray *et al.*, 1998). Soos reeds genoem, blyk dit egter dat hierdie gegewens as gevolg van die ontwikkeling van die nuwe rasse herskryf moet word.

Aangesien streeproesuridiospore nie vir 'n lang tydperk lewenskragtig is nie, oorleef die swam op opslagkoring, gars, rog en triticale in die afseisoen. Die uridiospore is ook gevoelig vir ultravioletlig en temperature laer as -4°C. Daarom word dit waarskynlik nie so ver soos die spore van blaar- en stamroes vervoer nie. (Singh *et al.*, 2002) Met die waarneming van die nuwe aggressiewe stamroesrasse is daar egter getuigenis dat die streeproesfungus moontlik ook daartoe in staat is om teen 'n veel vinniger tempo te versprei as wat voorheen geglo is (Hovmøller *et al.*, 2008).

Tot onlangs is daar aanvaar dat streeproes slegs oor 'n ongeslagtelike lewensiklus beskik, aangesien geen alternatiewe gasheer vir streeproes geïdentifiseer kon word nie. Jin *et al.* (2010) het egter in 'n opspraakwekkende studie aangetoon dat die suurberssie, *Berberis* spesies, net soos in die geval van stamroes, as alternatiewe gasheer vir die geslagtelike lewenstadium van streeproes optree. Hierdie inligting is waarskynlik 'n belangrike sleutel tot die bevordering van kennis rakende streeproes en sal moontlik lei tot meer doeltreffende bekampingstrategieë van hierdie bedreiging.

2.1.6 Verandering in die genetiese samestelling van roes

Nuwe roesrasse ontwikkel deur middel van mutasie, geslagtelike rekombinasie of somatiese rekombinasie, gevolg deur seleksie vir virulensie en aggressiwiteit (Duveiller *et al.*, 2007). Benewens hierdie meganismes, lewer migrasie ook 'n noemenswaardige bydrae tot verandering in die populasie- (en by implikasie genetiese-) samestelling van roes. Stamroesspore word byvoorbeeld jaarliks oor ongeveer 800 km van die Noord-Amerikaanse grasvlaktes deur wind versprei (Singh *et al.*, 2002). Dit lei daartoe dat nuwe genetiese materiaal voortdurend beskikbaar is vir die ontwikkeling van nuwe rasse. Die vermoë van roes om teen 'n snelle tempo te evolueer het 'n direkte, beduidende invloed op die beheer daarvan. Dit word duidelik geïllustreer deur die verhoogde fokus op weerstandsteling en die ontginning van nuwe bronne van genetiese weerstand teen beide stamroes en streeproes as gevolg van die ontwikkeling van nuwe virulente variante.

Ten einde koringkultivars te teel wat weerstandbiedend is teen nuwe rasse van die roespatogeen, is dit noodsaaklik om te onderskei tussen verskillende rasse en hul herkoms en potensiaal vir toekomstige variasie te bepaal. Bestaande weerstand in kiemplasma kan ook geïdentifiseer word met behulp van gekarakteriseerde roesrasse. (Park, 2008) Tradisioneel word die karakterisering van roes deur middel van differensiële geenstelle in koringlyne gedoen. 'n Ras sal op grond van sy virulensie/avirulensie profiel geklassifiseer word. Hedendaagse molekulêre tegnieke maak dit verder moontlik om rasse op grond van hul genetiese profiele te klassifiseer. Dit stel ook patoloë in staat om die stamboom van 'n spesifieke ras met behulp van filogenetiese bome in meer besonderhede te na te spoor. Verskeie tegnieke word vir hierdie doel aangewend, *viz.* lukraak-geamplifiseerde-polimorfiese-DNS'e (RAPD's), eenvoudige-volgorde-herhalings (SSR's), geamplifiseerde-fragment-lengte-polimorfismes (AFLP's), selektief-geamplifiseerde-mikrosatelliete (SAM's) en volgorde-gemerkte-mikrosatelliete (STM's) (Visser *et al.*, 2009). In 'n onlangse studie het Visser *et al.* (2009) SSR's en AFLP's aangewend om die genetiese struktuur van 'n aantal Suid-Afrikaanse stamroesrasse met dié van Ug99 te vergelyk. Inleierstelle wat in bogenoemde studie ontwerp is, is later gebruik om vas te stel dat 'n variant van Ug99, PTKST, in Suid-Afrika aangetref word (Pretorius *et al.*, 2010). Deur op hoogte te bly van veranderinge in die roespopulasie in 'n bepaalde streek, kan potensiële bedreigings dus vroeër geïdentifiseer word.

2.1.7 Bekamping van koringroes

Die arsenaal van metodes wat aangewend kan word om roes te bekamp kan breedweg in drie groepe verdeel word, naamlik verbouingsmetodes, chemiese beheer en genetiese weerstand (Knott, 1989). Verbouingsmetodes is hoofsaaklik gerig op onderbreking van die lewensiklus van die swam. Hieronder ressorteer die verwydering van die swam se alternatiewe gashere uit die omgewing om sodoende die vorming van 'n "groen brug" tussen seisoene te voorkom, asook die aanplanting van vroeg- of laat-rypwordende kultivars, afhangende van wanneer roesinfeksie normaalweg in die betrokke area plaasvind. Hierdie metodes word tot 'n mindere mate gebruik. Indien dit wel gebruik word, word meer as een strategie aangewend aangesien geeneen voldoende beskerming op sy eie bied nie. (Singh *et al.*, 2002)

Chemiese swamdoders word algemeen deur produsente gebruik vir die beheer van roes in Suid-Afrika (Paul, 2009). Die gebruik van hierdie middels is egter slegs werklik ekonomies in areas waar graan intensief verbou word, die chemiese middel verskeie siektes beheer en die opbrengste hoog is (Knott, 1989). Scott (1996) het aangetoon dat die gebruik van chemiese middels vir die bekamping van swamsiektes in die Wes-Kaap onder sekere omstandighede 'n verhoging in opbrengs teweegbring. In die meeste gevalle is dit egter nie die mees ekonomiese metode om roes te bekamp nie, aangesien die middels en die aanwending daarvan duur is en meer as een aanwending onder hoë siektedruk nodig is (Boshoff, 2003; Paul, 2009). Die beskikbaarheid van doeltreffende swamdoders is ook in baie gevalle 'n beperkende faktor (Knott, 1989). In Suid-Afrika is 14 aktiewe bestanddele geregistreer vir die beheer van die drie verskillende roessiektes. Daar moet desnieteenstaande in gedagte gehou word dat swamme voorturend evolueer en weerstand teen hierdie middels, sowel as teen reeds bestande kultivars ontwikkel. (Paul, 2009) Chemiese roesbestryding sal dus noodwendig altyd toegepas moet word ten spyte van die toenemende bewustheid rakende die invloed van hierdie middels op die omgewing en die verbruiker.

Genetiese weerstand kan in verskillende vorme aangewend word, te wete die gebruik van spesiemengsels, kultivarmengsels, vuil- en skoon multilyne, asook die aanplanting van verskillende kultivars binne 'n bepaalde produksiegebied (Marais & Botes, 2009). Die mees eenvoudige, doeltreffende en koste-effektiewe metode vir die

bekamping van koringroes is egter die aanplanting van bestande kultivars (Knott, 1989). Dit impliseer dat teelprogramme vir roesweerstand 'n onontbeerlike entiteit in lande waar koring aangeplant word, behoort te wees.

2.2 Genetiese weerstand

2.2.1 Weerstand en patogenisiteit

Volgens Parlevliet (1993) kan die verdedigingsmeganismes wat deur 'n plant aangewend breedweg in drie kategorieë verdeel word, naamlik vermydingsmeganismes, verdraagsaamheid (toleransie) en weerstand. Vermydingsmeganismes word aangewend om kontak tussen die patogeen en die plant te verminder. Verdraagsaamheid is die vermoë van die plant om die patogeen te verdra terwyl relatief min skade aangerig word. Wanneer plantetelers op soek is na nuwe metodes om patogene te troef, val die kollig egter byna uitsluitlik op die benutting van weerstand. Weerstand kan in die breë sin gedefinieer word as “enige afname in die groei en ontwikkeling van 'n patogeen nadat dit 'n gasheerkultivar geïnfekteer het”. (Parlevliet, 1993; 1995)

Patogenisiteit word as “die vermoë van 'n patogeen om siekteontwikkeling in 'n gasheer teweeg te bring” gedefinieer. Patogenisiteit is 'n kwantitatiewe, waarneembare fenotipiese eienskap van 'n patogeen. Die term “nie-patogenies” verwys na die situasie waar 'n patogeen tradisioneel nie daartoe in staat is om 'n spesifieke gasheerspesie te infekteer nie, hetsy of die plant oor die nodige weerstandsmeganismes beskik of nie. Daar word algemeen hierna as “nie-gasheerspesifieke weerstand” verwys. Hieruit volg dat plantweerstand 'n bepalende effek op die patogenisiteit van 'n patogeen het. Virulensie en avirulensie verwys na fenotipes van patogenisiteit, met ander woorde die graad van patogenisiteit van 'n patogeen op 'n bepaalde gasheer. Indien 'n gasheerplant weerstandbiedend teen 'n spesifieke ras van die patogeen is, word die patogeen “skadeloos” gestel en is dit avirulent. Die term “virulent” beskryf 'n patogeen in die teenoorgestelde situasie, waar die gasheerplant nie oor die nodige meganismes beskik om infeksie te verhoed nie. Virulensie word deur sommige navorsers ook vertaal met die term

“aggressiwiteit”. Aggressiwiteit word egter in die meeste gevalle gebruik om ’n patogeen te beskryf in terme van die tempo van siekteontwikkeling ná infeksie in ’n plant (Shaner *et al.*, 1992). McIntosh en kollegas (1995) stel dit dat ’n patogeen se fenotipe as avirulent (lae patogenisiteit) of virulent (hoë patogenisiteit) beskryf kan word. Hulle meen nietemin dat die gebruik van die term “virulent” onvanpas is.

2.2.2 Tipes weerstand

Hoewel daar in die literatuur ’n wye verskeidenheid terme met weerstand in verband gebring word, wys Parlevliet (1995) daarop dat dit nie impliseer dat daar tussen verskillende tipes weerstand *per se* onderskei kan word nie. Die terme dui bloot op sekere aspekte van weerstand.

Nie-gasheer weerstand is hoofsaaklik gerig teen patogene waar spesialisasie afwesig is. Dit is ’n inherente weerstand wat gerig is teen die meerderheid patogene. Nie-gasheer weerstand word deur meeste navorsers ook aan die term “horisontale weerstand” gelyk gestel. Hierdie term is deur Van der Plank (1968) voorgestel om die situasie waar ’n gasheer ’n gelyke mate van weerstand teen alle rasse van ’n patogeen toon, te beskryf. Dit word algemeen aanvaar dat hierdie tipe weerstand die gevolg van die werking van verskeie weerstandsgene is, vandaar die sinoniem “poligeen weerstand”. Hierdie gene staan algemeen as “nie-hoofgene” bekend en is in die meeste gevalle nie daartoe in staat om individueel totale weerstand teen patogeeninokulasie teweeg te bring nie. Die effek van hierdie geenprodukte is egter van meer langdurige aard. Dit verhoed in die algemeen nie dat ’n gasheerplant geïnfekteer word nie, maar verhoed wel die ontwikkeling van epidemies deurdat dit die ontwikkelingstempo van individuele infeksie-setels op die plant strem. In die geval van roesswamme, staan hierdie gene as “vertraagde-roes gene” (“slow rusting genes”) bekend. (Agrios, 2005; Rosewarne *et al.*, 2008) In een studie by koring is kwantitatiewe kenmerk-lokus- (QTL) analise gebruik om ten minste 18 loci met vertraagde-roes effek teen blaarroes en ten minste 15 loci vir streeproes te identifiseer. Hierdie loci sluit die *Lr46/Yr29* weerstandsgene teen beide blaar- en streeproes in (Rosewarne *et al.*, 2008). ’n Ander prominente geen wat met vertraagde-roes geassosieer word, is *Sr2*, wat vir nie-gasheer, duursame weerstand teen stamroes aangewend word (McIntosh *et al.*, 1995).

Ras-spesifieke weerstand word as die teenpool van nie-gasheer weerstand beskou. Hierdie term beskryf die situasie waar 'n kultivar hoogs weerstandbiedend teen 'n spesifieke ras van 'n patogeen is, terwyl dit vatbaar is vir 'n ander ras van dieselfde patogeen. Van der Plank (1968) gebruik die term “vertikale weerstand” om hierdie tipe weerstand te beskryf. Ras-spesifieke weerstand berus op geen-vir-geen interaksies (sien 2.2.3) en word deur een of 'n paar gene beheer – vandaar die alternatiewe benaminge monogeniese- of oligogeniese weerstand. Hierdie gene word “hoofgene” genoem. Hoofgene bied in die meeste gevalle totale weerstand teen 'n spesifieke patogeen, ongeag die omgewingsomstandighede (Parlevliet, 1995; Reignault & Sancholle, 2005). 'n Nadeel hiervan is egter dat dit sterk seleksiedruk op die patogeen uitoefen, met die gevolg dat slegs enkele mutasies in 'n patogeenpopulasie vereis word voordat 'n weerstandbiedende kultivar vatbaar word vir patogeeninfeksie (Rosewarne *et al.*, 2008). Kultivars wat oor ras-spesifieke weerstand teen 'n patogeen beskik, toon 'n hipersensitiwiteitsreaksie (HR) wanneer patogeeninfeksie deur 'n plant herken word. Die HR word geassosieer met vinnige, geprogrammeerde seldood in die area waar infeksie plaasgevind het, in 'n poging om die patogeen tot hierdie area te beperk. Dit is normaalweg duidelik sigbaar as 'n letsel op die plantoppervlak. Die selle aanliggend aan die omgewing waar infeksie plaasgevind het ontkleur, word granulêr en nekroties. (Agrios, 2005)

Volwasse plant weerstand (VPW) is wanneer weerstand nie tydens die saailing stadium uitgedruk word nie, maar eerder tydens 'n latere stadium van die plant se lewensiklus ontwikkel (Parlevliet, 1995). Volwasse plant weerstand is gewoonlik geassosieer met vertraagde-roes, waar roesinfeksie teen 'n stadiger tempo vorder (Duveiller *et al.*, 2007). Hierdie gene word in die konteks van volwasse plant weerstand, “VPW-gene” genoem. VPW-gene tree kwantitatief op en lewer individueel 'n klein bydrae tot siekteweerstand. Wanneer hierdie gene egter gekombineer word, kan siekteweerstand vergelykbaar met immuniteit waargeneem word. VPW-gene verskaf breë spektrum weerstand teen al die rasse van 'n patogeen en die weerstand is dikwels duursaam. Daar is steeds baie ruimte vir ondersoek rakende die molekulêre werking van VPW. (Ayliffe *et al.*, 2008) Sommige VPW-gene verleen ook hipersensitiewe weerstand aan lyne. Dit sluit blaarroesweerstandsgene *Lr12*, *Lr22a*, *Lr22b*, *Lr35*, *Lr48* en *Lr49* in (Bansal *et al.*, 2008).

Duursame weerstand is 'n kwantitatiewe term. Dit beskryf weerstand wat vir 'n relatief lang tydperk, ten spyte van blootstelling aan die patogeen, effektief is (Parlevliet, 1995). Die lengte van die tydperk waartydens die weerstand effektief is, is relatief. Duursame weerstand word normaalweg met horisontale weerstand geassosieer wat hoofsaaklik op die werking van nie-hoofgene berus (Rosewarne *et al.*, 2008). Slegs 'n enkele geen word soms benodig om duursame weerstand te bewerkstellig, terwyl daar in ander gevalle meer as een geen gebruik moet word. Nie-hoofgene word dikwels saam met hoofgene aangewend om duursame weerstand te verkry. 'n Nie-hoofgeen, *Yr30*, gemoeid met VPW, word byvoorbeeld in dieselfde chromosomale streek as *Sr2*, 'n geen vir duursame weerstand, aangetref (William *et al.*, 2001). Duursame weerstand is op die oog af die ideaal waarna alle plantetelers wat met siekteweerstand gemoeid is, streef. Dit word veral in ontwikkelende lande as 'n kardinale prioriteit vir die beskerming van voedselsekureit geag (Hogenboom, 1993).

2.2.3 Die molekulêre basis van weerstand

Plantweerstand teen patogene berus op die wisselwerking tussen geenprodukte van onderskeidelik die plant en die patogeen. Die hipotese van 'n geen-vir-geen verwantskap tussen 'n plant en sy patogeen is meer as 50 jaar gelede deur Harold Flor gepostuleer. Sy werk het bevestig dat 'n gasheerplant en 'n patogeen geneties wisselwerk met mekaar. Dit het ook die weg gebaan vir navorsers en plantetelers om hierdie wisselwerking te ondersoek en dit uiteindelik te benut ten einde weerstandbiedende kultivars te ontwikkel. (De Wit, 1997) Tydens sy studies oor vlas en die vlasroespatogeen (*Melampsora lini*) het Flor gevind dat 'n vlaskultivar slegs weerstandbiedend teen 'n spesifieke fisiologiese ras van die vlas-roesswam is wanneer die kultivar oor 'n dominante weerstandsgeen (*R*-geen) beskik wat ooreenstem met 'n dominante avirulensiegeen (*avr*-geen) in die patogeen. Hy het voorts voorgestel dat die *Avr*-geenprodukte deur die produkte van die *R*-gene herken word en dat hierdie herkenning 'n onverenigbare weerstandsreaksie tot gevolg het. Indien die plant nie oor dominante *R*-gene teen 'n spesifieke patogeen beskik nie, word geen weerstandsreaksie ontlok nie en word die patogeen in staat gestel om die gasheer te infekteer. Daar vind dus 'n verenigbare reaksie plaas tussen die gasheer en die patogeen. 'n Groot aantal *R*-gene herken slegs spesifieke rasse van 'n

patogeen en sal dus slegs weerstand bied wanneer die Avr-geenprodukt van só 'n ras teenwoordig is. (Flor, 1956; Reignault & Sancholle, 2005) Die geen-vir-geen interaksie word in Tabel 2.2 opgesom. Daar bestaan uitsonderings wanneer weerstand nie die geen-vir-geen model gehoorsaam nie, wat onder meer insluit: weerstand en avirulensie wat resessief oorgeërf word; weerstand wat deur meer as een geen beheer word; en weerstand wat bykomend deur modifiseerders en onderdrukkers gereguleer word (Laugé & De Wit, 1998).

Tabel 2.2 Die basiese aannames van die geen-vir-geen konsep.

Gasheerplantgenotipe	Patogeengenotipe	
	<i>Avr(-)</i>	<i>avr/avr</i>
<i>R(-)</i>	Weerstandig	Vatbaar
<i>r/r</i>	Vatbaar	Vatbaar

(a) Weerstandsgene (R-gene)

Sedert Flor se werk gepubliseer is, het kennis rakende die molekulêre basis van weerstand aansienlik uitgebrei en is dit 'n steeds groeiende navorsingsveld. Navorsers is dit egter eens dat die konsep van weerstand uiters kompleks is en waarskynlik nooit ten volle begryp sal word nie. Nietemin, danksy die ontwikkeling van molekulêre biologie, kan weerstandsgene nou op molekulêre vlak geanaliseer word – wat aanleiding gegee het tot 'n meer gesofistikeerde benadering tot weerstandstelling. 'n Groot aantal weerstandsgene teen 'n verskeidenheid koringsiektes is reeds uit die gewas self, asook sy verwante wilde spesies geïsoleer. Volgens die “Catalogue of gene symbols for wheat” (McIntosh *et al.*, 2008) en die “Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement” (McIntosh *et al.*, 2009) is daar teen 2009 reeds 48 verskillende simbole vir stamroes-weerstandsgene toegeken. Daarbenewens is daar simbole aan 42 streeproes en 66 blaarroes *R*-gene toegeken.

Weerstandsgene kan volgens die molekulêre struktuur van die voorgestelde proteïene waarvoor hul kodeer in ses klasse¹ verdeel word (Agrios, 2005). Die meerderheid *R*-gene wat uit graanspesies geïsoleer is, behoort egter tot slegs een van hierdie klasse (Klas V). Hierdie gene kodeer vir proteïene wat 'n sentrale domein bevat en wat oor 'n nukleotiedbindingsetel (NBS) beskik. Die C-terminaal van die proteïen bestaan uit 'n reeks leusienryke herhalende residue (LRR). Gene wat in hierdie klas voorkom word "NBS-LLR-gene" genoem (Ayliffe & Lagudah, 2004). Weerstandsgene, spesifiek dié wat ras-spesifieke weerstand bewerkstellig, word meestal in geenklose in die genoom aangetref. Die gene binne so 'n geenklos is dikwels in tandem direkte herhalings gerangskik. Hierdie geenfamilies het deur middel van geenduplikasie ontstaan, wat daartoe lei dat oorkruising tussen die gene in die geenfamilies geredelik plaasvind. Ongelyke oorkruising, tesame met die duplikasie en rekombinasie van gene binne die geenfamilie dra tot 'n verandering in die getal herhalings binne 'n geenklos, sowel as die ontstaan van nuwe geenkombinasies, by. Dit dra vervolgens tot die snelle evolusie en seleksie van weerstandstipes in reaksie op veranderinge in patogeenpopulasies by. (Richter & Ronald, 2000)

(b) Avirulensiegene (avr-gene)

Avr-gene word in patogene aangetref en kodeer vir proteïene wat 'n verdedigingsreaksie in plante ontlok wanneer dit deur die ooreenstemmende *R*-gene in die gasheer herken word. Dit veroorsaak dat 'n patogeen dan nie daartoe in staat is om die spesifieke kultivar van 'n gasheerplant suksesvol te infekteer nie (Dodds *et al.*, 2007). Dit impliseer vervolgens dat *avr*-gene die gasheerreëks van 'n patogeen bepaal.

¹ Hierdie ses klasse kodeer vir proteïene met die volgende eienskappe (Agrios, 2005):

Klas I: Membraan-geassosieerde proteïene wat transkripsie reguleer en breë-spektrum weerstand bewerkstellig.

Klas II: 'n Sitoplasmiese serien/threonien proteïenkinase.

Klas III: Proteïene ryk aan ekstrasitoplasmiese leusienherhalings (LLR's) en met transmembraanankers.

Klas IV: Proteïene met ekstrasellulêre LLR's met 'n transmembraanreseptor en 'n sitoplasmiese serien/threonien kinase.

Klas V: Sitoplasmiese, membraangeassosieerde proteïene met LLR's, NBS's, en Toll/interleukin-1 reseptor (TIR)-domeine.

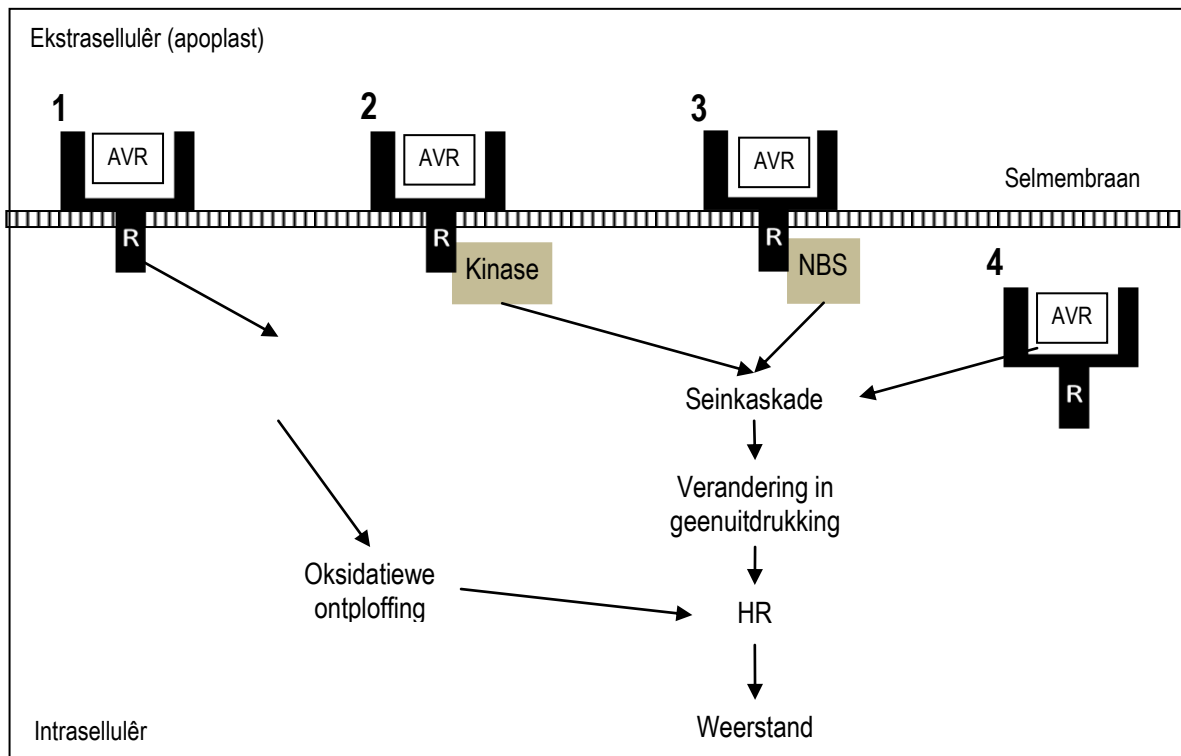
Klas VI: Proteïene soortgelyk aan dié van klas V, behalwe dat daar in hierdie geval opgerolde spiraaldomeine in plaas van TIR-domeine aangetref kan word.

Flor se voorstel dat patogene oor gene beskik wat hul virulensie beperk, is nie geredelik deur die wetenskaplike gemeenskap aanvaar nie. Besware teen hierdie teorie was onder meer dat daar nie evolusionêr vir avirulensie geselekteer kan word nie, maar wel vir virulensie, wat impliseer dat *avr*-gene eerder vir virulensie in 'n patogeen verantwoordelik is en dus verkeerdlik benoem is. Hierdie besware is egter die nek ingeslaan na die klonering van die eerste bakteriële *avr*-gene. Sedertdien is talle ander *avr*-gene uit 'n diverse versameling bakteriële sisteme gekloneer en die hipotese telkens bevestig. Die vermoë van 'n patogeen om virulent te wees ten opsigte van 'n spesifieke gasheer word dus nie deur virulensie faktore (allele) bepaal nie, maar eerder deur die afwesigheid van dominante avirulensie allele (*avr*-allele). (Gabriel, 1999)

Die proteïenprodukte van die beperkte aantal *avr*-gene wat reeds uit swamme gekloneer is blyk om divers te wees wat struktuur en funksie betref. Avirulensie proteïene (Avr-proteïene) is in sommige gevalle in die sitoplasma van die patogeen gelokaliseer. Alternatiewelik word dit deur membraanporieë uitgeskei. Hierdie membraanporieë word deur Hrp-proteïene (harpieë) gevorm wat deur harpiëgene (*hrp*-gene) gekodeer word (Agrios, 2005). In laasgenoemde instansie word die Avr-proteïene in die intersellulêre spasie (die apoplast) van plantweefsel uitgeskei en induseer sodoende 'n HR in die plant (Dodds *et al.*, 2007). Buiten dié van verklikermolekule, word daar gespekuleer dat *avr*-gene 'n funksie verrig wat verwant is aan die patogeniese leefstyl van spesifiek gedwonge patogene, aangesien dit hoofsaaklik in hierdie tipe patogene aangetref word. Daar is aanduidings dat *avr*-gene oorspronklik patogenisiteitsgene (*pth*-gene) was. Laasgenoemde word in patogene aangetref en is verantwoordelik vir die ontwikkeling van siektetoestande in die gasheer. In sommige gevalle is daar gevind dat die gekloneerde gene pleiotropies funksioneer om patogenisiteit te veroorsaak in die afwesigheid van 'n "erkende" *R*-geen in die gasheer. Dit was egter nie 'n beduidende bydrae nie. Daar is ook gevind dat sommige *avr*-gene by ander stogastiese gebeurtenisse, insluitend duplikasie, mutasie en spesifiek horisontale geenoordrag tussen verskillende rasse van 'n patogeen betrokke is. Die gene is volgens aanduidings ook by seintransduksiepadweë in die gasheerplant betrokke. (Gabriel, 1999)

(c) Biochemiese interaksie tussen R-gene en avr-gene

'n Eenvoudige model vir die werking van 'n weerstandsgeen behels dat die *avr*-geen 'n verklikkermolekule produseer wat deur die R-proteïene herken word (Fig. 2.2). Hierdie verklikkermolekule kan enige ekstrasellulêre molekule of 'n oppervlakteienskap wat deur die patogeen geproduseer word, wees. Die *R*-geen in die gasheerplant kodeer vir 'n proteïen wat optree as domein vir die herkenning van die Avr-proteïen. Hierdie domein is meestal LRR strukture. Die domein kan ekstrasellulêr of in die sitoplasma van die gasheersel geleë wees. In die eerste geval is die domein geanker aan die selmembran. Dit is moontlik dat 'n spesifieke domein meer as een *avr*-sein kan herken. Die LRR-domein is voorts verbind aan 'n intersellulêre proteïendomein wat betrokke is by 'n seintransduksiepadweg. Laasgenoemde bestaan dikwels uit proteïenkinases. Nadat herkenning tussen die *R*-geen en die *avr*-geen plaasgevind het word 'n seinkaskade geïnisieer, wat lei tot die aktivering van verskeie gasheergene. Dit veroorsaak 'n vlag aktiwiteit binne die gasheerselle: Oksidatiewe reaksies vind gevolglik plaas, selmembrane bars en fenoliese en ander toksiese verbindings word vrygestel, wat gesamentlik 'n hipersensitiewe reaksie en uiteindelik weerstand teweegbring. (Beynon, 1997; Agrios, 2005) 'n Vereenvoudigde voorstelling van vier moontlike wyses waarop weerstand teweeggebring kan word, word in Fig. 2.2 aangedui.

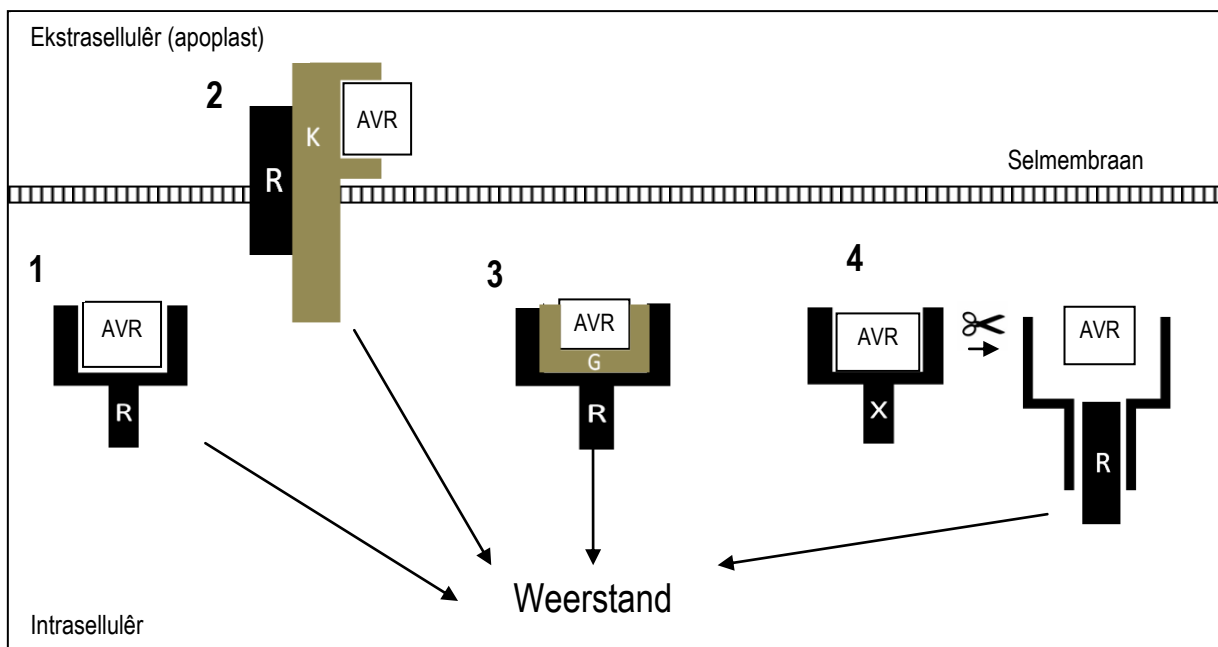


Figuur 2.2 Eenvoudige voorstelling van 4 moontlike scenarios vir weerstandsreaksie aktivering volgens die reseptor-ligand model (aangepas uit Beynon, 1997).

1. Membraangebode reseptor reageer direk met NADPH-oksidasie en veroorsaak 'n oksidatiewe ontploffing. 2. Membraangebode reseptor is verbind aan 'n proteïenkinase wat 'n seinkaskade aktiveer om sodoende 'n verandering in geenuitdrukking teweeg te bring. 3. Membraangebode reseptor is verbind aan 'n NBS. 4. Intrasellulêre reseptor. AVR = Avr-proteïene; R = R-proteïene; HR = hipersensitiewe reaksie

Bogenoemde model is 'n tipiese voorbeeld van die klassieke reseptor-ligand model. Nuwe bewyse toon egter dat weerstandsproteïene (R-proteïene) nie die Avr-proteïene direk herken nie, maar eerder die werking van die Avr-proteïene in die gasheersel. Hierdie hipotese staan bekend as die Bewaker-hipotese ("Guard hypothesis"). Dit veronderstel dat R-proteïene 'n toesighoudende rol, eerder as die herkenning van Avr-proteïene, in die sel vervul. Die Bewaker-hipotese postuleer dat R-proteïene deel uitmaak van 'n multiproteïenkompleks en dat die Avr-proteïene (wat moontlik optree as virulensie faktore) een of meer van die gasheerproteïene in die kompleks teiken. Indien die Avr-proteïene aan die gasheerproteïene bind, aktiveer laasgenoemde die R-proteïene. Die R-proteïene raak bewus van die Avr-proteïen-gasheerproteïene werking en onderdruk siekteontwikkeling. Die Bewaker-hipotese verskaf 'n aanvaarbare verduideliking van die interaksie van R-proteïene en Avr-proteïene, aangesien verskeie Avr-proteïene inderwaarheid virulensiefaktore is wat verantwoordelik is vir die ontwikkeling van siekte in die afwesigheid van 'n toepaslike R-geen. (Van der Biezen & Jones, 1998; Belkhadir *et al.*, 2004)

'n Verdere moontlikheid vir die biochemiese interaksie van R-proteïene en Avr-proteïene is die ko-reseptor model, wat voorstel dat die Avr-proteïen eers aan 'n hoë-affiniteit bindingsetel van 'n ko-reseptor, wat aan die R-proteïen gekoppel is, bind. Die interaksie van die ko-reseptor en die Avr-proteïen lei tot siekteweerstand. 'n Laaste voorstel is 'n protease-afhanklike weerstandsreaksie. Dit is gegrond op die feit dat daar voorspel word dat verskeie *avr*-gene vir proteases kodeer. Daar word voorgestel dat die Avr-proteïen aan 'n protease teiken in die sel bind, wat veroorsaak dat die teiken proteolities gekataliseer word. Die produkte van hierdie reaksie bind voorts aan 'n R-proteïen, wat weerstand tot gevolg het. (Bonas & Lahaye, 2002)



Figuur 2.3 Diagrammatiese voorstelling van 4 modelle vir die aktivering van 'n weerstandsreaksie na geen-*vir-geen* interaksies (aangepas uit Bonas & Lahaye, 2002).

1. Die klassieke reseptor-ligand model. 2. Ko-reseptor model. 3. Die Bewaker hipotese. 4. Protease-afhanklike weerstandsreaksie. AVR = Avr-proteïen; R = R-proteïen; K = ko-reseptor; G = gasheerproteïen; X = protease teiken proteïen

2.3 Die aanwending van genetiese weerstand

2.3.1 Die belangrikheid van genetiese hulpbronne

'n Suksesvolle teelprogram berus op die beskikbaarheid en effektiewe benutting van genetiese variasie. Inkorporering van 'n genetiese eienskap moet 'n bydrae lewer tot die genetiese prestasie van die teelmateriaal, sonder om afbreuk te doen aan ander

eienskappe, soos byvoorbeeld opbrengs en proteïëinhoud. Volgens Merezko (1998) het genetiese hulpbronne vir plante beide 'n direkte en 'n indirekte impak op koringteling. Die direkte impak is wanneer die hulpbron direk betrokke is by die ontwikkeling van 'n nuwe kultivar. Wanneer die hulpbron by ouermateriaal geïnkorporeer word en sodoende 'n bydrae lewer tot die genetiese agtergrond van die nageslag (en enige kultivar wat daaruit mag ontwikkel word), het die hulpbron 'n indirekte impak op koringteelt. 'n Voorbeeld hiervan is die semi-dwerg koring, "Akakomugi", wat deur 'n Italiaanse teler gebruik is om verskeie kultivars te ontwikkel (direkte impak). Een van hierdie kultivars, "Ardito", is egter later deur 'n Argentynse teler gebruik om die lentekoringkultivar "Klein 33" te ontwikkel, wat op sy beurt bygedra het tot die ontwikkeling van die winterkoring "Bezostaya 1" in Rusland. Laasgenoemde kultivar is wêreldwyd as kruisingsouer benut vanweë sy uitstaande ekologiese plastisiteit. "Akakomugi" het dus 'n indirekte impak op globale koringteelt uitgeoefen en daar word bespiegel dat hierdie impak met die ontdekking van die semidwerg gene *rht8* en *rht9*, asook die *Ppd*-geen vir fotoperiode onsensitiwiteit geassosieer kan word. Genetiese hulpbronne kan in die laaste plek ook 'n bydrae lewer tot die teoretiese kennis van planteteelt. (Merezko, 1998)

Hawkes (1985) stel 'n "impak-ketting" voor om die invloed van genetiese hulpbronne op koringteelt te beskryf: 'n soeke na nuwe genetiese bronne en 'n ondersoek na die bruikbaarheid van materiaal wat in geenbanke is en steeds in die natuur beskikbaar is; verkenning van die hulpbron; bewaring van die hulpbron (in bv. kiemplasmabanke); evaluering van die lyne na integrasie van die hulpbron; kiemplasma uitbouing; teling en proewe; en vrystelling van kultivars.

2.3.2 Bronne van genetiese variasie

Die hoofbronne van gene vir die teling van koring is intraspesifieke diversiteit binne *T. aestivum* self, ander *Triticum* spesies (bv. *T. dicoccum*), ander genera van die *Triticeae* Dum. familie (bv. *Aegilops*) en meer verlangs-verwante genera van die botaniese familie *Poaceae* Barnh. (bv. rog) (Merezko, 1998). Omdat die oorgrote meerderheid weerstandsgene teen die onderskeie tipes koringroes in gewone koring reeds geïdentifiseer en aangewend is, het die noodsaaklikheid van 'n breër genetiese basis vir weerstand algaande aan die lig gekom (McIntosh *et al.*, 1995).

Die wilde verwante spesies van koring het toenemend meer aandag ontvang as 'n addisionele bron van genetiese diversiteit, aangesien hierdie spesies aansienlik meer tyd gehad het om natuurlik te evolueer en dus oor gene teen beide biotiese en abiotiese stremming beskik (Zhang, *et al.*, 2007).

Wanneer ander genetiese hulpbronne as *T. aestivum* aangewend word, moet daar aan verskeie kriteria voldoen word vir die suksesvolle integrasie van die variasie. Doeltreffende siftingstegnieke moet beskikbaar wees om die gene op te spoor, dit moet moontlik wees om die donorspesie met koring te kruis en die teikengene moet in 'n stabiele genetiese agtergrond gefikseer word. Laastens moet die verlangde eienskappe ook fenotopies in die nuwe genetiese agtergrond uitgedruk word. (Merker, 1992) Met die ontwikkeling van molekulêre tegnieke en genetiese transformasie is dit egter nie meer essensieel dat die donorspesie tot so 'n mate fisiologies met koring moet ooreenstem dat 'n kruising moontlik is nie (Campbell *et al.*, 2002).

Die wilde verwante spesies van koring kan in primêre, sekondêre en tersiêre geenpoele verdeel word, hoofsaaklik op grond van hul genomiese samestelling. Die drie groepe verskaf 'n aanduiding van die mate van toeganklikheid van die spesie vir gebruik in koringteelprogramme, waar “primêre” die mees toeganklike en “tersiêre” die mins toeganklike geenpoele verteenwoordig. Heksaploïede landrasse, verboude sowel as wilde tetraploïede van die *turgidum* groep en diploïede voorlopers van die A- en D-genome word onder andere by die primêre geenpoel ingesluit. In die sekondêre geenpoel word diploïede, moontlike B-genoom donors van die voormalige *Aegilops Sitopsis* seksie (waaronder die volgende vyf spesies deel van vorm: *Ae. speltoides*, *Ae. longissima*, *Ae. sharonensis*, *Ae. searsii*, en *Ae. bicornis* – almal S-genoom) en poliploïede wat 'n gemeenskaplike genoom met gewone koring deel, aangetref. Spesies wat slegs homeoloë genome met koring deel, word in die tersiêre geenpoel ingedeel. (Antonov & Marais, 1996) Die roesweerstandsgene wat reeds na koring oorgedra is, is afkomstig van 'n verskeidenheid spesies, *viz.* *T. monococcum*, *T. tauschii*, *T. turgidum* en *T. timopheevii* uit die primêre geenpoel, *T. speltoides* uit die sekondêre geenpoel en *T. umbellulatum*, *T. comosum*, *Thinopyrum intermedium*, *Th. elongatum*, *Th. ponticum* en *Secale cereale* uit die tersiêre geenpoel. Daar is ook gene vanuit *T. ventricosum*, wat beide 'n primêre geenpoel genoom en 'n tersiêre geenpoel genoom besit, oorgedra (Marais *et al.*, 2003).

Die eerste weerstandsgeen wat (in 1956) vanaf 'n wilde spesie (*Ae. umbellulata*) na koring oorgedra is, is die *Lr9* geen vir weerstand teen blaarroes. Bestraling is gebruik om chromosoombreuke te induseer en sodoende translokasie van die spesiechromatien na dié van koring te bewerkstellig (Zhang *et al.*, 2007). Die translokasie is in sommige sagte rooi winterkoringkultivars in die VSA gebruik, maar nooit intensief nie (Friebe *et al.*, 1996). In Suid-Afrika is die eerste interspesie kruising in 1912 gemaak toe emmerkoring gebruik is in 'n poging om roesweerstandsgene na koring oor te dra (Pretorius *et al.*, 2007).

'n Oënskynlik natuurlike uitvloeisel van geenoordrag vanuit wilde spesies na koring is die daaropvolgende gebruik van hierdie lyne vir die ontwikkeling van nuwe weerstandbiedende kultivars. Slegs 'n klein aantal roesweerstandsgene wat uit wilde spesies geïsoleer is, is tans in kommersiële kultivars geïnkorporeer. In hul oorsig oor 24 koring-wilde spesie translokasies en die gebruik daarvan vir die bewerkstelling van roesweerstand, noem Friebe *et al.* (1996) dat slegs ses translokasies in kultivarontwikkeling aangewend is. Redes hiervoor is dat die geen in sommige gevalle deur die patogeen oorkom word voordat die kultivar vrygestel is en dat daar dikwels ongewenste eienskappe saam met die geen na koring oorgedra word, wat bekend staan as “koppelings-nadeel” (“linkage drag”). Die ongewenste kenmerke sluit lae opbrengs en swak bak- en maal-kwaliteit in. Daar is voorgestel dat daar moontlik opbrengs- en kwaliteitsverminderingsgene op dieselfde chromosoomsegment as die weerstandsgene in die wilde spesie teenwoordig is, of dat die spesiechromatien koringgene wat kodeer vir kwaliteit en opbrengs vervang het. (Dundas *et al.*, 2007) Verskeie pogings om sulke negatiewe kenmerke te verwyder is reeds suksesvol uitgevoer. Dit behels normaalweg dat die grootte van die translokasie deur middel van homeoloë paring verkort word. Die posisie waar die translokasie in die koringgenoom ingevoeg word, speel egter ook 'n rol in die kwaliteit van die lyn. So byvoorbeeld is die *Sec-1* lokus (wat verantwoordelik is vir die “taai deeg” kwaliteit) wat die *Sr31* weerstandsgeen ná oordrag vanuit rog vergesel het, geëlimineer. Paringsinduksie is gebruik om rekombinasie tussen die 1RS rogchromosoom en verwante koringchromosome te induseer. Dit het tot gevolg gehad dat die translokasie verkort is (Lukaszewski 2000). Die kwaliteit van lyne wat die *Sr26* geen dra is op soortgelyke wyse verbeter (Dundas *et al.*, 2007), terwyl die geel endosperm kwaliteit wat *Lr19* vergesel het, geëlimineer is met die induksie van

allosindetiese paring en rekombinasie tussen die translokasie en die homeoloë streke van die koringgenoom (Marais, 1992).

2.3.3 Die oordrag van wilde spesie translokasies na koring

Die suksesvolle oordrag van gene vanaf wilde spesies na koring is van verskeie faktore afhanklik, onder andere die chromosomale ligging van die teikengeen en of die wilde spesie-chromosoom genoeg sintenie met die ontvanger koringchromosoom vertoon (Zhang *et al.*, 2007). Daar kan breedweg vier benaderings om oordrag te bewerkstellig onderskei word.

(a) Bestraling

Die oordrag van die eerste wilde spesie geen wat na koring oorgedra is, *Lr9*, is op hierdie wyse bewerkstellig. Dit is vanaf die lang arm van 'n groep 6 *Ae. umbellulata* chromosoom, 6U1L, na koring oorgedra (Friebe *et al.*, 1996; Zhang, *et al.*, 2007). Bestraling word egter minder gereeld gebruik, aangesien translokasies wat nie-kompenserend en geneties ongebalanseerd is geproduseer word, wat die agronomiese waarde van die oorgedraagde geen verlaag. Dit kan ook addisionele chromosoom abnormaliteite in die koringgenoom veroorsaak, wat op sy beurt 'n negatiewe invloed op die plant se groeikrag en vrugbaarheid het (Fedak, 1999).

(b) Weefselkultuur en spontane translokasies

Chromosomale translokasies kan spontaan in die natuur en ook geredelik tydens weefselkultuur plaasvind, aangesien langtermyn kalluskulture chromosoom-onstabieliteit veroorsaak. Hierdie translokasies kan sentriese-breking-en-fusie translokasies (waar 'n hele chromosoom-arm betrokke is) wees, of die breuk kan op enige ander plek op die chromosoom plaasvind. Hierdie benadering word selde gevolg aangesien die translokasies dikwels nie-kompenserend is en die frekwensie van translokasies in die meeste gevalle laag is (Zhang *et al.*, 2007). Nietemin is daar reeds 'n aantal suksesvolle geenoordragte op hierdie wyse uitgevoer. Gars-geel-dwerg-virusweerstand is vanaf 'n groep 7 chromosoom van *Thinopyrum* (*Agropyron*)

intermedium in koring oorgedra met behulp van kalluskulture (Banks *et al.*, 1995). In gevalle waar die teikengeen op die proksimale deel van die wilde spesie-chromosoom geleë is (en rekombinasie in die algemeen onderdruk word) of waar die wilde spesie- of die koringchromosoom struktureel verander is en die sintenie sodoende versteur is, is bestraling en weefselkultuur die enigste manier om geenoordrag te bewerkstellig (Friebe *et al.*, 1996; Zhang, *et al.*, 2007).

(c) *Sentriese misverdeling en geïnduseerde homeoloë rekombinasie*

Sentriese misverdeling en geïnduseerde homeoloë rekombinasie is die mees algemeen gebruikte benaderings. Die twee ouerplante word gekruis om amfiploïede te produseer. Terugkruisings word gemaak om disomiese addisielyne te produseer. Die disomiese addisielyn kan dan met 'n gepaste monosoom gekruis word vir die daarstelling van dubbel-monosomiese substitusielyne, waarna kompenserende koring en wilde spesie Robertsoniese (sentriese-breking-en-fusie) translokasies geproduseer kan word. Gerigte homeoloë translokasies kan egter ook bewerkstellig word. Die *Ph1*-geen in koring onderdruk normaalweg homeoloë (inter-genomiese) paring en verseker sodoende dat slegs homoloë paring en disomiese oorerwing geskied (Sears, 1977). In die afwesigheid van die *Ph1* lokus kan homeoloë paring egter wel geskied. Dit word meegehelp deur die gebruik van *ph1b*-mutante (wat 'n deleisie van die *Ph1* lokus dra).

Bogenoemde benaderinge kan toegepas word indien die teikengeen in die distale streke van die chromosoom geleë is, die geensintenie gekonserveerd is en die ontvangerchromosoom nie gene dra wat vrugbaarheid beïnvloed nie. Die tegniek kan ook gebruik word om reeds oorgedraagde translokasies verder te verkort (Zhang, *et al.*, 2007). So byvoorbeeld het Marais (1992) *ph1b* en *ph2b* mutante gebruik om allosindetiese paring en rekombinasie tussen die *Lr19* translokasie en homoeoloë streke van die koringgenoom te induseer in 'n poging om die die translokasie te verkort en ongewenste kenmerke wat daarmee geassosieer is, te elimineer. Lukaszewski (2000) het ook geïnduseerde homoeoloë paring gebruik om nadelige kenmerke wat met die *Sr31* translokasie geassosieer was, te verwyder.

(d) Genetiese transformasie

'n Laaste benadering wat toenemend vir geenoordrag gebruik word is genetiese transformasie, waar die teikengeen met behulp van transgeniese tegnologie direk in die ontvangergenoom gekloneer word. Die grootste voordeel hiervan is dat vrugbaarheidsgrense oorskrei kan word. Genetiese transformasie neem beduidend minder tyd in beslag as ander metodes, mits die teikengeen geredelik geïsoleer en gekloneer kan word. Genetiese transformasie maak dit moontlik om meer as een geen tegelykertyd oor te dra. Die bevestiging van die funksie van die transgeen en die genetiese stabiliteit en oordraagbaarheid daarvan ná transformasie vereis egter 'n beduidende hoeveelheid tyd en hulpbronne en is helaas nie altyd suksesvol nie (Campbell *et al.*, 2002). Twee metodes vir transformasie is tot op hede in koring beproef – partikel bombardement (ook na verwys as biolistiese transformasie) en *Agrobacterium*-bemiddelde transformasie. Eersgenoemde is reeds gebruik om weerstand teen *Fusarium* aarskroei in broodkoring te bewerkstellig (Lapitan & Jauhar, 2006). Gedurende die afgelope dekade is transformasieprotokolle aansienlik verbeter, hoewel daar nog heelwat optimisering moet plaasvind voordat dit as 'n roetine prosedure vir die oordrag van gene na gewone koring gevestig kan word. Dit, tesame met vooropgestelde idees rakende die veiligheid van geneties-gemanipuleerde gewasse en huiwering van die publiek om hierdie gewasse te vertrou, het egter tot dusvêr die vrystelling van 'n getransformeerde broodkoringkultivar gekniehalter (Sorrells, 2007).

2.3.4 Die opsporing van wilde spesie translokasies na oordrag

(a) *In situ* hibridisasie

In situ hibridisasie is 'n gewilde en doeltreffende tegniek vir die opsporing van wilde spesie chromatien na afloop van geenoordrag. Een vorm hiervan is fluoresserende *in situ* hibridisasie (FISH). Dit behels fiksasie van mitotiese of interfase selle van die ontvangergenoom (in hierdie geval koring) op mikroskoopplaatjies en daaropvolgende hibridisasie met enkelstring DNS of RNS wat as 'n peiler dien. Die peiler is gemerk met 'n molekule wat fluoresseer wanneer dit aan UV-lig blootgestel

word. Die peiler bind aan die DNS in die area op die teikengenoom waaraan dit komplementêr is. Dit word op só 'n manier ontwerp dat dit spesifiek aan die spesiechromatien bind en sodoende kan die aan- en afwesigheid van die chromatien in die koringgenoom gevisualiseer word. (Klug & Cummings, 2003)

Genomiese *in situ* hibridisasie (GISH) is 'n modifikasie van FISH met selfs wyer toepassing. Met hierdie tegniek word die chromosome van verskillende spesies met die gebruik van verskillende fluorochrome in verskillende kleure “geverf”. In die geval waar daar twee ouerplante van verskillende spesies in die kruising teenwoordig was (bv. koring en 'n wilde spesie), word chromosomale DNS van die nageslag (die teiken DNS) op 'n mikroskoopplaatjie gefikseer. Genomiese DNS (gDNS) van een van die ouers (bv. die wilde spesie) word as gemerkte peiler gebruik, terwyl 'n oormaat ongemerkte gDNS van die ander ouer (koring) as blokker gebruik word. Die ongemerkte DNS hibridiseer aan volgordes wat komplementêr daaraan is (hoofsaaklik koringchromosome) maar bind minder gereeld met die spesiechromosome. Die gemerkte peiler DNS bind weer meer gereeld aan die spesiechromatien. Die blokker dien om die spesifisiteit van die peiler te verhoog. Wanneer die chromosome onder 'n fluoressensie mikroskoop gevisualiseer word, vertoon die teiken-DNS wat aan die peiler gebind is, anders as dié wat aan die blokker gebind is. Dit is ook moontlik om meer as een kleur peiler tegelykertyd te gebruik indien daar volgordes van meer as twee genome in die nageslag teenwoordig is. Dit word multikleur genomiese *in situ* hibridisasie (McGISH) genoem. (Raina & Rani, 2001)

GISH word in 'n wye verskeidenheid toepassings benut om die genome en chromosome van allopoliploïede spesies, spesie-hibried plante en rekombinante teellyne met spesieverhaalde gene te karakteriseer (Raina & Rani, 2001). Chen *et al.* (1998) het GISH in kombinasie met C-bande gebruik om die genomiese samestelling van *Th. intermedium* en *Th. ponticum* te kariatipeer. GISH word ook algemeen gebruik om die hoeveelheid spesiechromatien wat gedurende 'n kruising oorgedra is te monitor asook om moontlike translokasiebreekpunte op te spoor (Raina & Rani, 2001).

(b) Merker-bemiddelde seleksie (MBS)

Terwyl *in situ* hibridisasie tegnieke baie nuttig aangewend kan word om vas te stel of spesiechromatien wel oorgedra is, verskaf dit nie 'n aanduiding van die teenwoordigheid van spesifieke teikengene nie. Daar word dikwels van fenotipiese karakterisering (bv. die bestaande infeksietipe in die geval van 'n roesweerstandsgene) gebruik gemaak om vas te stel of 'n spesifieke weerstandsgene na die nageslag oorgedra is. Fenotipes word egter subjektief geëvalueer en sodanige karakterisering mag onder meer deur kompleksiteit van die evaluering self, lae herhaalbaarheid (oorerflikheid) en versluiering deur ander agtergrondsgene bemoeilik word. (Kuchel *et al.*, 2007) 'n Voorbeeld hiervan is die twee vertraagde-roes gene, *Lr34/Yr18* en *Lr46/Yr29*, wat beide met die fenotipiese merker "blaarpunt nekrose" (Ltn) geassosieer is. Vanweë hierdie feit is dit moeilik om bloot op grond van die fenotipe van die plant te bepaal of die plant oor een van die twee gene beskik (Rosewarne *et al.*, 2006). Die ontwikkeling van molekulêre merkers vir weerstandsgene bied 'n eenvoudige alternatief om die oorerwing van hierdie gene te volg en het 'n beduidende impak op alle aspekte van koringteelt veroorsaak (Gupta *et al.*, 2010).

Molekulêre merkers kan breedweg in vier kategorieë verdeel word: hibridisasie-gebaseerde merkers soos restriksie-fragment-lengte-polimorfismes (RFLP's); polimerasekettingreaksie (PKR)-gebaseerde merkers soos RAPD's, SSR's, AFLP's en volgorde-gekarakteriseerde-geamplifiseerde-streke (SCAR's); DNS mikroskryfie- en volgorde-bepaling-gebaseerde-merkers soos enkel-nukleotiedpolimorfismes (SNP's) en volgorde-gemerkte-setels (STS's); en reeks-gebaseerde tegnologie soos Diversiteits-reeks tegnologie (DArT) en enkel-kenmerk polimorfismes (SFP's) opsporing. Die fokus verskuif tans al hoe meer, soos kostes afneem, na hoë-deurvloei merkertegnologie soos SSR's en SNP's vir die vinniger ontwikkeling van nuwe merkers. (Gupta *et al.*, 1999; Collard & Mackill, 2008)

Wanneer molekulêre merkers vir 'n spesifieke toepassing oorweeg word, moet hulle aan verskeie kriteria beoordeel word, naamlik: die merkers moet robuust en polimorfies wees; die merkers moet ko-segregeer met die teikengene of -kenmerk of dit moet naby daaraan gekoppel wees; daar moet 'n doeltreffende metode om groot

populasies te sif in plek wees; en die opsporingstegniek moet hoogs herhaalbaar en ook ekonomies en gebruikersvriendelik wees (Gupta *et al.*, 1999).

MBS kan effektief aangewend word om die ontwikkeling van nuwe koringkultivars te versnel. Dit kan gebruik word om tussen verskeie gene vir dieselfde kenmerk in geenpiramiedes (sien 2.3.5) te onderskei (ook genoem “merker-bemiddelde geenstapeling”), wat veral handig is wanneer daar nie tussen hierdie gene op grond van fenotipe gediskrimineer kan word nie (Collard & Mackill, 2008). Met gebruik van die toepaslike merkers is 'n teler daartoe in staat om die aanwesigheid van resessiewe gene reeds vroeg in die teelprogram te bevestig. Dit sou normaalweg nie moontlik gewees het voor die materiaal nie suiwertelend was nie. MBS stel die teler ook in staat om vroeg in elke generasie reeds seleksies te maak. Dit is dus nie nodig om te wag totdat die plante volwasse is nie en seleksie kan ongeag die seisoene of die weersomstandighede toegepas word. Die seleksie vir kenmerke waarvoor daar slegs in sekere seisoene of geografiese gebiede geselekteer kan word (as gevolg van die aanwesigheid van 'n sekere biotiese of abiotiese stremming) strem derhalwe nie die vordering van die teelprogram nie. Sommige siftingsmetodes soos roestoetse neem baie tyd in beslag en kan deur die meer tydbesparende MBS vervang word. In sommige gevalle vereis 'n ontleding (van bv. kwaliteitseienskappe) groot hoeveelhede saad, wat nie altyd vroeg in 'n teelprogram beskikbaar is nie. MBS wat op proteïenprofile of DNS-merkers gebaseer is kan dan reeds toegepas word om voorlopige seleksies te maak. Die voordele van MBS neem toe wanneer die oorerflikheid van 'n kenmerk afneem. Vir kenmerke wat baie lae oorerflikheid toon, bereik die waarde van die merker 'n drempel wanneer QTL-deteksie ingewikkeld raak of wanneer die interaksie tussen die QTL en die omgewing die betroubaarheid van die merker beïnvloed. (William *et al.*, 2007)

Molekulêre merkers word ook gebruik vir merker-bemiddelde introgressie (MBI) of merker-bemiddelde terugkruising (MBT) waar een geen van 'n donorspesie na die genetiese agtergrond van 'n ontvanger oorgedra word deur herhaalde terugkruising na die ontvanger. In hierdie geval word die merkers gebruik om die teenwoordigheid van die teikengeen en/of die verhaling van die genoom te monitor en te versnel deur die lyne met die kleinste hoeveelheid donorchromatien te selekteer. Laasgenoemde word vermag deur van koppelingskaarte (wat met behulp van merkers opgestel is) gebruik te maak. (Hospital, 2009)

Merkerbemiddelde seleksie is 'n uitstekende voorbeeld van die suksesvolle integrasie van konvensionele telingstegnieke met meer moderne molekulêre hulpmiddels. Dit het reeds op verskeie maniere bewys dat dit 'n aanwys vir 'n teelprogram kan wees. Daar kan selfs so ver gegaan word om te sê dat MBS onontbeerlik is vir hedendaagse koringteelprogramme (Pretorius *et al.*, 2007). Koringteelprogramme wêreldwyd wend MBS vir die verbetering van 'n verskeidendheid kenmerke in koring aan. Die Australiese “National wheat molecular marker program” (NWMMP), gebruik merkers onder meer vir die verbetering van roesweerstand, weerstand teen die Russiese koringluis, voor-oes ontkieming, meelkleur en Boortoleransie, terwyl die Amerikaanse “MASwheat” teelprogram MBS onder meer inspan vir teling teen die roessiektes, *Fusarium* aarskroei en meeldou (*Blumeria graminis tritici*), asook vir proteïeninhoud en droogtebestandheid (Gupta *et al.*, 2010). Twee van die mees omvattende databasisse wat spesifiek op koringnavorsing gemik is, “Gramene” (<http://www.gramene.org/>) en “Graingenes 2.0” (<http://wheat.pw.usda.gov/>), verskaf nuttige inligting aangaande onder meer molekulêre merkers vir spesifieke gene, fisiese- volgorde- en QTL-kaarte, nukleotiedvolgordes van onder andere gekarteerde uitgedrukte-volgorde-etikette (EST's), asook verwante literatuur.

Faktore wat die roetine gebruik van molekulêre merkers in 'n teelprogram strem is helaas nie probleme met die tegnologie *per se* nie, maar eerder die koste verbonde aan die oprigting van die nodige infrastruktuur en die gebruik van die merkers, die beskikbaarheid van toepaslike merkers vir die kenmerke wat ondersoek word en, in sommige gevalle, die onwilligheid van navorsers om data en kiemplasma algemeen beskikbaar te maak (William *et al.*, 2007).

2.3.5 Die daarstelling van langdurige weerstand teen roessiektes

'n Koringkultivar moet geneties en fenotopies eenvormig wees, 'n hoë opbrengs lewer en aan kwaliteitsvereistes wat deur die bedryf daar gestel word, voldoen. Eenvormigheid en die feit dat bestaande kultivars dikwels oor 'n enkele bron van weerstand beskik het egter tot gevolg dat sterk seleksiedruk op die roesswam uitgeoefen word, wat daartoe lei dat die patoëen die betrokke bron van weerstand oorkom in 'n tipiese “boom-bust” siklus (Burdon & Thrall, 2008). Kultivars wat

weerstandbiedend teen die heersende roeras is verseker die produsent van laer insetkoste omdat chemiese bespuiting nie nodig is nie en word derhalwe oor groot geografiese areas geplant (“boom”). In reaksie daarop neem seleksiedruk op die patogeen toe en in gevalle waar ’n enkele weerstandsgeen gebruik is, word daar slegs ’n enkele mutasie by die ooreenstemmende *avr*-lokus vereis vir die patogeen om die weerstand te oorkom (“bust”). In ideale omstandighede lei dit daartoe dat epidemies meer gereedelik ontstaan. (Pink, 2002) Hierdie situasie waar die evolusie van nuwe rasse gerig word deur die manipulasie van weerstandsgene is alreeds in 1961 deur die term “man-guided evolution” beskryf (Johnson, 1961).

Bogenoemde waarneming is ook een van die groot besware teen geneties-gemanipuleerde gewasse, waar daar gevrees word dat intensiewe aanplanting van ’n gewas wat oor ’n transgeen beskik, die kans verhoog dat seleksiedruk op die patogeen uitgeoefen sal word. Een oplossing wat hiervoor aangebied word, is die aanplanting van sogenaamde “bufferstroke” (“barrier crops”). Hierdie is stroke van dieselfde gewas, maar wat nie geneties gemanipuleer is nie, wat rondom die transgeen-bevattende kultivar aangeplant word. Die patogeen behoort dan hierdie stroke aan eerste te val, wat die seleksiedruk daarop verminder. (Eastham & Sweet, 2002)

Die mees voor die hand liggende oplossing vir die kwesbaarheid van koringkultivars met enkelgeenweerstand is om kultivars te teel wat geneties minder uniform is en dus soortgelyk is aan die landrasse van ouds. Dit sal ontwrigtende (“destabilizing”) seleksie in die patogeenpopulasie afdwing, wat die seleksie teen spesifieke *avr*-allele sal strem. Pink (2002) stel twee strategieë voor om dit te bewerkstellig: multilyne en mengsels en geenpiramiedes.

(a) Multilyne en mengsels

Multilyne is kultivars wat uit ’n mengsel genotipes bestaan wat agronomies dieselfde is, maar slegs op grond van ’n enkele weerstandsgeen (of ’n gedefinieerde groep gene) van mekaar verskil. Hierdie genotipes word isolyne of NIL’s (nabye isogeniese lyne) genoem. Die NIL’s word ontwikkel deur ’n reeks terugkruisings te maak waar die F₁-generasie herhaaldelik na die herhalende ouer teruggekruis word. Die

herhalende oer bevat nie die teikengeen nie (Acquaah, 2007). In teenstelling hiermee behels mengsels die gelyktydige gebruik van 'n verskeidenheid kultivars wat fenotopies verskil en terselfdertyd van mekaar verskil op grond van die weerstand wat hulle bied (Pink, 2002).

Daar is oënskynlik drie wyses waarop multilyne en mengsels siektebeheer kan bewerkstellig. Dit verlaag in die eerste plek die relatiewe digtheid waarteen vatbare plante staan. Slegs 'n breukdeel van 'n gesaaide land sal dus vatbaar vir 'n ras van 'n siekte wees. Weerstandbiedende plante bied ook 'n skans teen infeksie, aangesien hierdie plante die spore van onverenigbare rasse "onderskep". Laastens veroorsaak infeksie deur spore van onverenigbare rasse op weerstandbiedende plante dat induseerbare weerstandsmeganismes geaktiveer word, wat daartoe lei dat hierdie plante "geïmmuniseer" word teen latere infeksies deur verenigbare rasse. Die doeltreffendheid van mengsels en multilyne word deur die omgewingstoestande, die samestelling en die uitleg van die multilyn of mengsel, die eienskappe van die patogeen (bv. verspreiding, graad van variasie, generasietempo, ens.) en die relatiewe belangrikheid van eksterne inokulum beïnvloed. (Garrett & Mundt, 1999; Pink, 2002)

Daar is beduidende getuienis dat mengsels siekteverspreiding en epidemievorming strem. Resultate van tussen 13% en 97% vermindering van koring streeproes relatief tot die komponente van die mengsel is aangeteken (Smithson & Lenne, 1996). Mundt (2002) stel voor dat die groot variasie in resultate aan verskeie faktore toegereken kan word, waaronder die samestelling van die genotipe-mengsel, die intensiteit van die epidemie en die skaal van aanplanting asook geografiese area waarop die genotipe-mengsels aangeplant word. Daar behoort deeglik na die versameling avr-gene wat in die patogeenpopulasie teenwoordig is, asook na die beskikbare *R*-gene, opgelet te word. 'n Matriks van die gasheer- en patogeengenotipes moet vervolgens ondersoek word wanneer mengsels saamgestel word. Mengsels is verder ook meer effektief wanneer dit op groot skaal aangewend word in vergelyking met eksperimentele persele, wat dus ook resultate sal beïnvloed.

In die 1998/1999 seisoen was 6.1% (227 000 ha) van die koringaanplantings in Kansas, VSA, en 12.7% in die staat Washington, mengsels. In hierdie twee gevalle was produsente positief oor die gebruik daarvan (Garrett & Mundt, 1999), maar die

gebruik van mengsels is oor die algemeen egter nie gewild onder produsente nie. Pink (2002) voer aan dat die hoof rede waarom mengsels nie meer geredelik aangewend word nie, juis dit is wat dit geskik maak vir siektebestryding – die heterogeniteit van die fenotipe. Praktiese probleme van mengsels vir produsente is die bepaling van fisiologiese oesrypheid en -kwaliteit en vir bemarkers die proses van saadproduksie. Hierdie probleme word uitgeskakel deur die gebruik van multilyne, maar in hierdie geval neem die ontwikkeling van NIL's aansienlike tyd in beslag. NIL's is ook minder plooibaar om op veranderinge in die mark of veranderinge in die frekwensie van virulensieallele in die patogeenpopulasie te reageer (Pink, 2002). Hoewel multilyne dus teoreties aanvaarbare alternatiewe is, is dit nie prakties haalbaar nie.

(b) Geenpiramiedes

Die ontwikkeling van 'n geenpiramide (ook genoem “geenstapeling”) is die gelyktydige gebruik van verskeie *R*-gene in dieselfde kultivar. So 'n kultivar sal meer duursame weerstand teen die patogeen(e) bied, aangesien mutasies by verskeie loci in die patogeen vereis word voordat die kultivar totaal vatbaar sal wees vir infeksie (Pink, 2002).

Die keuse van die gene in 'n piramide is 'n deurslaggewende faktor wat die sukses van die kultivar bepaal. Telers het oorspronklik gene wat reeds deur die patogeen oorkom is, gebruik, aangesien die virulensie/avirulensie profiele van die gene die teler toegelaat het om tussen gene te kan onderskei. Met die ontwikkeling van MBS kan telers nou onoorkomde weerstandsgene gebruik, wat die volhoubaarheid van die piramide versterk. Indien enige van die gene in die piramide egter as 'n enkelgeen in 'n ander kultivar gebruik word, word die kans dat die patogeen virulensie teen die geen sal ontwikkel, verhoog, wat dus die piramide meer kwesbaar maak. Die aantal weerstandsgene in 'n piramide is nie direk proporsioneel aan, of 'n aanduiding van, hoe lank dit doeltreffend sal wees nie (Pink, 2002).

Duveiller *et al.* (2007), stel voor dat verskeie nie-hoofgene, wat vir ras nie-spesifieke weerstand verantwoordelik is, vir geenstapeling gebruik word. Dit behoort te lei tot goeie, bruikbare kultivars wat vir 'n langer tydperk teen infeksie bestand sal wees.

Indien beide hoofgene en nie-hoofgene egter in dieselfde lyn geïnkorporeer word, word die duursaamheid daarvan teoreties verder verhoog aangesien beide die volledige weerstand van die hoofgene en die duursaamheid van die nie-hoofgene benut word. Daar word verwag dat indien die hoofgene in 'n tipiese geen-vir-geen interaksie deur die patogeen oorkom word, die nie-hoofgene steeds effektief sal bly, hoewel die weerstand nie volledig sal wees nie. Dit verleng egter die leeftyd van 'n kultivar en bied meer tyd om nuwe kultivars te ontwikkel. (Castro *et al.*, 2003) Die nie-hoofgene weerstand sal moontlik steeds die aantal bespuitings met swamdoders in 'n seisoen verminder, wat op sy beurt laer insetkoste tot gevolg het (Paul, 2009).

Geenpiramiedes kan deur middel van herhaalde terugkruisings of plant transformasie ontwikkel word. Dit blyk dat geenpiramiedes die aangewese platform vir die gebruik van transgene in koring is, hoewel daar hindernisse rakende die praktiese uitvoerbaarheid daarvan is (Pink, 2002). Dit sluit probleme met die kopiegetal van die geen wat oorgedra word, sowel as die opsporing van die geen na oordrag, in (Pink & Puddephat, 1999).

Geenstapelingsstudies word algemeen in die literatuur aangetref. So byvoorbeeld het Pretorius *et al.* (1996) nege blaarroesweerstandsgene in die plaaslike kultivars "Palmiet" en "Karee" geïnkorporeer, terwyl Liu *et al.* (2000) drie geenkombinasies vir meeldouweerstand in die kultivar "Yang047" geïnkorporeer het. Die lyne van beide hierdie studies kan voorts ook in kiemplasma-ontwikkeling gebruik word.

2.4 Die ontwikkeling van ingeteelde lyne

Drie fases kan onderskei word tydens die ontwikkeling van nuwe teelmateriaal: die maak van beplande kruisings (normaalweg enkel-, trippel-, dubbel- of terugkruisings); die ontwikkeling van ingeteelde lyne; en nageslagstoetsing van die ingeteelde lyne. Daar is verskeie metodes om ingeteelde lyne in selfbestuivende gewasse te ontwikkel, naamlik stamboomseleksie, bulkopulasieseleksie, enkelpitnageslagseleksie (EPN) en die verdubbelde haploïede metode (Poehlman, 1987). Vir die doeleindes van hierdie studie word daar slegs op verdubbelde haploïede gefokus.

2.4.1 Verdubbelde haploïede (VH)

Haploïede plante kom teen 'n lae frekwensie in die natuur voor. Haploïede kan in teelprogramme gebruik word om volledig homosigotiese, diploïede plante (VH) in 'n enkele generasie te produseer, in vergelyking met die ses generasies wat dit met konvensionele inteling sou neem, wat die ontwikkeling en vrystelling van nuwe kultivars uiteindelik versnel. (Thomas *et al.*, 2003) Nog 'n voordeel van VH is dat resessiewe gene in haploïede plante uitgedruk word. Die kans om 'n spesifieke resessiewe genotipe in die haploïede nageslag waar te neem is $\frac{1}{2}^x$, waar x die hoeveelheid heterosigotiese loci verteenwoordig. Die kans om dieselfde genotipe waar te neem wanneer konvensionele intelingsmetodes gebruik word, is $\frac{1}{4}^x$. Seleksie vir kenmerke wat deur resessiewe gene beheer word is moontlik, aangesien uitdrukking van die gene nie deur dominante gene verskuil word nie. (Lesch, 1997) Die homosigositeit wat verkry word wanneer 'n VH sisteem gebruik word, verhoog die doeltreffendheid van seleksie vir beide kwalitatiewe en kwantitatiewe eienskappe. Dit verlaag ook die variasie tussen individuele plante van dieselfde populasie (Hu, 1997).

Die tekortkominge van VH is dat slegs een siklus van rekombinasie toegelaat word voordat die gene gefikseer word. Boonop word 'n lukrake versameling gamete gefikseer en genetiese dwaling ("drift") kan veroorsaak dat slegs 'n klein proporsie lyne aan die verlangde kriteria voldoen (Hu, 1997). Uit 'n praktiese oogpunt is die VH tegnieke dikwels duur en vereis dit tegniese vaardigheid van die navorser. Die groen plant regenerasiefrekwensie is ook dikwels laag en albino plante is volop in die nageslag, veral met gebruik van die helmknopkultuur-tegniek. Daarbenewens verleen nie alle genotipes hul tot *in vitro* vermeerdering nie. Indien die moontlike tekortkominge egter effektief aangespreek en/of bestuur word, kan die VH metode as 'n integrale komponent in kultivarontwikkeling benut word, soos tans die geval by die welbekende Suid-Afrikaanse saadmaatskappy, Sensako, se koringteelprogramme.

Die proses om haploïede *in vitro* te produseer kan in die algemeen in drie fases verdeel word: (1) die induksie van mikrospeen-verhaalde embrios of kallusse; (2a) plant regenerasie vanaf embrios (embriogenese) of (2b) die inisiasie en ontwikkeling van stingels en wortels (organogenese); en (3) chromosoomverdubbeling van geregenereerde plante, indien nodig (Kim & Baenziger, 2005). Daar is verskeie metodes wat vir die *in vitro* ontwikkeling van VH aangewend kan word: gino- en

androgenese, waar haploïede plante van stuifmeelkorrels of onbevugte eierselle ontwikkel word; genoom-eliminasië, waar 'n onverwante spesie as stuifmeeldonor gebruik word; semigamie, 'n abnormale bevrugtingsproses waar die manlike gameet die eiersel bevrug, maar nie daarmee saamsmelt nie; chemiese behandeling; met behulp van fisiese agente soos bestraling; en deur die toediening van hoë of lae temperatuurskokke (Taji *et al.*, 2002). Daar sal voorts aan metodes wat reeds suksesvol in koring aangewend is aandag geskenk word.

(a) Helmknopkulture en mikrospoor-embriogenese (androgenese)

Androgenese berus op die beginsel dat die normale ontwikkeling van die manlike gametofiet gewysig word om sporofities te word, wat, in die aanwesigheid van toepaslike groeimedium, tot die ontwikkeling van kallusse en embrios lei. Die haploïede chromosoomkompliment van die plante wat hieruit geregenereer word moet daarna verdubbel word om homosigotiese, diploïede plante te produseer. Vir hierdie tegniek word helmknoppe van die koringplant op regenerasiemedium uitgeplaat, terwyl stuifmeel (mikrospore) in vloeibare suspensie gekweek kan word. Tydens regenerasie kan die kulture deur 'n kallusfase gaan (organogenese) of direk in embrios ontwikkel (embriogenese). Laasgenoemde word verkies in gevalle waar daar op plant-verbetering gefokus word, aangesien elke plant ("regenerant") vanaf 'n enkele mikrospoorseel afkomstig is. Indien daar van *in vitro* seleksie gebruik gemaak gaan word, word organogenese verkies omdat 'n kallusfase normaalweg met gametoklonale variasie geassosieer word (Hu, 1997).

Die grootste voordeel van androgenese is dat dit die potensiaal het om meer as 'n duisend haploïede plante per helmknop te produseer in vergelyking met ander metodes wat tot een haploïed per blommetjie beperk word (Kim & Baenziger, 2005). Die eerste kultivar wat sy oorsprong in helmknopkulture gehad het, was die Chinese "Jinghua No. 1", wat in 1986 vrygestel is. Die suksesvolle ontwikkeling van VH vanaf helmknoppe en stuifmeel is egter van 'n groot verskeidenheid veranderlikes afhanklik: genotipe, omgewingstoestand en die fisiologiese status van die donorplante, voorafbehandeling van die donorplante, die chemiese samestelling en gebruik van groeireguleerders in die groeimedium, inkubasiestoestand en laastens die lengte van die induksie. Sekere aspekte rakende die tegniek, te wete die

kompleksiteit daarvan, genotipe-afhanklikheid, albinisme in die nageslag en die lae frekwensie van kallusse, embryos en groen plante, behoort aangespreek te word voordat androgenese as 'n roetine tegniek in teelprogramme aangewend word. (Pauk *et al.*, 2004; Kim & Baenziger, 2005)

(b) Onbevrugte eierselkulture (ginogenese)

Vir die kweek van onbevrugte eierselle *in vitro* word 'n soortgelyke prosedure as dié van androgenese gevolg. Dit is nie 'n algemeen gebruikte tegniek nie, hoofsaaklik vanweë die lae regenerasie van haploïede. Die prosedure is reeds suksesvol in koring aangewend, maar die protokol sal heelwat verfyn moet word (Niroula & Bimb, 2009). Daar word egter meer aandag aan die verbetering van die protokolle vir androgenese geskenk, aangesien die hoeveelheid eierselle in 'n koringplant aansienlik minder is as die hoeveelheid helmknoppe en die kweek van helmknoppe dus meer potensiaal vir die ontwikkeling van 'n groot haploïede populasie het (Hu, 1997).

(c) Wye kruisings: die Hordeum bulbosum chromosoom-eliminasië tegniek

Die *bulbosum* tegniek is oorspronklik vir gars (*Hordeum vulgare*) ontwikkel en is later ook vir koring aangepas. Hierdie tegniek behels dat die teikenplant (koring) met 'n geneties verwyderde spesie van dieselfde genus, in hierdie geval *Hordeum bulbosum*, bestuif word. Na kruising vind saadontwikkeling vir ongeveer 10-14 dae plaas, waarna die embryo gered en verder *in vitro* gekweek moet word. Tydens die ontwikkeling van die hibried-sigoot word die *bulbosum* chromosome geëlimineer en 'n haploïede koringembryo word verhaal. Beide diploïede en tetraploïede *bulbosum* kan gebruik word, hoewel meer sukses met laasgenoemde behaal is (Hu, 1997).

Die ontwikkeling van die embryos en die sukses van die tegniek berus op verskeie faktore, waaronder die aanvoelbare pre- en post-bestuiwing temperatuur, die tydsberekening van kruisings en embrioredding, die regenerasiemedium, die korrekte toediening van groeireguleerders na bestuiwing en die genotipe van die koringplante (Lesch, 1997; Devaux & Pickering, 2005). Die kruisbaarheid van koring met *Hordeum bulbosum* word geneties beheer en word beperk tot genotipes wat homosigoties

resessief is vir die koring kruisbaarheidsgene *Kr1* en *Kr2* (wat ook vir die kruisbaarheid met rog verantwoordelik is) wat op chromosome 5A en 5B onderskeidelik geleë is. Hoewel die *bulbosum* tegniek gereeld suksesvol in garsteelprogramme aangewend word, is die sukses daarvan in koring egter beperk. (Niroula & Bimb, 2009)

(d) *Wye kruisings: mielie (Zea mays) x koring kruisings*

Hierdie tegniek berus op dieselfde beginsel as die *bulbosum* tegniek, met die verskil dat mieliestuiwmeel gebruik word. Koringare word ontman en met mieliestuiwmeel bestuif. Sitokinien word toegedien om saadontwikkeling te fasiliteer. Die ontwikkelende hibried sigoot bevat 21 koring- en 10 mieliechromosome. Die sigoot is egter kariotipies onstabiel en tydens die daaropvolgende seldelings word die mieliechromosome geëlimineer, moontlik omdat die sentromere nie aan die spindels heg nie en dus nie na die selpole getrek word nie. 'n Embrio met 'n haploïede koringchromosoomkompliment word verhaal. Embrios word na 15-21 dae gered, waarna dit op regenerasiemedium vir *in vitro* regenerasie geplaas word. Haploïede plantjies word met kolgisien behandel om verdubbeling van die chromosoomgetal te induseer. (Niroula & Bimb, 2009)

Die chromosoom-eliminasië tegnieke word algemeen vir die produksie van haploïede in monokotiele spesies aangewend. Voordele hieraan verbonde is dat dit minder tyd in beslag neem en dus meer doeltreffendheid as ander tegnieke is. Daar word ook meer genetiese stabiliteit in die nageslag waargeneem, hoewel navorsing rakende hierdie aspek beperk is. Studies het getoon dat die mielie-tegniek 3-4 maal meer effektief as die helmknopkultuur-tegniek is (Niroula & Bimb, 2009). Dit word toegeskryf aan groter getalle embrios wat ontwikkel en ontkiem, asook die afwesigheid van albinisme in die nageslag. Albinisme is veral by helmknopkulture 'n beperkende faktor. Hoewel beide die koring- en mieliegenotipes 'n beduidende invloed op die sukses van die mielie-tegniek het, is dit in 'n mindere mate daarvan afhanklik as wat helmknopkultuur- en die *bulbosum* metode is. (Niroula & Bimb, 2009)

Die mielie-tegniek is oorspronklik deur Laurie en Bennet (1988) ontwikkel. Verskeie pogings is intussen aangewend om die protokol te verfyn. Fokusareas was die kruisingstegniek, groeireguleerder-toediening en die samestelling van die weefselkultuurmedium (Verma *et al.*, 1999). Die protokol wat hier gebruik word, is ontwikkel deur Pienaar *et al.* (1997) met die oog op die produksie van VH in Suid-Afrika.

2.4.2 Vergelyking tussen VH en ander metodes vir die ontwikkeling van ingeteelde lyne

Benewens die voor die hand liggende verskille tussen die VH tegnieke en ander metodes ten opsigte van tyd, infrastruktuur benodig, koste en kompleksiteit, moet daar ook aandag geskenk word aan agronomiese verskille tussen populasies wat op hierdie manier ontwikkel is.

Ma *et al.* (1999) het koringlyne wat met behulp van helmknopkulture (HK), mieliebestuwing (MB) en EPN ontwikkel is, met mekaar vergelyk en daar was nie beduidende verskille tussen die lyne wat met verskillende metodes ontwikkel is nie. MB lyne het gemiddeld dieselfde as EPN lyne presteer ten opsigte van graan opbrengs, 1000-korrelmassa (DKM), proteïënhoud, toetsgewig en datum van aarvorming. Daarteenoor het die HK lyne gemiddeld swakker teenoor EPN lyne gevaar. Wanneer die beste vyf lyne uit elk van die populasies met mekaar vergelyk is, was daar egter geen beduidende verskille tussen die metodes nie, buiten dat die proteïënhoud van die MB populasie hoër as die ander twee populasies was. Die MB populasie het ook vroeër in die aar gekom. Guzy-Wróbelska & Szarejko (2003) het ook bevind dat lyne wat met MB- en HK metodes ontwikkel is agronomies en opbrengsgewys nie beduidend van mekaar verskil nie. Beide MB- en HK lyne het hoë genetiese integriteit getoon (en dus lae gametoklonale variasie) en ook nie in hierdie verband van mekaar verskil nie. Beide VH populasies het 'n lukrake monster van die ouerlike gamete voorgestel en beide die tegnieke kan dus suksesvol aangewend word om VH te produseer.

Inagaki *et al.* (1998) het aangetoon dat daar geen beduidende verskil in planthoogte en graanopbrengs tussen MB-, EPN- en stamboomseleksie-populasies waar die

ouers genealogies aan mekaar verwant is nie. Waar die ouers egter genealogies en morfologies van mekaar verskil het, was die opbrengs in die MB populasie laer as in die stamboomseleksie-populasie.

Alles in ag genome, kan daar afgelei word dat VH lyne agonomies min, indien enigsins, verskil van ingeteelde lyne wat op ander metodes ontwikkel is en dat, indien 'n groot genoeg VH populasie ontwikkel kan word om toe te laat vir voldoende variasie, hierdie tipe populasie ekonomies die beste proposisie vir vinnige(r) kultivarontwikkeling is. Daar is wel getuigenis dat die verskillende VH tegnieke ten opsigte van agnomiese prestasie in die populasies van mekaar verskil. Vir die doeleindes van hierdie studie gaan die MB tegniek gebruik word, hoofsaaklik omdat die protokol voorheen in die laboratorium gebruik is, met die bykomende voordeel dat die verhaalde populasies normaalweg hoër proteïeninhoud toon.

2.5 Weerstandsgentranslokasies wat in hierdie studie gebruik is

Vir die doel van hierdie geenstapeling-projek is drie hoofgene vir vertikale weerstand (*Lr19* vir blaarroes, die *Sr31*-kompleks vir stamroes en *Lr54/Yr37* vir streeproes) gebruik. In die genetiese agtergrond waarin hierdie translokasies beskikbaar is, is ook addisionele gene, *viz.* *Lr24/Sr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr36* en *Sr2* teenwoordig.

2.5.1 *Lr19*

Lr19 (ook die “T4-translokasie” genoem) is oorspronklik vanaf *Thinopyrum ponticum* na koring oorgedra (Sharma & Knott, 1966). McIntosh *et al.* (1977) het 'n stamroesweerstandsgen, *Sr25*, wat aan *Lr19* gekoppel is, in die kultivar “Agatha” geïdentifiseer. Saam met hierdie twee gene is daar egter geen(e) wat vir geel endosperm kodeer oorgedra, wat die bruikbaarheid van *Lr19* in broodkoringteelprogramme beperk het, hoewel dit voordelig was vir die kwaliteit van semolina- en pastaprojekte (Gennaro *et al.*, 2009). Knott het later twee wit endosperm mutante ontwikkel. Een hiervan, “Agatha-235” het die stamroesweerstandsgen in die proses verloor. Die ander, “Agatha-28” het *Sr25*

behou en is teruggekruis na Australiese kiemplasma. Dit is ook in CIMMYT teelprogramme gebruik (Liu *et al.*, 2010).

Die translokasielyn “Indis” is deur Pienaar in die B_2F_3 nageslag van die kruising Inia 66*3/*Th. distichum* geselekteer (Marais *et al.*, 1988). Die getranslokeerde segment in “Indis” was tot ’n groot mate homoeoloog aan die T4-translokasie, aangesien beide translokasies die *Lr19*-, *Sr25*-, *Sd1*- (segregasie distorsie), *Wsp-D1*- (wateroplosbare proteïen), *Y*- (geel endosperm) loci en nul-allele vir *Ep-D1* en α -*Amy-D2* bevat het. Prins *et al.* (1996) het ’n fisiese kaart van die translokasie met behulp van RFLP-merkers opgestel en bevind dat dit van T4 afkomstig is en nie van *Th. distichum* nie. Die translokasie neem ’n groot deel van die lang arm van chromosoom 7D van koring in beslag.

Die *Lr19* translokasie paar nie geredelik met die homoeoloë chromosoomarm (7DL) tydens meiose nie en word as ’n enkele, groot koppelingsblok oorgedra wat pogings om die translokasie te verkort, bemoeilik. Marais (1992) het die *ph1b* en *ph2b* mutante van “Chinese Spring” (“CS”) gebruik om allosindetiese paring en rekombinasie tussen die translokasie en die homoeolë streke van die koringgenoom te induseer. Slegs een wit endosperm rekombinant (*Lr19-149*) en een gedeeltelik wit rekombinant (*Lr19-42*) wat as ware allosindetiese rekombinante bevestig is, kon uit die nageslag verhaal word. In die proses is die translokasie na chromosoomarm 7BL oorgedra. Die *Lr19-149* rekombinant het *Sd1* en ook *Sr25* tydens rekombinasie verloor en toon gereeld self-eliminasië in heterosigote as gevolg van die aanwesigheid van ’n tweede segregasie distorsie geen, *Sd2*. In sekere genetiese agtergronde toon *Lr19-149-299* (die kortste translokasie) egter voorkeuroordrag. Dit blyk dat die oordrag van die translokasie deur responsie-poligene in die koring se genetiese agtergrond bepaal word. (Marais *et al.*, 2001)

Lr19 bied goeie weerstand teen blaarroes: ’n infeksietipe van 0 tot ; en soms 1⁺ of 2 op die 0 tot 4 infeksietipeskaal (McIntosh *et al.*, 1995; Le Maitre, 2010). Virulensie teen die geen is in Mexiko, Rusland, die Oekraïne en Indië aangeteken (Gennaro *et al.*, 2009). Daar is egter tot en met die 2008/2009 seisoen geen aanduiding dat dit deur die Suid-Afrikaanse blaarroesrasse oorkom is nie. ’n Molekulêre merker – STSLr19₁₃₀ – word tans gebruik om *Lr19* in populasies op te spoor. Die merker is vanaf ’n AFLP-fragment na ’n dominante STS omgeskakel (Prins *et al.*, 2001). ’n

Weerstandsgeneanaloo (RGA) wat nou aan *Lr19* gekoppel is, is onlangs deur Gennaro *et al.* (2009) met behulp van NBS-profielsamestelling geïdentifiseer. Die afgeleide aminosuurvolgorde van hierdie kandidaatgeen toon die kenmerkende domeine van NBS-LLR proteïene (Klas V) wat normaalweg met plantweerstandsgene geassosieer word. Indien die kandidaatgeen wel *Lr19* is, hou dit verrykende implikasies vir onder andere die ontwikkeling van 'n meer spesifieke kodominante merker in.

2.5.2 *Sr31*-kompleks

Die *Sr31*-kompleks is reeds in die sewentiger jare vanaf die kort arm van chromosoom 1R van rog (*Secale cereale*) na die lang arm van chromosoom 1B van koring oorgedra. Dit staan derhalwe ook as die 1RS.1BL-translokasie bekend. (McIntosh *et al.*, 1995) Die *Sr31*-kompleks bestaan uit roesweerstandsgene *Sr31*, *Lr26* en *Yr9*, asook 'n weerstandsgen vir meeldou, *Pm8*. Die Russiese koringluisweerstandsgen *Dn7* word ook in sommige lyne met *Sr31* geassosieer (Friebe *et al.*, 1996). Die oorspronklike 1RS.1BL-translokasie dra 'n lokus (*Sec-1*) vir rog stoorproteïene (sekaliengene) wat vir taai deeg verantwoordelik is. Terselfdertyd het die translokasie een van die drie kort arms van die groep 1 chromosome van koring verplaas en in die proses is verskeie loci wat vir die glutienfraksie van koring kodeer, verloor. Dit het 'n negatiewe implikasie vir die gebruik van die translokasie in teelprogramme, aangesien dit 'n laer hoeveelheid glutien tot gevolg het. (Lukaszewski, 2000)

Sr31 was tot onlangs 'n baie gewilde weerstandsgen wat duursame weerstand teen stamroes verleen het (Le Maitre, 2010). Dit het die bykomende voordeel dat dit met verhoogde opbrengs geassosieer word (Lukaszewski, 2000). Die geen is regoor die wêreld aangewend en is verneem via CIMMYT kiemplasma versprei (McIntosh *et al.*, 1995). In Australië en Suid-Afrika, waar probleme met die bak- en maal-kwaliteit van kultivars wat *Sr31* bevat ondervind is, is die gebruik van hierdie geen egter ontmoedig (McIntosh *et al.*, 1995; Pretorius *et al.*, 2007). Pretorius *et al.* (2008) het 67 Suid-Afrikaanse kultivars en lyne met stamroesrasse van die VSA en Oos-Afrika getoets en gevind dat slegs sewe daarvan positief toets vir die aanwesigheid van

Sr31. Met die uitbraak van Ug99 is *Sr31* deur die stamroespatogeen oorkom, wat wêreldwyd tot grootskaalse paniek gelei het (Pretorius *et al.*, 2000).

Die translokasie wat in hierdie geval gebruik gaan word, is 'n verkorte weergawe van die oorspronklike translokasie wat in 'n "Pavon 76" agtergrond beskikbaar is. Lukaszewski (2000) het geïnduseerde homoeoloë paring gebruik om chromosome (rekombinante chromosome MA1 en MA2) te produseer wat sitologies soos normale 1RS arms voorkom, maar elk oor twee interkalêre segmente van 1BS beskik: een wat die glutenproteïen-loci herwin en een wat die *Sec-1*-lokus verwyder. Die translokasie wat hier gebruik is, staan ook bekend as die "1RS_{38 9}.1BL translokasie". "Pavon 76" beskik ook oor *Lr46* (Singh *et al.*, 1998). Daar is egter nie 'n geskikte molekulêre merker beskikbaar om vir die aanwesigheid van hierdie geen in populasies te selekteer nie. *Sr31* is oorspronklik geselekteer vanweë die "korog-agtige" weerstand wat dit aan plante verleen het. Dit toon 'n 1⁺ tot 2 infeksietipe op die 0 tot 4 infeksietipeskaal (McIntosh *et al.*, 1995). 'n RFLP-peiler, iag95, wat distaal van die weerstandsgene op die chromosoomarm geleë is, is na 'n kodominante STS-merker omgeskakel vir die roetine gebruik in laboratoriums om *Sr31* in populasies op te spoor (Mago *et al.*, 2002).

2.5.3 *Lr54/Yr37*

Die *Lr54/Yr37* translokasie is vanaf *Aegilops kotschy* na chromosoom 2DL van koring oorgedra: 'n disomiese addisielyn (8078) wat weerstandbiedend teen Wes-Kanadese blaarroesrasse is, is van die B₃F₂ in die kruising *Ae. Kotschy*/3/CS geselekteer. Die lyn is met nege Suid-Afrikaanse blaarroesrasse, ses streeproesrasse (twee van Suid-Afrika en vier van Australië) getoets en infeksietipes van 0 tot ;1 (blaarroes) en ;;^c tot 1 (streeproes) is op die 0 tot 4 infeksietipeskaal waargeneem (Marais *et al.*, 2003). Die lyn is voorts met "CS" monosome vir chromosoom 2 (CSM2A, CSM2B & CSM2D) gekruis. Nageslag wat weerstandbiedend teen blaarroes (UVPrt8 – sien Tabel 3.5) was (en waarskynlik dubbele monosome vir die groep 2 chromosoom van *Ae. kotschy* was) is teruggekruis na "W84-17" of "CS". Weerstandbiedende TF₁ families is geplant en hul nageslag (TF₂ families) is weereens met behulp van roestoetse gekarakteriseer vir saailingweerstand. Een populasie – genoem S14 – het 96% weerstandbiedende

plante besit en plante met $2n = 42$ is uit die populasie geselekteer. Hierdie plante het 'n goeie agrotipe in vergelyking met die addisielyn getoon. Saailinge van die translokasielyn is met 'n reeks Suid-Afrikaanse blaarroesrasse (viz. UVPrt2, UVPrt3, UVPrt4, UVPrt5, UVPrt8, UVPrt9, UVPrt10, en UVPrt13) en streeproesrasse (viz. 6E16A- en 6E22A-) geïnkuleer. Sterk blaarroes ($;1$ tot $;1^c$) en streeproes ($;^c$ tot $;1^n$) weerstand is waargeneem. Dit het dus aangetoon dat die translokasie oor gekoppelde blaar- en streeproes weerstand beskik. (Marais *et al.*, 2005)

Tydens meiose in heterosigote geniet die S14-translokasie voorkeur in manlike gamete wat draers daarvan is (96% van 92 gamete getoets), terwyl vroulike oordrag van die weerstand op die oog af redelik normaal lyk (55% van 110 gamete getoets). Die translokasie is oënskynlik homoeoloog aan 2DL van koring. Uit die TF₂ geselekteerde plante blyk om dubbeldwerge met genotipe *Rht-B1b(-)Rht?*² (vir hoogte) te wees (Marais *et al.*, 2005). Vanweë die genetiese agtergrond van die kruisings is dit ook moontlik dat die translokasie met 'n geen vir fotoperiodesensitiwiteit (*Ppd1* of *Ppd2*) geassosieer is. Voordat die translokasie in teelprogramme gebruik sou kon word, moes dit verkort word, die assosiasie van die bogenoemde fotoperiodesensitiwiteitsgeen daarmee, bevestig word en moes die translokasie in 'n genetiese agtergrond wat nie die tweede *Rht*-geen bevat nie, geplaas word om sodoende die agronomiese bruikbaarheid van die translokasie onder droëland toestande te bevestig. (Marais *et al.*, 2005) In 'n onlangs voltooide studie, is 'n verkorte weergawe van die translokasie (translokasie "S14-74") wat beide weerstandsgene gehou het, verhaal (ongepubliseerde data; I.C. Heyns & G.F. Marais, Junie 2010, Dept. Genetika, US, Stellenbosch, 7600, RSA).

Daar was tot onlangs slegs twee resessiewe mikrosatellietmerkers (*Xbarc228* en *Xcfd233*) vir die opsporing van die translokasie beskikbaar (Shi *et al.*, 2003; Sourdille *et al.*, 2004). 'n Dominante SCAR merker (voorlopige benaming: SCAR₄₁₀) is onlangs ontwikkel (ongepubliseerde data; I.C. Heyns & G.F. Marais, Junie 2010, Dept. Genetika, US, Stellenbosch, 7600, RSA). Die merker is teen die einde van hierdie studie gebruik om die segregerende plante vir die translokasie te tipeer.

² Die identiteit van die tweede *Rht*-geen is onbekend.

2.5.4 *Lr24/Sr24*

Die kompenserende *Lr24/Sr24* translokasie is met behulp van geïnduseerde homoeoloë rekombinasie vanaf *Agropyron elongatum* (sinoniem: *Thinopyrum ponticum*) na chromosoom 3DL van koring oorgedra. Meeste van die rekombinante wat in die proses verhaal is, het 'n geen vir rooi graankleur besit, maar rekombinante met wit graankleur is van twee van die oordragte verhaal. Hierdie rekombinante kon verder vir telingsdoeleindes gebruik word. Die oordrag is ook met bestraling bewerkstellig, maar laasgenoemde was 'n nie-kompenserende translokasie, wat dit minder geskik maak vir telingsdoeleindes as die kompenserende translokasie. (Friebe *et al.*, 1996)

Beide *Sr24* en *Lr24* is oneffektief teen roesrasse in Suid-Afrika, hoewel *Lr24* steeds effektief in Australië en Indië is (McIntosh *et al.* 1995). Die translokasie was gewild omdat *Sr24* tot relatief onlangs weerstand teen Ug99 gebied het. In 2006 is daar egter vatbare infeksietipes op kultivars en koringlyne wat *Sr24* dra waargeneem in 'n kwekery in Njoro, Kenia (Jin *et al.*, 2008). Agt en twintig enkel-puisie isolate van die stamroes in hierdie kwekery is versamel en geëvalueer vir virulensie op 16 Noord-Amerikaanse stamroes differensiële lyne asook op 'n koringkultivars wat onderskeidelik *Sr24*, *Sr31*, *Sr38*, *SrMcN* en 'n *Sr24+Sr31* kombinasie dra. Jin *et al.* (2008) het die isolate as ras TTKS (Ug99) met addisionele virulensie vir *Sr31* en *Sr38* geïdentifiseer en het voorgestel dat isolate van hierdie ras voorts in twee groepe verdeel kan word: ras TTKSK met avirulensie vir *Sr24* en ras TTKST met virulensie vir *Sr24* (sien Tabel 2.1). Hierdie bevinding het die bruikbaarheid van *Sr24* in kultivars verder verlaag.

Die translokasie toon 'n lae infeksietipe op die infeksietipe skaal: ; tot ;1 vir *Lr24* en 1⁻ tot 2⁺ vir *Sr24* (McIntosh *et al.* 1995). 'n SCAR-merker, SCS73₇₁₉, is nou gekoppel aan *Lr24* en kan gebruik word om die *Lr24/Sr24* translokasie in populasies op te spoor. Die merker is oorspronklik vanaf 'n RAPD (S73₇₂₈) as 'n merker vir *Lr19* ontwikkel (Cherukuri *et al.*, 2003), maar dit is later vasgestel dat die merker eerder uniek tot *Lr24* is en moontlik ook aan *Sr24* gekoppel is (Prabhu *et al.*, 2004).

2.5.5 *Lr34/Yr18*

Lr34 is 'n tipiese vertraagde-roes geen wat duursame, volwasse plant weerstand aan koring verleen. Dit kan egter ook onder toepaslike toestande saailingweerstand teen sekere roesrasse verleen. Die geen verleng die latente periode van roesinfeksie en bring 'n verlaging in die aantal en grootte van die uridia teweeg deurdat dit hoofsaaklik die tempo waarteen haustoria tydens die vroeë stadium van infeksie in die gasheerselle ontwikkel, verlaag. (Singh *et al.*, 2005) Die geen is nou gekoppel aan *Yr18*, wat duursame weerstand teen streeproes bewerkstellig. *Yr18* verleng op sy beurt ook die latente periode van infeksie en dit verlaag die infeksiefrekwensie en die lengte van die letsels (strepe) op die blare (Singh *et al.*, 2005). *Lr34/Yr18* is op chromosoom 7D geleë. Beide die weerstandsgene het in gewone koring ontstaan (McIntosh *et al.*, 1995).

Die *Lr34/Yr18* kombinasie word by uitstek in teelprogramme en kultivars gebruik, omdat dit enkelgene is wat duursame weerstand verskaf, in vergelyking met die normaalweg poligeniese aard van hierdie fenomeen. Dit is egter steeds raadsaam om die translokasie in kombinasie met ander weerstandsgene te gebruik, aangesien dit hoofsaaklik tydens die volwasse stadium van die plant effektief is. (Ayliffe & Lagudah, 2004) Indien dit saam met ander volwasse plant weerstandsgene gebruik word, is die plant bykans immuun teen infeksie (Krattinger *et al.*, 2009)

Verskeie ander kenmerke/gene word met *Lr34/Yr18* geassosieer, waaronder *Ltn* in die vlagblare (wat ook as 'n morfologiese merker vir *Lr34* gebruik kan word), meeldouweerstand (*Pm38*), verdraagsaamheid ten opsigte van gars-geel-dwerg-virus (*Bdv1*) asook versterking van die uitdrukking van stamroesweerstand (Spielmeyer *et al.*, 2005). Krattinger *et al.* (2009) het onlangs opslae gemaak as die eerste groep wat die *Lr34* geen suksesvol gekloon het. Daar is vasgestel dat die geen oor 24 eksons beskik en dat die nukleotiedvolgorde oor 11 805 bp strek. Die voorgestelde proteïen besit 1 401 aminosure en behoort aan die pleiotropiese-middelweerstandige subfamilie van die Adenosientrifosfaat- (ATP) bindingskasset (ABC)-vervoerders. Dieselfde geen beheer die weerstand wat op *Lr34*, *Yr18*, *Pm38* en ook *Ltn* gebaseer is. Twee haplotipes kan duidelik onderskei word: 'n vatbare – *Lr34* haplotipe en 'n weerstandbiedende +*Lr34* haplotipe. Die haplotipes verskil slegs as gevolg van drie nukleotiedpolimorfismes van mekaar: 'n 3 bp delesie in ekson 11,

'n C/T SNP in ekson 12 en 'n A/T SNP in intron 4. Die groep het 27 koringlyne en – kultivars getipeer en gevind dat kultivars/lyne wat nie *Lr34* besit nie, nie die deleisie het nie en 'n T-nukleotied by beide die SNP's in ekson 12 en intron 4 besit.

Die infeksietipes verskil na gelang van verskillende genotipes en groeitoestande en metings van 0;1 tot 3 is reeds waargeneem (McIntosh *et al.*, 1995). Die klonering van *Lr34* het die ontwikkeling van geenspesifieke merkers wat op die polimorfismes gebaseer is, moontlik gemaak (Krattinger *et al.*, 2009). Die merker wat aanvanklik in hierdie studie gebruik is om die translokasie op te spoor is csLV34, 'n RFLP-merker wat na 'n kodominante STS omgeskakel is (Lagudah *et al.*, 2006). Krattinger *et al.* (2009) het egter met die ontwikkeling van die geenspesifieke merkers een van dié merkers, *cssfr1*, in 'n multipleksreaksie met csLV34 gekombineer. Die *cssfr1*-merker (inleierstel L34DINT9F/L34PLUSR) amplifiseer 'n fragment van 517 bp in plante wat positief is vir *Lr34* en versterk dus die sekerheid waarmee 'n plant tipeer word. Hierdie merkerkombinasie is daarom voorts in hierdie studie gebruik om plante vir *Lr34* te tipeer.

2.5.6 *Sr36*

Die wilde spesie *Triticum timopheevii* was die bron waaruit *Sr36* na die kort arm van chromosoom 2B van koring oorgedra is (McIntosh *et al.* 1995). *Sr36* is nou gekoppel aan *Pm6*, 'n witroesweerstandsgeen. Dit toon ook sterk repulsie-koppeling met ander roesweerstandsgene op chromosoomarm 2BS, naamlik *Lr13*, *Sr32* en *Sr39*. 'n Ongewone rekombinant, "Combination III" is in 1973 geïdentifiseer, waarop *Sr36* en *Sr9e* aangetref is. Hierdie twee gene is ongeveer 20 cM van mekaar op verskillende arms van 2B geleë. (Bariana *et al.*, 2007)

Sr36 is wêreldwyd in kultivars geïnkorporeer, onder meer ook in die Suid-Afrikaanse kultivars "Dipka", "Flamink" en "Gouritz" (Friebe *et al.*, 1996). Hoewel daar verskeie stamroesrasse is wat virulent teen *Sr36* is, word die geen steeds as waardevol geag omdat dit effektief teen Ug99 is en algemeen in aangepaste kiemplasma gebruik word – dikwels in kombinasie met *Sr24*. Soortgelyk aan *Sr24* is daar egter in 2007 matig-vatbare infeksietipes op kultivars en koringlyne wat *Sr36* dra waargeneem in 'n kwekery in Njoro, Kenia. Jin *et al.* (2009) het suiwer enkel-puisie isolate van die

stamroes in hierdie kwekery versamel en geëvalueer vir virulensie op 20 Noord-Amerikaanse stamroes differensiële lyne wat *Sr36*, *Sr31+Sr36* en *Sr24+Sr36* dra. Isolate is as ras TTTSK, wat aan die Ug99 rasstamboom behoort, geïdentifiseer en virulensie vir *Sr36* is bevestig. Hierdie bevinding is verontrustend, aangesien dit verwag kan word dat dit bloot 'n kwessie van tyd is voordat *Sr36* ook deur Ug99 oorkom gaan word. Die nuwe Ug99-ras (PTKST) in Suid-Afrika is tans steeds avirulent teen *Sr36* (Pretorius *et al.*, 2010).

Sr36 toon 'n 0;⁺ en soms ook X infeksietipe (McIntosh *et al.*, 1995). 'n Kodominante STS-merker wat van 'n mikrosatellietmerker (*Xstm773*) afgelei was, *stm773*, kan gebruik word om populasies vir *Sr36* te sif (Bariana *et al.*, 2007).

2.5.7 *Sr2*

Sr2 is in die 1920's vanaf *Triticum turgidum* var. *dicoccum* cv. "Yaroslav" na die kort arm van chromosoom 3B van gewone koring oorgedra. McIntosh *et al.* (1995) meen dat dit stellig die belangrikste geen teen stamroes is. Hierdie geen verskaf gedeeltelike, duursame, volwasse plant weerstand met siektesimptome wat wissel na gelang van die omgewingstoestande en genetiese agtergrond van die plante. Die geen maak deel uit van 'n versameling gene met additiewe effekte wat saam as die "*Sr2-Kompleks*" bekend staan. Daar is egter min inligting rakende die res van die gene in die kompleks bekend. Die kompleks vorm nietemin die basis vir duursame stamroes in kiemplasma in Noord-Amerika, Australië sowel as Mexiko en word wêreldwyd in kultivars geïnkorporeer. 'n Verdere voordeel van *Sr2* is dat dit in kombinasie met ander nie-hoofgene weerstand teen Ug99 bied. (Singh *et al.*, 2006)

Sr2 word met 'n fenotipiese kenmerk genaamd "pseudo-swart kaf" (PSK) geassosieer. Hierdie kenmerk kan in teelprogramme gebruik word om die teenwoordigheid van *Sr2* aan te dui, hoewel hoë vlakke van uitdrukking van PSK die graanopbrengs verlaag. Kota *et al.* (2006) het gepoog om met behulp van rekombinasie die assosiasie tussen *Sr2* en PSK te verbreek, maar kon nie daarin slaag nie. Dit is moontlik dat PSK in weerstandige plante by die vorming van fisiese of chemiese hindernisse wat infeksie vertraag, betrokke is. Mishra *et al.* (2005) het egter aangetoon dat die assosiasie tussen PSK en *Sr2* wel verbreek kan word.

Addisionele genetiese merkers behoort dus gebruik te word om die teenwoordigheid van *Sr2* in populasies te bevestig, ook aangesien PSK gedeeltelik dominant oorgeërf word en die uitdrukking daarvan deur die omgewing beïnvloed word. Wat meer is, *Sr2* word resessief oorgedra en die uitdrukking daarvan word dikwels deur ander gene verberg, wat fenotipiese tipering des te meer bemoeilik (Hayden *et al.*, 2004).

In 2003 het Spielmeyer *et al.* 'n STM-merker, *gwm533*, ontwikkel vir die opsporing van *Sr2*. Hierdie merker amplifiseer 'n fragment van 120 bp in plante wat positief is vir *Sr2*, terwyl 'n nul-alleel of 'n fragment van 155 bp in plante negatief vir *Sr2* waargeneem word. In sommige Australiese kultivars amplifiseer die 120 bp ook in plante wat nie oor *Sr2* beskik nie. Die materiaal wat in hierdie studie gebruik is, het egter nie enige van hierdie kultivars in hul genetiese agtergrond nie, dus kan die merker effektief hier aangewend word. McNeil *et al.* (2008) het 'n BAC (bakteriële kunsmatige chromosoom) biblioteek van hierdie chromosoom gebruik om 'n invoegingsetel-gebaseerde-polimorfisme (ISBP) merker – X3B028F08 – te ontwikkel wat gebruik kan word om *Sr2* in populasies op te spoor. X3B02F08 amplifiseer 'n fragment van 243 bp in plante wat negatief vir *Sr2* is. Om hierdie rede is die merker in hierdie studie saam met *gwm533* in 'n multipleksreaksie vir die tipering vir *Sr2* gebruik.

3. MATERIAAL EN METODES

3.1 Oorsigtelike samevatting

Hierdie studie het uit drie fasette (Fig. 3.1) bestaan, naamlik:

- (a) Die daarstelling van 'n kruisingspopulasie wat hoogs heterogeen is ten opsigte van gene vir roesweerstand, proseseringsgehalte en aanpasbaarheid;
- (b) Die ontwikkeling van ingeteelde lyne by wyse van VH kweking; en
- (c) Die vermeerdering en voorlopige karakterisering van ingeteelde lyne in terme van die weerstandsgene waarvoor hul beskik.

3.1.1 Ontwikkeling van 'n heterogene kruisingspopulasie

Twee heterosigotiese plante vir die *Lr54/Yr37* translokasie (genoem 07M75-1 en 07M75-2) is in al vier moontlike kombinasies gekruis met twee plante wat beide die *Lr19-149-299* translokasie (Marais *et al.*, 2001) en *Sr31*-geenkompleks (1RS₃₈ 9.1BL translokasie; Lukaszewski, 2000) besit het (genoem *Lr19/Sr31-1* en *Lr19/Sr31-2*). Die F₁ is aangedui met die kruisingsnommer 07M81. Die twee ouerplante uit kruising 07M75 (stamboom: CS-S14/W84-17) sou benewens die aanwesigheid van *Lr54/Yr37*, ook nog heterosigoties gewees het vir die volwasse-plant weerstandsgene, *Lr34/Yr18*, wat in "CS" teenwoordig is, asook *Lr24/Sr24* wat in "W84-17" voorkom. Die teenwoordigheid van die *Lr54/Yr37* translokasie in 07M75 is in saailingtoetse bevestig (met gebruik van blaarroesras UVPrt8). Beide die "CS"- en "W84-17" genetiese agtergronde wat in die kruising voorkom is saailing-vatbaar vir UVPrt8 (persoonlike kommunikasie; G.F. Marais, Mei 2008, Dept. Genetika, US, Privaatsak X1, Matieland, 7602, RSA). Die twee *Lr19/Sr31*-ouerplante is verhaal uit diverse kruisings (herhalende seleksie populasie) met plaaslike teelmateriaal en kon daarom ook een of meer van die gene/geenkomplekse *Sr24/Lr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr36* en *Sr2* besit het. Vir hierdie redes is gDNS uit hierdie vier ouerplante geëkstraer en gebruik om met die beskikbare molekulêre merkers te toets vir teenwoordigheid van die *Lr19*, *Sr31*, *Sr24/Lr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr36* en *Sr2* translokasies. Die merker-analises

is vooraf ge-optimeer met gebruik van gDNS van kontrole-genotipes wat in Tabel 3.1 gelys word.

Tabel 3.1 Positiewe- en negatiewe kontroles (heksaploïede koring) wat gebruik is vir die bevestiging van die merkers wat in hierdie studie gebruik is.

Merker	Positiewe kontrole	Negatiewe kontrole
<i>Lr19</i>	<i>Lr19/Sr31</i> ¹	07M75 ²
<i>Sr31</i> -kompleks	<i>Lr19/Sr31</i>	07M75 ²
<i>Lr54/Yr37</i>	07M75 ²	"CS"
<i>Sr24/Lr24</i>	"W84-17" ³	"CS"
<i>Lr34/Yr18</i>	"CS"	"Inia-66"
<i>Sr36</i>	"W2691" ⁴	"CS"
<i>Sr2</i>	"Reliance"	"CS"

¹Plante is uit 'n hoogs heterogene herhalende seleksie populasie verhaal en het dus nie 'n bekende stamboom nie.

² Stamboom = CS-*Lr54/Yr37/W84-17*

³ Stamboom = Inia 66/5/El Gaucho/Son 64/4/Tg/3/Son 64//Tzpp/Nai 60

⁴ Stamboom = 'n Stamroes differensiërende genotipe wat *Sr36* dra en vanaf die LNR-KGI (Landbounavorsingsraad – Kleingraaninstituut), Bethlehem, verkry is

F₁- (07M81-) plante wat beide die *Lr19*- en *Sr31*-translokasies besit het, is geselekteer en is verder bloot vir die teenwoordigheid van die *Sr24/Lr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr36* en *Sr2* translokasies getipeer (maar nie geselekteer nie). Hierdie geselekteerde subgroep van plante is gekruis met 'n telerslyn (2007-US-063) uit die teelprogram van die Universiteit Stellenbosch. Die telerslyn is as manlike ouer in die kruisings gebruik. Lyn 2007-US-063 het hoë graanopbrengs en 'n uitstekende agrotipe. Die mikrogram-eienskappe dui op 'n sterk deegtype, vergelykbaar met die vereistes wat deur die bedryf daargestel word. Die lyn is bestand teen al die plaaslike blaarroes-, stamroes- en streeproesrasse. Toetsing in Kenia het 'n 5MR-MS veldreaksie teen Ug99 en 'n variant daarvan getoon. Lyn 2007-US-063 besit die *Lr24/Sr24* translokasie en waarskynlik ook die *Lr34/Yr18* gene. Dit blyk onwaarskynlik dat *Sr2* in hierdie lyn teenwoordig is. Lyn 2007-US-063 is met die molekulêre merkers wat spesifiek is vir die *Lr19*, *Sr31*, *Lr54/Yr37*, *Lr24/Sr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr36* en *Sr2* translokasies, getipeer.

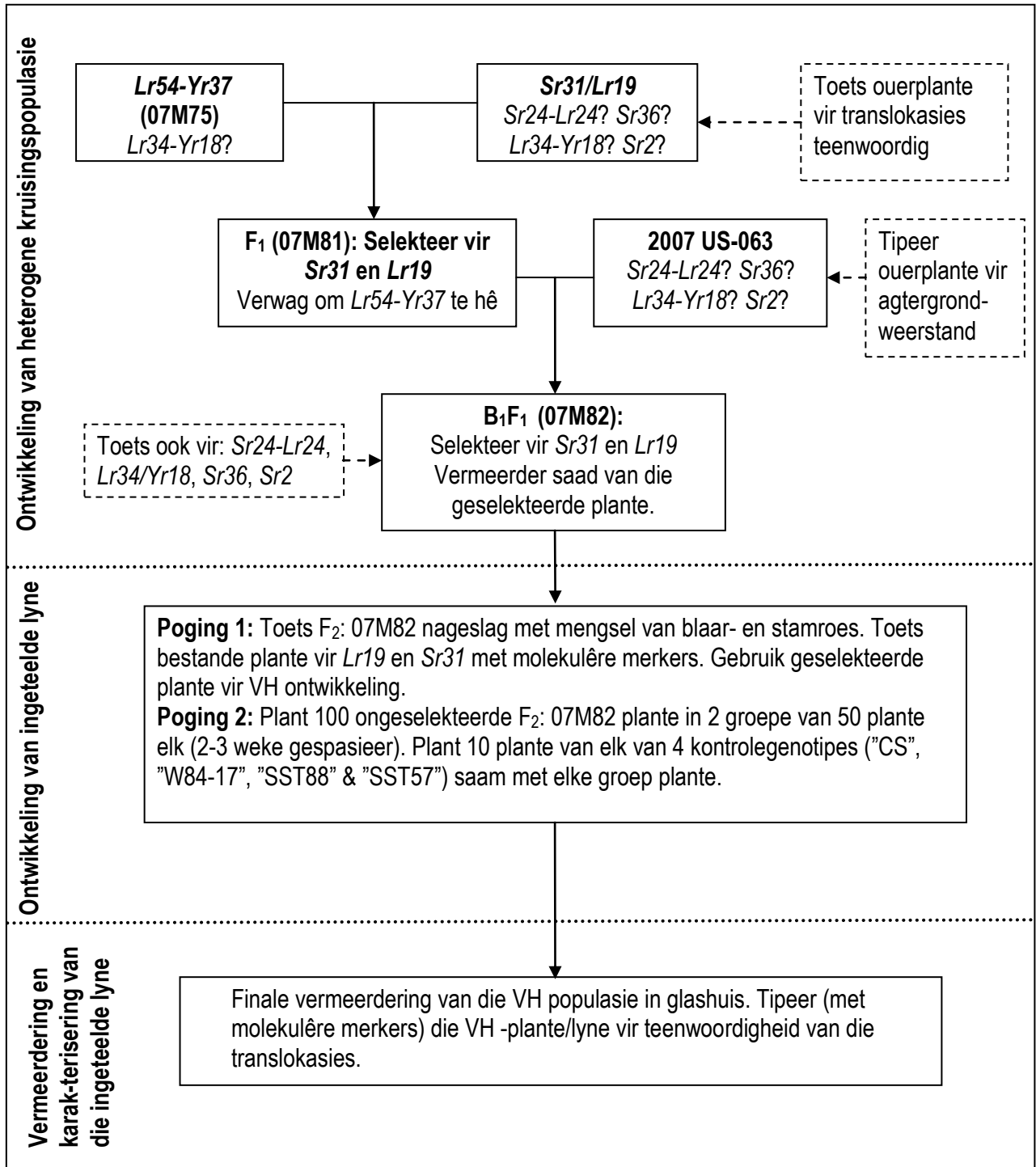
Die F_1 wat verhaal is na bestuiwing van die 07M81 F_1 -plante met teelwyn 2007-US-063 word met die kruisingsnommer 07M82 aangedui. 'n Agtervoegsel is hierby gevoeg om die verskillende, geselekteerde 07M81 ouerplante wat vir kruising gebruik is, te onderskei (bv. 07M82-3, 07M82-7, ens.). Individuele 07M82 F_1 -plante is van mekaar onderskei met 'n tweede syfer-agtervoegsel (bv. 07M82-3.1, 07M82-3.2, ens.). Die 07M82 F_1 -nageslag is geplant en gDNS is uit elk van die plante geëkstraer. Hierdie plante is weereens getipeer vir die *Lr19* en *Sr31* translokasies en plante wat oor beide translokasies beskik het, is verder getipeer (maar nie geselekteer nie) vir die *Sr24/Lr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr36* en *Sr2* translokasies. Die *Lr19/Sr31* data is vervolgens gebruik om 'n subgroep plante te selekteer. Hierdie plante is toegelaat om te selfbestuif en die F_2 : 07M82 generasies is gebruik vir die daarstelling van ingeteelde lyne (Fig. 3.1).

3.1.2 Ontwikkeling van ingeteelde lyne

Die F_2 : 07M82 is benut vir die ontwikkeling van 'n VH populasie. In 'n aanvanklike poging is F_2 -saailinge met 'n mengsel van blaar- en stamroesrasse getoets. Die weerstandbiedende plante is toe weer met die molekulêre merkers getoets vir die teenwoordigheid van die *Lr19* en *Sr31* translokasies en plante is geselekteer vir VH ontwikkeling. 'n Lae sukses tempo het daarop gedui dat die betrokke koringgenotipes waarskynlik swak VH genereringsvermoëns het. Die poging is gevolglik herhaal, maar hierdie keer met insluiting van kontrole-genotipes, "CS" en "W84-17" vir swak VH genereringsvermoë, asook twee kommersiële koringkultivars vir goeie VH genereringsvermoë, "SST88" en "SST57" (Sensako (Edms) Bpk, Randburg, RSA) (persoonlike kommunikasie; M. Horn, Augustus 2009, Sensako (Edms) Bpk, Tradestraat, Napier, 7270). Vir die tweede poging is die F_2 -plante nie vooraf geselekteer vir die teenwoordigheid van die merkers nie, aangesien 'n beperkte aantal plante sowel as tyd beskikbaar was. Ook, vooraf seleksie is voorheen slegs vir *Lr19* en *Sr31* gedoen. Deur nie vooraf te selekteer nie, sou plante wat nie oor hierdie twee translokasies beskik nie, maar wel oor een of meer van die ander, ook vir die VH ontwikkeling gebruik kon word. Honderd F_2 : 07M82 plante is bloot in twee groepe van 50 plante elk, geplant. Saam met elke F_2 -groep is daar 10 plante van elke kontrole ingesluit. Daar is gepoog om een aar per plant van soveel as moontlik van die F_2 -plante en 10-15 kontrole plante met mieliestuifmeel te bestuif (Fig. 3.1).

3.1.3 Vermeerdering en karakterisering van die ingeteelde lyne

Die finale vermeerdering van die ingeteelde lyne is in die glashuis uitgevoer. Hierdie lyne is voorts getipeer vir die onderskeie weerstandsgeentranslokasies.



Figuur 3.1 Diagrammatiese voorstelling van die verloop van die studie.

3.2 Plantmateriaal

Die plantmateriaal is in sandge vulde potte (vier sade per pot) gekweek. 'n Standaard voedingsoplossing bestaande uit 164 g Sol-u-fert (Kynoch Fertilizers (Edms) Bpk, Milnerton, RSA), 2 g Microplex (Ocean Agriculture (Edms) Bpk, Muldersdrift, RSA) en 77 ml kaliumnitraat in 100 l water is gebruik om die potte nat te maak. Plante bestem vir kruisings asook rugsteun-plantings is in 'n water-verkoelde glashuis (ongeveer 5°C koeler as die buite-temperatuur) gekweek. Plante wat vir VH ontwikkeling bestem was, is tydens die vroeë pypstadium oorgeplaas na 'n verkoelde glashuis (20°C).

3.3 Genomiese DNS-ekstraksie en -kwantifisering

'n Aangepaste weergawe van die protokol van Doyle en Doyle (1990) is vir die ekstraksie van gDNS gebruik. Ongeveer 100 mg vars blaarweefsel is opgesny in 'n 2.2 ml mikrosentrifugebuis. Agthonderd mikroliter 2% (w/v) N-setiel-N, N, N-trimetiesel-ammoniumbromied (CTAB) ekstraksiebuffer³ en 1.6 µl 0.2% (v/v) beta-merkaptotoetanol (BME) is by die blaarweefsel gevoeg. Die weefsel is in 'n Qiagen® TissueLyser (Qiagen (Edms) Bpk; plaaslike verskaffer: Southern Cross Biotechnology, Claremont, RSA) vir vier maal 90 sek teen 30 Hz gemaal. Die buisies is na elke 90 sek stap geroteer. Die mengsel is in 'n waterbad vir 60 min teen 60°C geïnkubeer. Agthonderd mikroliter chloroform: isoamiel-alkohol (24:1) is by die mengsel gevoeg en is vir 8 min teen 12 000 rpm gesentrifugeer. Ongeveer 600 µl van die bostand is na 'n skoon 2.2 ml buisie oorgedra en dieselfde volume fenol: chloroform: isoamiel-alkohol (25:24:1) is hierby gevoeg. Die mengsel is vir 3 min teen 12 000 rpm gesentrifugeer. Ongeveer 550 µl van die bostand is na 'n skoon 2.2 ml buisie oorgedra en dieselfde volume chloroform: isoamiel-alkohol (24:1) is by die mengsel gevoeg, waarna dit vir 5 min teen 12 000 rpm gesentrifugeer is. Die bostand is na 'n skoon 1.5 ml buisie oorgedra en dieselfde volume verkoelde

³ 1.4 M natriumchloried (NaCl), 20 mM etileendiamientetra-asynsuur-dinatrium sout (Na₂EDTA) (pH 8.0), 100 mM Tris-Chloried (Tris-Cl) (pH 8.0)

(4°C) isopropanol is daarby gevoeg. Die mengsel is oornag by -20°C geïnkubeer en die volgende dag vir 10 min teen 12 000 rpm by 4°C gesentrifugeer. Die sentrifugaat is met 70% (v/v) etanol gewas, by 4°C gesentrifugeer (6 min teen 12 000 rpm) en gelaat om lugdroog te raak. Die droë sentrifugaat is in 50 µl Tris-EDTA (TE) (pH 8.0) en 40 µg/ml RNase A opgelos en is daarna vir 30 min by 37°C geïnkubeer. Hierna is 0.1 volume natriumasetaat (NaOAc) (3 M, pH 5.0) en 2 volumes 100% etanol by die mengsel gevoeg en is dit vir 10 min (4°C, 12 000 rpm) gesentrifugeer. Die sentrifugaat is vervolgens twee maal met 70% (v/v) etanol gewas en vir 6 min (4°C, 12 000 rpm) gesentrifugeer. Die sentrifugaat is gelaat om lugdroog te raak, in 30 µl “PCR water” (Bioline Ltd; plaaslike verskaffer: Celtic Molecular Diagnostics (Edms) Bpk, Mowbray, RSA), geresuspendeer en by 4°C gestoor.

Die konsentrasie van die geëkstraereerde gDNS is met behulp van 'n Nanodrop® ND-1000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Kempton Park, RSA) bepaal en alle monsters wat gebruik is, is in dH₂O tot 'n finale konsentrasie van 50 ng/µl verdun.

3.4 Molekulêre merkers

Al die PKR-inleierstelle wat as merkers vir die onderskeie translokasies gebruik is, is deur Integrated DNA Technologies, Inc. (plaaslike verskaffer: Whitehead Scientific (Edms) Bpk, Stikland, RSA) vervaardig. Die oorsprong, benaming en tegniese data van hierdie merkers word in Tabel 3.2 opgesom. Die tweede merker vir *Lr34/Yr18*, *cssfr1*, word saam met csLV34 in 'n multipleksreaksie gebruik en die tweede merker vir *Sr2*, *gwm553*, word saam met X3B028F08 in 'n multipleksreaksie gebruik.

Tabel 3.2 Opsomming van die molekule merkers wat in hierdie studie gebruik is.

Geen	Merker-naam	Tipe merker	Voorwaartse (F) en terugwaartse (R) inleivolgorders	Annelerings-temperatuur (T _m)	Benaderde fragmentgrootte	Verwysing
Lr19-149	STSLr19 ₁₃₀	Dominante STS	F: 5' CAT CCT TGG GGA CCT C 3' R: 5' CCA GCT CGC ATA CAT CCA 3'	60°C	130 bp	Prins <i>et al.</i> , 2001
Sr31-kompleks	iag95-STS	Kodominante STS	F: 5' CTC TGT GGA TAG TTA CTT GAT CGA 3' R: 5' CCT AGA ACA TGC ATG GCT GTT ACA 3'	55°C	1100 bp	Mago <i>et al.</i> , 2002
Lr54/Yr37	SCAR ₄₁₀ *	SCAR	F: 5' ACC AAT TCA ACT TGC CAA GAG 3' R: 5' GAG TAA CAT GCA GAA AAC GAC 3'	61°C	410 bp	Heyns 2010 (Ongepubliseerde data)
Sr24/Lr24	SCS73 ₇₁₉	SCAR	F: 5' TCG TCC AGA TCA GAA TGT G 3' R: 5' CTC GTC GAT TAG CAG TGA G 3'	55°C	719 bp	Cherukuri <i>et al.</i> , 2003; Prabhu <i>et al.</i> , 2004
Lr34/Yr18	csLV34	Kodominante STS	F: 5' GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG 3' R: 5' TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT 3'	56°C	150 bp as positief 229 bp as negatief	Lagudah <i>et al.</i> , 2006
Lr34/Yr18	<i>cssfr1</i> (L34DINT9F + L34PLUSR)	Alleelspesifieke merker	F: 5' TTG ATG AAA CCA GTT TTT TTT CTA 3' R: 5' GCC ATT TAA CAT AAT CAT GAT GGA 3'	58°C	517 bp	Krattinger <i>et al.</i> , 2009
Sr36	stm773	Kodominante STS	F: 5' AAA CGC CCC AAC CAC CTC TCT C 3' R: 5' ATG GTT TGT TGT GTT GTG TGT AGG 3'	58°C	162 bp as positief 192 bp as negatief	Bariana <i>et al.</i> , 2007
Sr2	X3B028F08	ISBP	F: 5' ACG AAC AAG GGG AAG ACG 3' R: 5' TTT CGG TAG TTG GGG ATG C 3'	61°C	243 bp	McNeil <i>et al.</i> , 2008
Sr2	<i>gwm553</i>	STM	F: 5' AAG GCG AAT CAA ACG GAA TA3' R: 5' GTT GCT TTA GGG GAA AAG CC 3'	61°C	120 bp	Spielmeier <i>et al.</i> , 2003

* Voorlopige benaming

3.5 Optimisering van molekulêre merkers

Die reaksievolumes (ná optimisering) vir polimerasekettingreaksie (PKR) amplifisering van elke merker word in Tabel 3.3 aangetoon. Vir die amplifikasie van die *Lr34/Yr18* multipleksreaksie is die PCR-reaksievolumes as volg: 1.5 µl DNS (50 ng/µl), 4.6 µl dH₂O, 10 µl “KAPA Taq ReadyMix with dye” (Kapa Biosystems (Edms) Bpk, Observatory, RSA), 0.6 µl van elk van L34DINTF en L34PLUSR en 0.25 µl van elk van csLV34-F en csLV34-R. Vir die amplifikasie van die *Sr2* multipleksreaksie is die PCR-reaksievolumes as volg: 1.3 µl DNS (50 ng/µl), 4.7 µl dH₂O, 10 µl “KAPA Taq ReadyMix with dye”, 0.5 µl Mg₂Cl (50 ng/µl), 0.5 µl van elk van *gwm553-F* en *gwm553-R* en 0.75 µl van elk van X3B028F08-F en X3B028F08-R.

Die dH₂O, reaksiebuffer, magnesiumchloried (MgCl₂), dinukleotiedtrifosfate (dNTPs) en Taq DNS polimerase ensiem (BIOTAQ™ DNA polymerase) is deur Bioline Ltd, verskaf. Amplifikasie is in 'n 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Fairlands, RSA) uitgevoer.

Die PCR reaksiekondisies van die onderskeie merkers word in Tabel 3.4 aangegee. Die PCR reaksiekondisies vir csLV34 (alleen) was soos volg: 5 min denaturering by 94°C, gevolg deur 5 siklusse van 1 min by 94°C, 1 min by 55°C en 2 min by 72°C. Dit is gevolg deur 30 siklusse van 30 sek by 94°C, 30 sek by 55°C en 50 sek by 72°C. Die amplifisering is afgesluit met 'n finale stap van 5 min by 72°C en die produkte is by 4°C gehou tot dit benodig is.

Drie mikroliter o-Cresolsulfoneftaleen (Cresol Rooi) laaibuffer is by die PCR-produkte gevoeg om die laai daarvan op 'n jel te vergemaklik. Die PCR-produkte vir *Lr34/Yr18* is op 'n 2.5% (m/v) agarose (Bioline Ltd) jel wat 0.5 µg/ml ethidiumbromied (EtBr) in 1x Tris boraat EDTA (TBE) buffer⁴ bevat, geskei. Alle ander PCR-produkte is op 'n 1.5% (m/v) agarose jel met dieselfde konsentrasie EtBr geskei. Elektroforese is teen 100 V vir 40-60 min uitgevoer, na gelang van die konsentrasie en grootte van die jel. 'n Uvipro Silver (Uviteq Ltd; plaaslike verskaffer: Whitehead Scientific (Edms) Bpk,

⁴ 'n 5x Voorraadoplossing is berei [0.5 M Tris-Cl, 0.5 M boorsuur, 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0)] en verdun tot 'n 1x werksoplossing.

Stikland, RSA) ultraviolet-transillumineerder is gebruik om die amplifikasieprodukte te visualiseer.

Tabel 3.3 PCR reaksievolumes (in μl) vir die gebruik van die onderskeie molekulêre merkers.

Reagense	STSLr19 ₁₃₀	iag95-ST5	SCAR ₄₁₀	SCS73 ₇₁₉	csLV34	stm773
10x Reaksiebuffer	2.5	2.5	2.5	1	1	2.5
50 mM MgCl ₂	1	1	0.75	1	0.3	0.6
2.5 mM dNTPs	1	2	2	2	0.2	2
10 μM Inleier – F	1*	1.25	1.25	1	1	0.8
10 μM Inleier – R	1*	1.25	1.25	1	1	0.8
5 U/l Taq	0.2	0.2	0.2	0.15	0.05	0.2
“PCR water”	16.3	14.8	13.05	16.85	4.45	16.6
50 ng/ μL DNS	2	2	4	2	2	1.5
Totaal	25	25	25	25	10	25

*Die begin konsentrasie van die STSLr19₁₃₀ inleiers is 12.5 μM

Tabel 3.4 PCR reaksiekondisies vir die onderskeie merkers.

STSLr19 ₁₃₀		iag95-ST5		SCAR ₄₁₀		SCS73 ₇₁₉		csLV34 & cssf1		stm773		X3B028F08 & gwm553	
94°C	4 min	95°C	3 min	94°C	5 min	94°C	2 min	94°C	5 min	94°C	2 min	94°C	5 min
94°C	30 sek	95°C	30 sek	94°C	1 min	94°C	1 min	94°C	1 min	94°C	1 min	94°C	30 sek
60°C	30 sek	52°C	30 sek	61°C	1 min	55°C	1 min	57°C	1 min	58°C	30 sek	61°C	30 sek
72°C	30 sek	72°C	50 sek	72°C	1 min	72°C	1 min	72°C	1 min	72°C	1 min	72°C	30 sek
72°C	5 min	72°C	10 min	72°C	7 min	72°C	7 min	72°C	5 min	72°C	7 min	72°C	5 min
4°C	∞	4°C	∞	4°C	∞	4°C	∞	4°C	∞	4°C	∞	4°C	∞
30 siklusse		30 siklusse		35 siklusse		35 siklusse		35 siklusse		40 siklusse		35 siklusse	

3.6 Ontwikkeling van verdubbelde haploïede

Die ontwikkeling van VH is volgens 'n aangepaste weergawe van die protokol van Pienaar (1997) gedoen. "Honey Sweet" mielies (Agricol (Edms) Bpk, Brackenfell, RSA) is as die stuifmeelouer gebruik. Koringare is vier dae tot een week voor stuifmeelstorting ontman en is drie tot vyf dae later met mieliestuifmeel bestuif. Die mieliepluime is 2-3 h voor stuifmeelversameling gestroop ten einde van reeds gestorte helms ontslae te raak. Vars stuifmeel is op papier versamel en 'n klein varkhaarkwassie is gebruik om die stuifmeel ruimskoots aan die stempels van die koringblommetjies aan te wend. Die are is met 'n glisien kruisingsakkie bedek. 'n Groeireguleerder-oplossing (GRO) [50 mg/l 2,4-dichlorofenoksie-asynsuur (2,4D) + 100 mg/l gibberelliensuur (GA₃)] is 30 h na bestuiwing in die individuele blomkoppies toegedien en die kruisingsakkie is weer teruggeplaas.

Embrioredding is na 18-21 dae gedoen. Die sade is met 'n pinset uit die blomkoppie en aarkaffies gehaal. Die sade is vir 30 sek in 70% (v/v) etanol en daarna in 30% (v/v) Jik vir 10 min gesteriliseer. Die embrios is onder 'n stereomikroskoop gedissekteer en in 100 ml botteltjies wat gemodifiseerde MS- (Murashige & Skoog, 1962) medium wat slegs 10% (w/v) ammoniumnitraat (NH₄NO₃) bevat, geplaas. Die embrios is vir 3-4 dae by 4°C in die donker geplaas, waarna dit na 'n groeikabinet by 24°C met 'n 14 h lig/10 h donker siklus verskuif is. Die aantal blommetjies bestuif, sade geset, die verhouding groen:wit sade, sade met embrios en embrios wat gegroei het, is aangeteken.

Embrios wat tot plantjies ontwikkel het is in veen-gevulde potte oorgeplant en eenmalig met Seagrow® (Premier Fishing SA (Edms) Bpk, Kaapstad, RSA) natgemaak. Daarna is die potte met 'n deurskynende, steriele plastieksak bedek, waarna dit in die groeikabinet (groeisiklus soos vantevore) teruggeplaas is. Die plantjies is stelselmatig oor 'n tydperk van een week afgehard, waarna dit in 'n groeikamer met 'n konstante temperatuur van 21°C verskuif is. Teen die 2/3-spruit stadium is wortelpunte geknip vir chromosoomtellings (sien 3.8) ten einde die haploïede toestand van die plante te bevestig. Haploïede plante is uit die grond gehaal en vir 24 h aan 'n deurlugte 0.05% (w/v) kolgisien behandeling by 25°C onderwerp ten einde die chromosoomgetal te verdubbel. Na afloop hiervan is die

wortels vir 3-4 h onder lopende water afgespoel, waarna die plante vir 3-4 dae in deurlugte water by 4°C (12 h lig/12 h donker siklus) geplaas is. Die bogroei is hierna teruggeknip tot 15 cm en die plante is weer in potte wat met veen gevul is, geplant.

3.7 Saailing roestoetse

Blaarroesrasse UVprt8, UVprt9 en UVprt10 en stamroesrasse UVprt54, UVprt55 en UVprt56 is vir saailingtoetse gebruik. Die avirulensie/virulensie data vir elk van hierdie rasse word in Tabel 3.5 aangedui.

Tabel 3.5 Avirulensie/virulensie data vir elk van die roesrasse wat gebruik is (aangepas uit Le Maitre, 2010).

	Avirulensie	Virulensie
Blaarroes		
UVprt8 (3SA132) ¹	<i>Lr3a, Lr3bg, Lr3ka, Lr11, Lr16, Lr20, Lr26, Lr30</i>	<i>Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr10, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr24</i>
UVprt9 (3SA133) ¹	<i>Lr2a, Lr2b, Lr3bg, Lr15, Lr16, Lr17, Lr26</i>	<i>Lr1, Lr2c, Lr3a, Lr3ka, Lr10, Lr11, Lr14a, Lr20, Lr30</i>
UVprt13 (3SA140) ¹	<i>Lr3a, Lr3bg, Lr3ka, Lr11, Lr16, Lr20, Lr30</i>	<i>Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr10, Lr14a, Lr15, Lr17, Lr24, Lr26</i>
Stamroes		
UVPgt54 (2SA55) ¹	<i>Sr5, Sr6, Sr7b, Sr8b, Sr9b, Sr9e, Sr9g, Sr13, Sr15, Sr21, Sr22, Sr23, Sr24, Sr25, Sr26, Sr27, Sr29, Sr30, Sr31, Sr32, Sr33, Sr35, Sr38, Sr39, Sr43, SrEm, SrGt</i>	<i>Sr7a, Sr8a, Sr9a, Sr9d, Sr9f, Sr10, Sr11, Sr12, Sr14, Sr16, Sr19, Sr20, Sr34, SrLc</i>
UVPgt55 (2SA88) ¹	<i>Sr13, Sr15, Sr21, Sr22, Sr24, Sr25, Sr26, Sr27, Sr29, Sr31, Sr32, Sr33, Sr35, Sr36, Sr39, Sr43, SrAgi, SrEm, SrKiewiet, SrSatu</i>	<i>Sr5, Sr6, Sr7a, Sr7b, Sr8a, Sr8b, Sr9a, Sr9b, Sr9d, Sr9e, Sr9f, Sr9g, Sr10, Sr11, Sr12, Sr14, Sr16, Sr17, Sr19, Sr20, Sr23, Sr30, Sr34, Sr38, SrLc</i>
UVPgt56 (2SA102K) ¹	<i>Sr5, Sr6, Sr7b, Sr8b, Sr9b, Sr9e, Sr11, Sr17, Sr21, Sr24, Sr30, Sr31, Sr36, Sr38, SrEm, SrSatu, SrTobie</i>	<i>Sr8a, Sr9g, Sr27, SrKiewiet</i>

¹ Die kode in hakies dui op die LNR-KGI kodes vir die onderskeie rasse.

Roesspore is óf direk vanaf die “CS” saailinge waarop dit vermeerder is versamel, óf spore wat by -80°C gestoor was, is gebruik. In laasgenoemde geval is die spore vir 10 min by 37°C in ’n waterbad geskok alvorens dit gebruik is. Spore is in dH₂O waarby ’n druppel Tween®20 (Merck Chemicals (Edms) Bpk, Modderfontein, RSA) gevoeg is, gesuspendeer. Die suspensie is op saailinge van ongeveer 15 cm hoog gesproei. Die potte is afsonderlik met skoon, deursigtige sakkies bedek en by 25°C in die donker geplaas. Die sakkies is na 24 h afgehaal en die potte is in ’n groeikabinet met ’n konstante temperatuur van 25°C geplaas. Die saailinge is na 2 weke met gebruik van ’n infeksietipe-skaal van McIntosh *et al.* (1995) geëvalueer.

Tabel 3.6 Klassifikasie van roestoets infeksietipes (aangepas uit McIntosh *et al.*, 1995).

Infeksietipe	Beskrywing van simptome	Gasheer-reaksie
0	Geen sigbare uredia	Immuun
;	Hipersensitiwiteitsvlekke (chlorose)	Baie bestand
1	Klein uredia gepaardgaande met nekrose	Bestand
2	Klein tot medium uredia met groen “eilande” omring deur nekrose of chlorose	Matig bestand/ matig vatbaar
3	Medium grootte uredia met of sonder chlorose	Matig vatbaar
4	Groot uredia sonder chlorose	Vatbaar

3.8 Kleur van wortelpunte vir chromosoomtellings

Die protokol wat hier gebruik word, is aangepas uit dié van Darlington & La Cour (1960). Een of twee wortelpunte is afgeknip en in ’n botteltjie (18 mm x 50 mm) wat 4-5 ml gedistilleerde water (dH₂O) bevat, geplaas. Die botteltjies is op ys in ’n polistireenhouer geplaas en vir 29 h in ’n yskas (4°C) gehou. Die wortelpunte is die volgende dag gefikseer met metanol: propioonsuur (3:1) en by kamertemperatuur gestoor. Vir die kleuring van die wortelpunte, is die fikseermiddel met dH₂O vervang (30 min by kamertemperatuur). Hierna is die wortelpunte na 1N soutsuur (HCl) vir 7½ min by 60°C oorgedra, waarna dit oorgedra is na, en vir 2 min gespoel is met, dH₂O. Die water is met Feulgen kleurmiddel vervang en vir 2 h of oornag in ’n yskas

gelaat. Die Feulgen is met dH₂O vervang en die wortelpunte is twee maal hiermee gespoel (vir 5 min). Die dH₂O is met NaOAc-buffer, pH 4.5, vervang (5 min). Die buffer is met vars 2.5% (w/v) Pecticlear- (Seravac Biotech (Edms) Bpk, Goodwood, RSA) oplossing (0.5 g Pecticlear in 20 ml NaOAc-buffer) vervang en die wortelpunte is oornag (12 h) in 'n yskas of vir 30 min by 37°C geplaas. Die Pecticlear-oplossing is met dH₂O vervang en mikroskooppreparate is vir chromosoomtellings berei. 'n Klein druppel Rosner 1% (w/v) asynkarmyn is vir montering gebruik.

3.9 Finale vermeerdering en karakterisering van ingeteelde lyne

Die VH plante is in 'n glashuis vermeerder. Die saad is in veen-gevulde potte geplant. Die gDNS van elk van die ingeteelde lyne is geëkstraheer en gekwantifiseer. Die lyne is voorts met die toepaslike molekulêre merkers vir elk van die weerstandsgeentraslokasies getipeer. 'n Genotipe-profiel is vir elk van die lyne saamgestel.

4. RESULTATE EN BESPREKING

4.1 Ontwikkeling van 'n heterogene kruisingspopulasie

'n Heterogene kruisingspopulasie is aanvanklik vanaf vier ouerplante geïnisieer. Hierdie plante sou verskeie weerstandsgeentranslokasies in verskillende kombinasies bevat. Molekulêre merkers wat vir die onderskeie translokasies spesifiek is, is gebruik om die plante te tipeer.

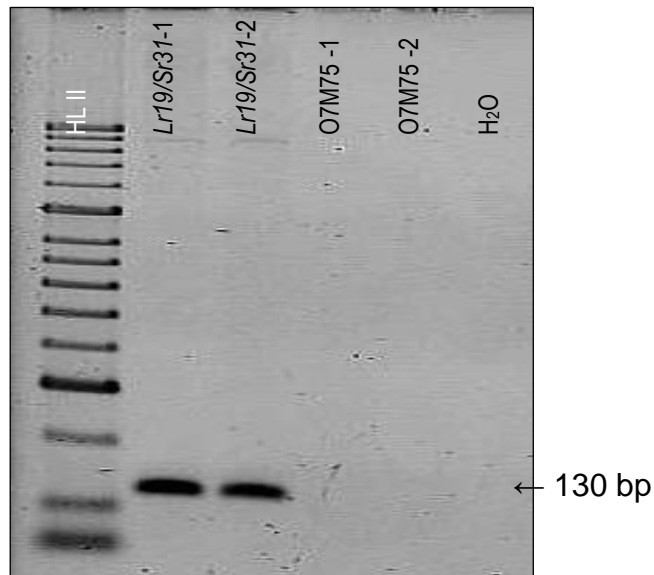
4.1.1 Genomiese DNS ekstraksie vanuit ouerplante

Hoë kwaliteit, nie-gedegradeerde DNS met 'n gemiddelde konsentrasie van 1500 ng/ μ l is deurgaans geëkstraer.

4.1.2 Optimisering van molekulêre merkers

(a) Lr19: STSLr19₁₃₀

Die merker vir *Lr19* – STSLr19₁₃₀ – is vir gebruik in hierdie studie geoptimeer. Vir hierdie doel is die twee ouerplante (*Lr19/Sr31-1* en *Lr19/Sr31-2*) wat die *Lr19-149-299* translokasie bevat as positiewe kontroles gebruik, terwyl die twee ouerplante (07M75-1 en 07M75-2) wat oor die *Lr54/Yr37* translokasie beskik as negatiewe kontroles gedien het. Die toets het dus ter selfde tyd as bevestiging van die teenwoordigheid van die translokasies in die ouerplante gedien. 'n Fragment van 130 bp dui die teenwoordigheid van die translokasie aan. Resultate word in Fig. 4.1 aangedui.

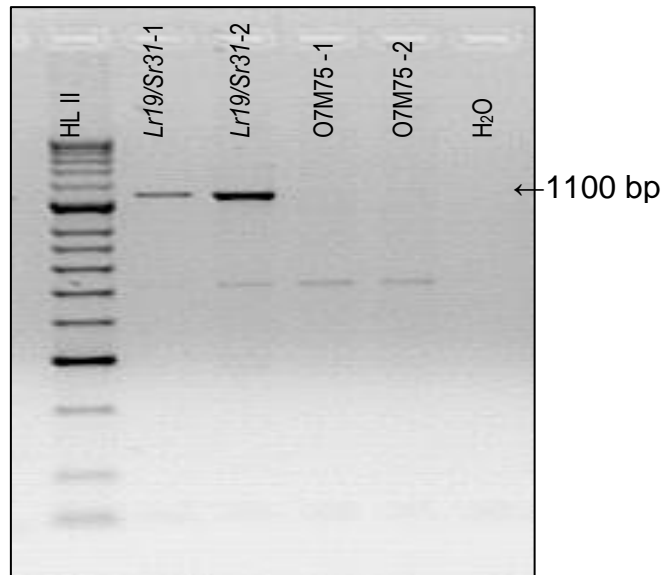


Figuur 4.1 Optimisering van STSLr19₁₃₀, molekulêre merker vir *Lr19*.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-3:** Positiewe kontroles;
L4-6: Negatiewe kontroles

Bostaande figuur bevestig die teenwoordigheid van *Lr19* in die twee *Lr19/Sr31* ouerplante. Die merker amplifiseer nie in die O7M75 plante nie, wat daarop dui dat dit polimorfies is. Geen amplifikasie is in laan 6 (wat geen DNS bevat nie) sigbaar nie, wat daarop dui dat kontaminasie nie die resultate beïnvloed het nie.

(b) Sr31: *iag95*

Dieselfde kontroles as wat vir STSLr19₁₃₀ gebruik is, is hier gebruik om *iag95* te optimiseer. Hierdie merker amplifiseer 'n fragment van 1100 bp. Die resultate word in Fig. 4.2 aangedui.

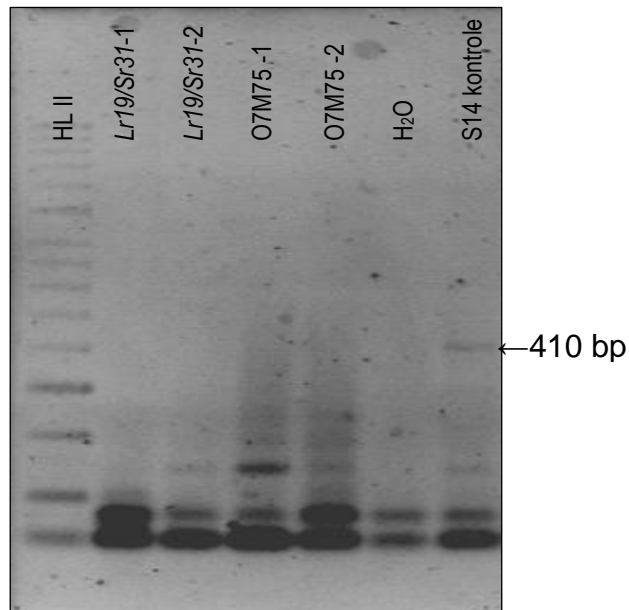


Figuur 4.2 Optimisering van *iag95*, molekulêre merker vir *Sr31*.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-3:** Positiewe kontroles;
L4-6: Negatiewe kontroles

Dit is duidelik dat die merker die korrekte fragment (1100 bp) amplifiseer. Die teenwoordigheid van *Sr31* in die *Lr19/Sr31* ouerplante word dus ook hiermee bevestig. Daar is minimale agtergrond op die foto sigbaar. Hierdie agtergrond sal egter nie die tipering van toetsplante belemmer nie, aangesien die fragmentgrootte verskil van dié van die fragment van belang. Die negatiewe kontroles toon geen amplifikasie van die fragment nie en daar is geen kontaminasie teenwoordig nie.

(c) *Lr54/Yr37: SCAR₄₁₀*

Vir die optimisering van *Lr54/Yr37* is weereens dieselfde kontroles as vir *Lr19* en *Sr31* gebruik. In hierdie geval was die twee *Lr19/Sr31* plante egter die twee negatiewe kontroles, terwyl die twee *O7M75* plante as die positiewe kontroles gebruik is. Die optimisering van die merker dien dus ook as bevestiging van die teenwoordigheid van die translokasie in laasgenoemde twee plante. In die geval van 'n positiewe plant, behoort 'n fragment van 410 bp te amplifiseer. Die resultate word in Fig. 4.3 aangedui.

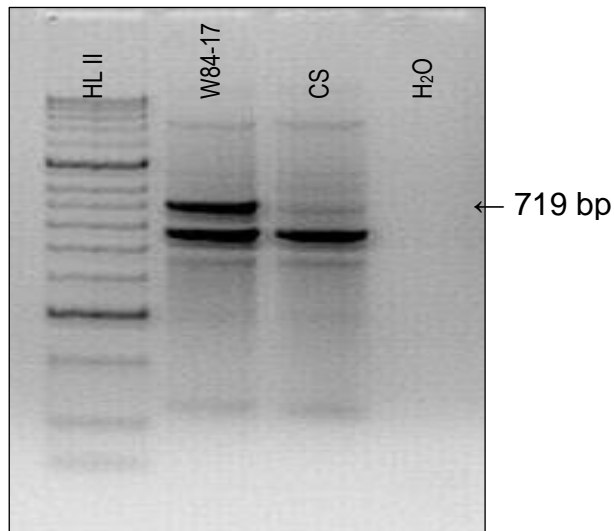


Figuur 4.3 Optimisering van SCAR₄₁₀, molekulêre merker vir *Lr54/Yr37*.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-3:** Positiewe kontroles;
L4-6: Negatiewe kontroles; **L7:** Positiewe kontrole vir S14

In 'n verrassende onthulling het dit aan die lig gekom dat geeneen van die ouers – insluitend die twee 07M75 ouers – *Lr54/Yr37* bevat nie. 'n Positiewe kontrole vir hierdie geen, 'n CS-S14 hemisigoot (“Chinese Spring” monotelodisomies 2DS-2D^{Transloc}), is by die PCR-reaksie gevoeg en die toets is 'n verdere twee maal herhaal, met dieselfde resultate. In die kontrole is egter wel 'n fragment van 410 bp waargeneem, wat daarop dui dat die PCR-reaksie suksesvol was.

(d) Sr24/Lr24: SCS73₇₁₉

Vir die optimisering van, sowel as die daaropvolgende tipering met die merker vir *Sr24/Lr24* is “W84-17” as positiewe- en “CS” as negatiewe kontrole gebruik. Die fragment van belang is 719 bp groot.

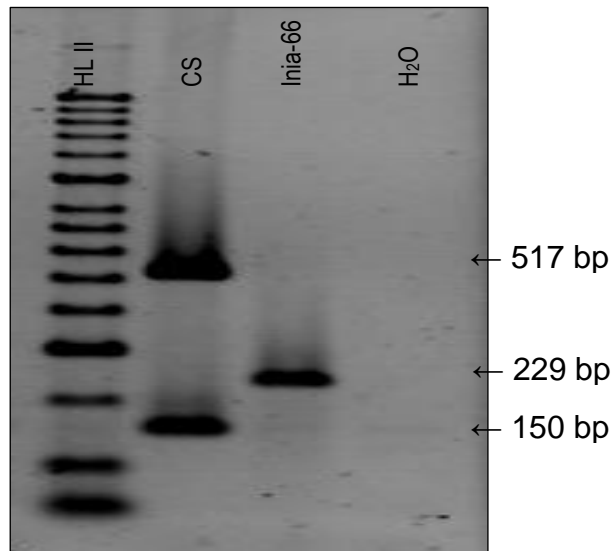


Figuur 4.4 Optimisering van SCS73719, molekulêre merker vir *Sr24/Lr24*.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2:** Positiewe kontrole;
L3-4: Negatiewe kontroles

Die verwagte fragment (719 bp) word in die positiewe kontrole geamplifiseer en is afwesig in die negatiewe kontrole. 'n Tweede bandjie van ongeveer 550 bp word in beide die positiewe en negatiewe kontroles waargeneem. Hierdie bandjie beïnvloed egter nie die vermoë van die merker om tussen positiewe en negatiewe plante te onderskei nie. Geen kontaminasie kan in laan 4 waargeneem word nie. Die merker is dus gereed vir gebruik.

(e) *Lr34/Yr18: csLV34*

Die kodominante merker, *csLV34*, vir *Lr34/Yr18* amplifiseer 'n fragment van 229 bp in die geval van negatiewe monsters en 'n fragment van 150 bp indien die monster positief is. Die geenspesifieke merker, *cssfr1*, wat saam met *csLV34* in 'n multipleksreaksie gebruik word, amplifiseer 'n 517 bp fragment in positiewe monsters. "CS" word as positiewe kontrole gebruik terwyl "Inia-66" as negatiewe kontrole gebruik word.

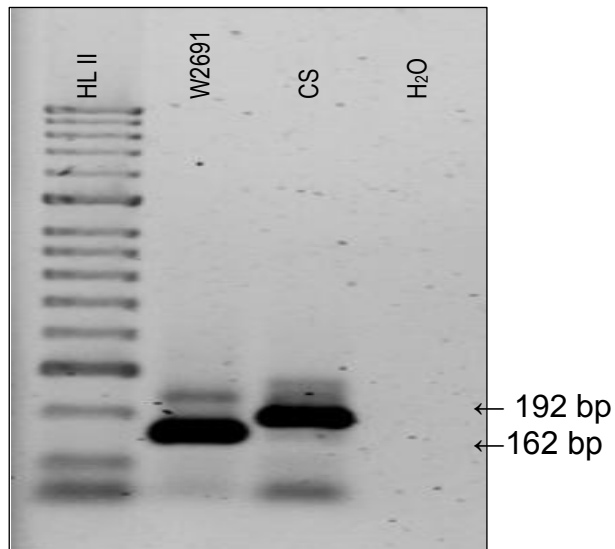


Figuur 4.5 Optimisering van *csLV34* en *cssfr1*, molekulêre merkers vir *Lr34/Yr18*.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2:** Positiewe kontrole;
L3-4: Negatiewe kontroles

Beide die 150 bp en die 517 bp bandjies kan in die positiewe kontrole waargeneem word, terwyl die negatiewe kontrole slegs die 229 bp bandjie toon. Geen kontaminasie is teenwoordig nie. Die merker kan dus voortaan in siftingseksperimente aangewend word.

(f) Sr36: *stm773*

Stm773 amplifiseer 'n fragment van 162 bp in die aanwesigheid van *Sr36* en 192 bp in die afwesigheid daarvan. "W2691" word as positiewe kontrole gebruik. Die negatiewe kontrole is "CS".

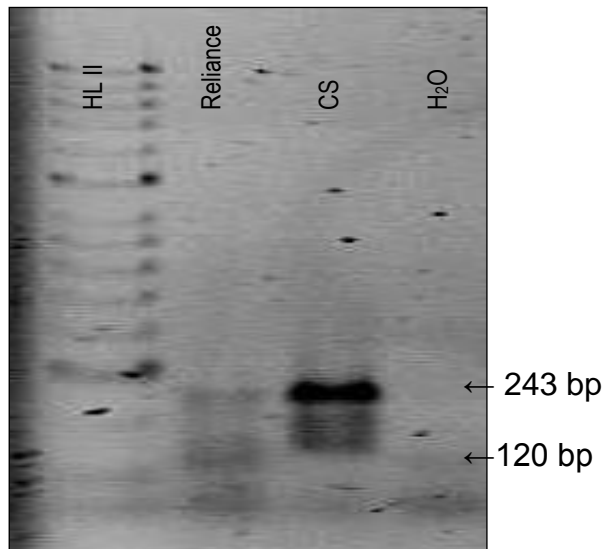


Figuur 4.6 Optimisering van *stm773*, molekulêre merker vir *Sr36*.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2:** Positiewe kontrole;
L3-4: Negatiewe kontroles

Die korrekte bandjies kan in die onderskeie kontroles waargeneem word. Die lengte van elektroforese is hier 'n belangrike faktor, aangesien die groottes van die positiewe en negatiewe fragmente met slegs dertig basispare verskil. Genoeg elektroforese tyd moet dus toegelaat word sodat daar duidelik tussen positiewe en negatiewe plante onderskei kan word. Geen fragmente is in laan 4 geamplifiseer nie, wat dui op die afwesigheid van kontaminasie. Die merker kan dus voortaan as diagnostiese kodominante merker gebruik word.

(g) *Sr2*: *X3B028F08* en *gwm533*

Merker *X3B028F08* amplifiseer 'n fragment van 243 bp in plante waar *Sr2* afwesig is, terwyl *gwm533* 'n 120 bp fragment in *Sr2* positiewe plante amplifiseer. Die positiewe kontrole wat in hierdie geval gebruik is, is "Reliance", terwyl "CS" as negatiewe kontrole aangewend word.

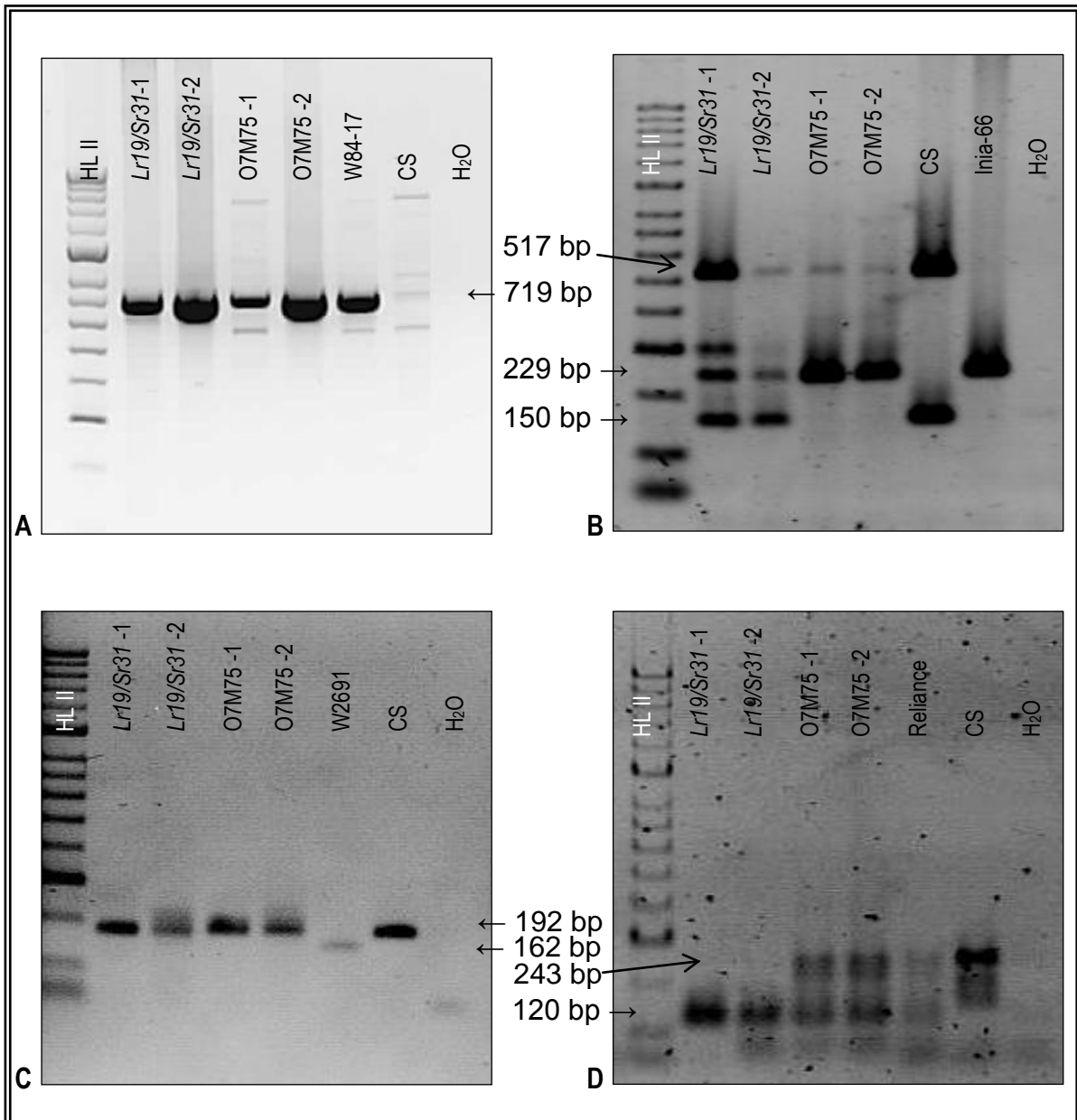


Figuur 4.7 Optimisering van X3B028F08 en *gwm533*, molekulêre merkers vir *Sr2*.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2:** Positiewe kontrole;
L3-4: Negatiewe kontroles

Hoewel nie baie duidelik nie, word die korrekte grootte fragment (120 bp) in die positiewe kontrole geamplifiseer. In die negatiewe kontrole word die 243 bp fragment waargeneem. 'n Fragment van 243 bp word ook in die positiewe kontrole opgemerk, wat daarop dui dat "Reliance" heterosigoties is vir *Sr2*. Soos in die geval van *Sr36*, moet genoeg tyd toegelaat word vir elektroforese, om sodoende voldoende skeiding van die bandjies te verseker, vernaam in die geval van heterosigote.

4.1.3 Tipering van ouerplante met molekulêre merkers vir addisionele gene

Die vier ouerplante is vir die vier onderskeie addisionele gene getipeer. Resultate word in Fig. 4.8 aangetoon. Vir *Lr34/Yr18* is die ouerplante sowel as alle verdere geselekteerde plante aanvanklik met die merker *csLV34* getipeer. Ná die ontwikkeling van die geenspesifieke merker, *cssfr1*, is hierdie tipering herhaal met insluiting van laasgenoemde merker in 'n multipleksreaksie. Die tweede tipering het telkens die resultate van die eerste tipering bevestig. Slegs die foto's van die tweede tipering word deurgaans gegee.



Figuur 4.8 Tipering van oerplante vir addisionele gene.

A: Tipering vir *Lr24/Sr24*; **B:** Tipering vir *Lr34/Yr18*; **C:** Tipering vir *Sr36*; **D:** Tipering vir *Sr2*.

In alle figure is die volgorde van die monsters as volg: **L1:** Hyperladder II molekulêre massa merker;

L2-5: Oerplante soos aangedui; **L6:** Positiewe kontrole; **L7-8:** Negatiewe kontroles

Die foto's toon aan dat al vier die oerplante *Lr24/Sr24* bevat. Beide die twee ouers wat *Lr19* en *Sr31* bevat, toets positief vir *Lr34/Yr18*. Hierdie plante is heterosigoties vir die translokasie, aangesien daar ook 'n fragment van 229 bp geamplifiseer het. Geen van die 07M75 ouers bevat *Lr34/Yr18* nie. Hoewel daar 'n ligte bandjie van 517 bp geamplifiseer het, toon die csLV34 merker dat hierdie plante negatief toets, aangesien daar nie 'n fragment van 150 bp geamplifiseer het nie. Geen van die oerplante besit *Sr36* nie. Beide die twee *Lr19/Sr31* ouers bevat *Sr2* in die

homosigotiese toestand, aangesien 'n fragment van 120 bp geamplifiseer het. Die twee 07M75 ouers bevat *Sr2* in die heterosigotiese toestand, aangesien twee fragmente van 120 bp en 243 bp onderskeidelik geamplifiseer het. Aangesien *Sr2* 'n resessiewe geen is, sal hierdie plante dus nie uitdrukking van die geen toon nie.

4.1.4 Maak van eerste generasie kruisings en die tipering van die nageslag

Die twee 07M75 plante (telkens as vroulike ouers) is in al vier moontlike kombinasies met die twee *Lr19/Sr31* plante gekruis. 'n Kruisingsnommer, 07M81, is aan die nageslag toegeken. Die hoeveelheid saad wat vanaf elke kruising verhaal is, is as volg: 07M75-1 // *Lr19/Sr31*-1: 25 pitte; 07M75-1 // *Lr19/Sr31*-2: 27 pitte; 07M75-2 // *Lr19/Sr31*-1: 30 pitte; 07M75-2 // *Lr19/Sr31*-2: 29 pitte. Die nageslag is vir *Lr19* en *Sr31* getipeer. Die resultate word in Tabel 4.1 aangedui.

Tabel 4.1 Opsomming van tipering van 07M81 vir *Lr19* en *Sr31*.

Kruising	Hoeveelheid positief vir <i>Lr19</i>	Hoeveelheid positief vir <i>Sr31</i>	Hoeveelheid positief vir <i>Lr19</i> en <i>Sr31</i>
07M75-1 // <i>Lr19/Sr31</i> -1	3 (12%)	6 (24%)	1 (4%)
07M75-1 // <i>Lr19/Sr31</i> -2	6 (22%)	27 (100%)	6 (22%)
07M75-2 // <i>Lr19/Sr31</i> -1	0 (0%)	10 (33%)	0 (0%)
07M75-2 // <i>Lr19/Sr31</i> -2	2 (7%)	14 (48%)	0 (0%)
Totaal	11 (10%)	57 (51%)	7 (6 %)

Vanuit bogenoemde tabel is dit duidelik dat *Sr31* in 'n groter frekwensie in die nageslag teenwoordig is as *Lr19*. Die lae frekwensie oordrag van *Lr19* na die nageslag het die hoeveelheid plante wat vir verdere kruisings geselekteer is, beperk. Dit is nie ongewoon dat translokasies vanaf wilde spesies nie die Mendeliese oorerwingswette gehoorsaam nie. Die graad van segregasie distorsie word tot 'n groot mate deur faktore in die genetiese agtergrond waarin die translokasie beskikbaar is, beïnvloed. 'n Voorbeeld hiervan is die segregasie distorsie lokus, *Sd1*, wat proksimaal van die *Lr19* translokasie gekarteer is (Zhang & Dvořák, 1990). Verder blyk dit dat die geslag van die ouerplant ook dikwels veroorsaak dat 'n

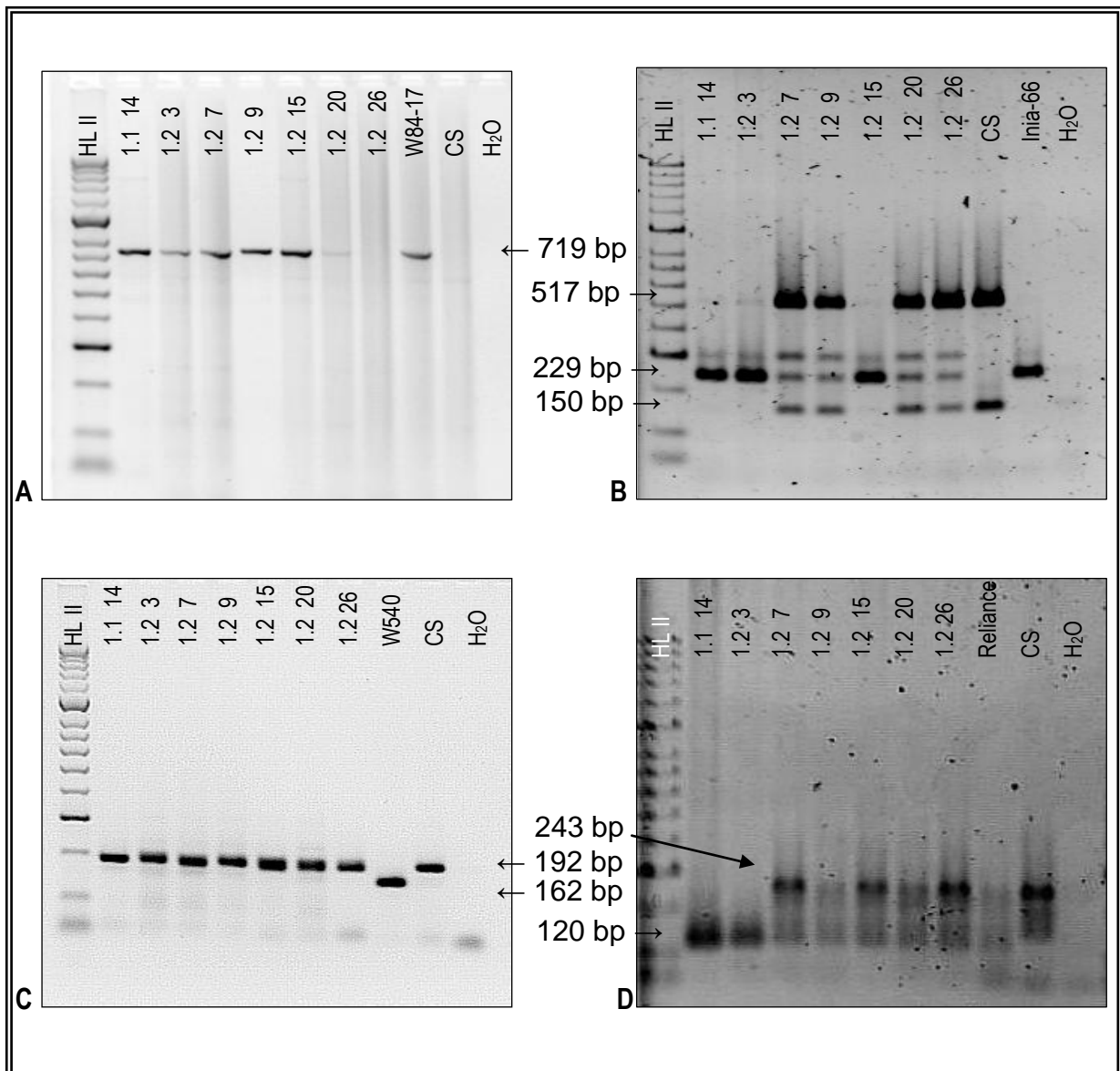
translokasie voorkeuroordrag of selfeliminatie kan toon (Marais *et al.*, 2001). Chromosoomsegmente wat segregasie distorsie veroorsaak is onder meer vanaf *Thinopyrum ponticum* (Sharma & Knott, 1966), *Aegilops kotschyi* (Marais *et al.*, 2005) en *Aegilops sharonensis* (Marais *et al.*, 2006) na koring oorgedra.

Die verhouding $Lr19^+$: $Lr19^-$ plante in die 07M81 nageslag in hierdie studie was 0.11:1. 'n Chi-kwadraat analise toon dat dit betekenisvol laer as die verwagte 1:1 verhouding is ($P < 0.01$). Dit is waarskynlik omdat $Lr19$ deur die manlike ouer bygedra is. Marais *et al.* (2001) het die oordrag van die verkorte vorm van $Lr19$ ($Lr19-149-299$) in manlike- en vroulike gamete ondersoek. Hoewel die verkorte vorm van $Lr19$ die $Sd1$ lokus verloor het, blyk dit dat 'n tweede lokus, $Sd2$, steeds segregasie distorsie in die nageslag veroorsaak het. Die groep het 'n ratio van 0.33:1 ($Lr19^+$: $Lr19^-$) gerapporteer waar $Lr19$ deur die manlike ouer bygedra is. Dit het beduidend afgewyk van die verwagte 1:1 verhouding en die groep het vervolgens afgelei dat die $Lr19-149-299$ translokasie dikwels self-eliminatie in heterosigote ten toon stel wanneer dit deur die stuifmeel oorgedra word. In 'n soortgelyke geenstapelings studie, het Sydenham (2007) ook 'n betekenisvol laer frekwensie plante wat $Lr19$ bevat (0.56:1) in die nageslag waargeneem met die $Lr19-149-299$ translokasie, soos ook aangewend tydens die studie, waar $Lr19$ in die manlike ouer teenwoordig was. Segregasie distorsie bemoeilik dus die gebruik van hierdie translokasie in teelprogramme, aangesien dit moeilik is om die frekwensie $Lr19^+$ plante in die nageslag te voorspel (Marais *et al.*, 2001).

Die waargenome frekwensie $Sr31^+$ plante in die nageslag (51.35%) verskil nie betekenisvol van die verwagte frekwensie (50%) nie ($P = 0.78$). Die verwagte waarskynlikheid om die kombinasie van $Lr19$ en $Sr31$ in die nageslag te verhaal, is 0.25%. Die waargenome frekwensie (6%) is egter betekenisvol laer ($P < 0.0001$). Dit kan aan die lae frekwensie plante wat $Lr19$ bevat toegeskryf word.

Die sewe plante wat positief vir beide $Lr19$ en $Sr31$ getoets het, is geselekteer en verder getipeer vir die addisionele gene. Vyf uit die sewe plante het positief getoets vir $Lr24/Sr24$, terwyl vier plante heterosigoties was vir $Lr34/Yr18$. Geen van die plante het positief getoets vir $Sr36$ nie. Twee van die plante – 07M81-1.1-14 en 07M81-1.2-3 is homosigoties vir $Sr2$ en sal dus uitdrukking van die geen toon. Die

ander plante is elk heterosigoties vir hierdie geen en sal dus nie uitdrukking toon nie (Fig. 4.9).



Figuur 4.9 Tipping van geselekteerde 07M81 plante vir addisionele gene.

A: Tipping vir *Lr24/Sr24*; **B:** Tipping vir *Lr34/Yr18*; **C:** Tipping vir *Sr36*; **D:** Tipping vir *S2*.

In alle figure is die volgorde van die monsters as volg: **L1:** Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-8:** Geselekteerde 07M81 plante soos aangedui; **L9:** Positiewe kontrole; **L10-11:** Negatiewe kontroles

Die resultate van die tipping van die geselekteerde 07M81 plante word in Tabel 4.2 uiteengesit. Die plante is nie vir *Lr54/Yr37* getipeer nie, aangesien geen van die ouers hierdie geen bevat het nie.

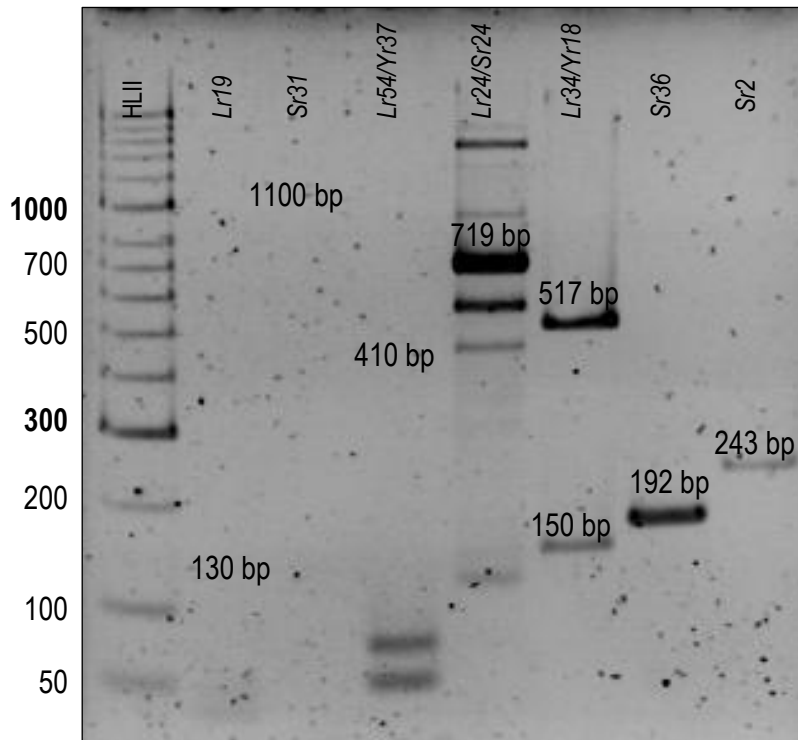
Tabel 4.2 Opsomming van gene waaroor die geselekteerde 07M81 plante beskik.

07M81 plante	<i>Lr19</i>	<i>Sr31</i>	<i>Lr54/Yr37</i>	<i>Lr24/Sr24</i>	<i>Lr34/Yr18</i>	<i>Sr36</i>	<i>Sr2</i>
1.1-14	1	1	0	1	0	0	1
1.2-3	1	1	0	1	0	0	1
1.2-7	1	1	0	1	1	0	1
1.2-9	1	1	0	1	1	0	1
1.2-15	1	1	0	1	0	0	1
1.2-20	1	1	0	0	1	0	1
1.2-26	1	1	0	0	1	0	1

Twee plante, 07M81-1.2-7 en 07M81-1.2-9, het elk vyf van die weerstandsgenetranslokasies bevat. Hierdie plante het dus die mees ideale geenkombinasies en sou prioriteit geniet tydens die maak van die volgende generasie kruisings.

4.1.5 Tipering van 2007-US-063 met molekulêre merkers

Die manlike ouer wat in die tweede generasie kruisings gebruik is, 2007-US-063, is vir *Lr19*, *Sr31* en *Lr54/Yr37*, asook die addisionele gene getipeer (Fig. 4.10).



Figuur 4.10 Tipering van lyn 2007-US-063 met molekulêre merkers. **L1:** Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2:** *Lr19*; **L3:** *Sr31*; **L4:** *Lr54/Yr37*; **L5:** *Lr24/Sr24*; **L6:** *Lr34/Yr18*; **L7:** *Sr36*; **L8:** *Sr2*.

Resultate toon dat *Lr19* (130 bp), *Sr31* (1100 bp), *Lr54/Yr18* (410 bp), *Sr36* (162 bp) en *Sr2* (120 bp) afwesig is in die genotipe van die lyn, maar dat *Lr24/Sr24* (719 bp) en *Lr34/Yr18* (150 bp & 517 bp) wel aanwesig is. Dit verhoog dus die waarskynlikheid dat laasgenoemde twee translokasies in die F₂-nageslag teenwoordig sal wees. Die nageslag en enige daaropvolgende generasies is nie verder vir *Lr54/Yr37* of *Sr36* getipeer nie, aangesien geen van die 07M81 of 2007-US-063 plante oor hierdie translokasies beskik het nie.

4.1.6 Kruising van geselekteerde 07M81 plante met 2007-US-063 en tipering van nageslag

Die sewe 07M81 plante is met 2007-US-063 gekruis. 'n Kruisingsnommer, 07M82, is aan die F₁-nageslag toegeken. Kruisings met drie van die plante (07M81-1.1-14, 07M81-1.2-20 en 07M81-1.2-26) was nie suksesvol nie. Daar is in totaal sewe kruisings van die oorblywende vier plante gemaak. Die hoeveelheid saad wat van elke kruising verhaal is, is as volg: 07M82-3 (kruising 1): 33 pitte; 07M82-3 (kruising

2): 25 pitte; 07M82-7: 31 pitte; 07M82-9 (kruising 1): 11 pitte; 07M82-9 (kruising 2): 19 pitte; 07M82-15 (kruising 1): 20 pitte; 07M82-15 (kruising 2): 20 pitte. Die 07M82 groep bestaan dus uit 159 pitte, wat na gDNS ekstraksie vir *Lr19* en *Sr31* getipeer is. Die resultate van die tipering word in Tabel 4.3 uiteengesit.

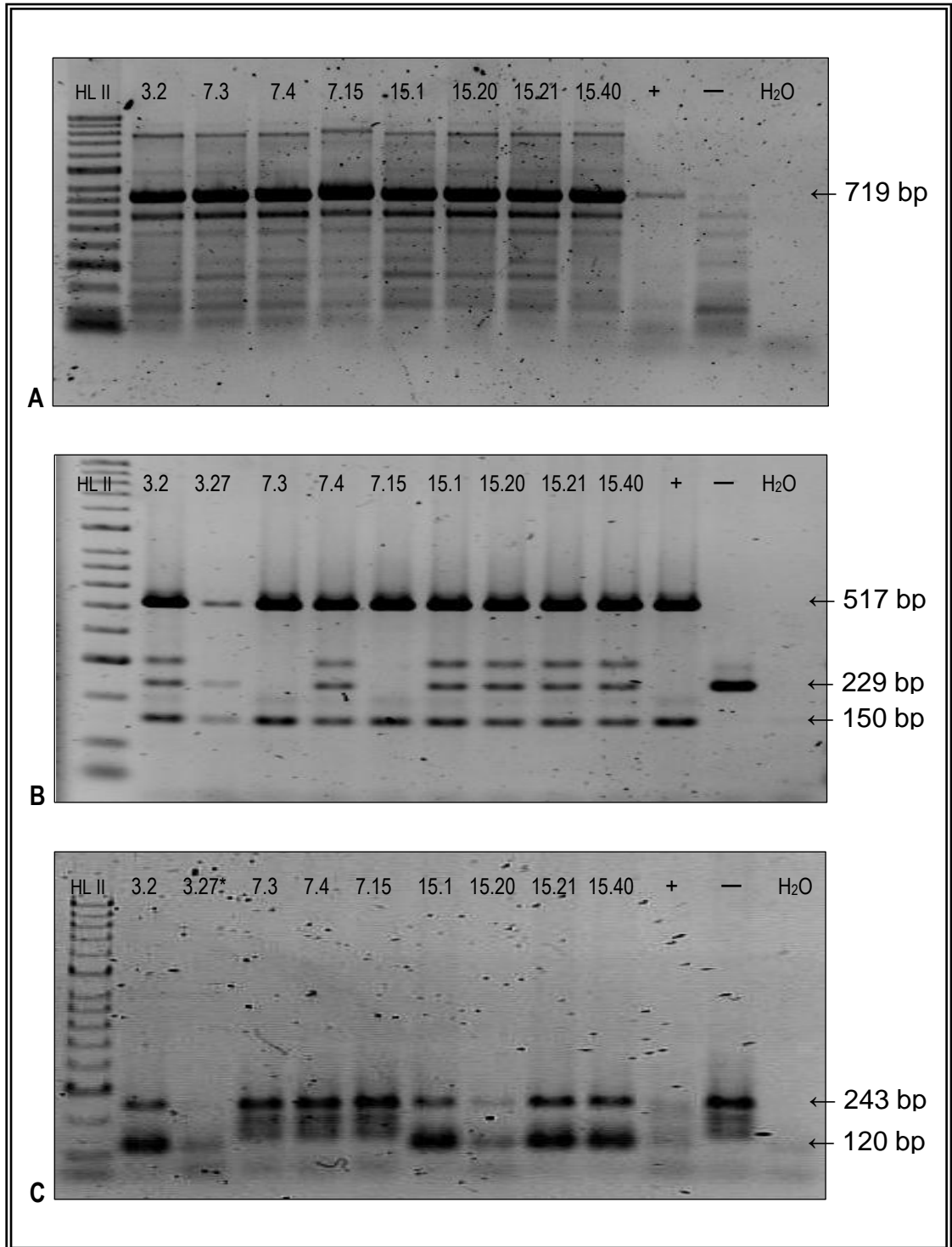
Tabel 4.3 Opsomming van tipering van 07M82 vir *Lr19* en *Sr31*.

Ouerlyn	Hoeveelheid positief vir <i>Lr19</i>	Hoeveelheid positief vir <i>Sr31</i>	Hoeveelheid positief vir <i>Lr19</i> en <i>Sr31</i>
07M82-3 (kruising 1)	15 (46%)	14 (42%)	1 (3%)
07M82-3 (kruising 2)	12 (48%)	5 (20%)	0 (0%)
07M82-7	10 (32%)	13 (42%)	3 (10%)
07M82-9 (kruising 1)	11 (100%)	2 (18%)	0 (0%)
07M82-9 (kruising 2)	0 (0%)	9 (47%)	0 (0%)
07M82-15 (kruising 1)	9 (45%)	9 (45%)	2 (10%)
07M82-15 (kruising 2)	9 (45%)	8 (40%)	2 (10%)
Totaal	66 (42%)	60 (38%)	8 (5%)

Na afloop van die tipering is agt 07M82 plante wat vir beide *Lr19* en *Sr31* positief was geselekteer. 'n Chi-kwadraat analise toon dat *Lr19* in hierdie geval die verwagte segregasie verhouding van 1:1 gehoorsaam. In hierdie populasie plante wyk die *Sr31* segregasie verhouding egter betekenisvol van die verwagte 1:1 verhouding af ($P = 0.002$). Daar is 'n groter frekwensie vatbare plante (62%) waargeneem as die verwagte 50%. Die hoeveelheid plante wat beide *Lr19* en *Sr31* bevat het, is weer betekenisvol laer as die verwagte frekwensie ($P < 0.0001$).

Die geselekteerde *Lr19*⁺/*Sr31*⁺ plante is voorts vir die addisionele gene getipeer. Plant 07M82-3.27 is later geïdentifiseer om ook *Lr19*⁺/*Sr31*⁺ positief te wees. Dit is met die tweede tipering vir *Lr34/Yr18* en ook met die tipering vir *Sr2* by die populasie ingesluit en is positief vir beide hierdie translokasies. Alle plante beskik oor *Lr24/Sr24* en *Lr34/Yr18*. Ses plante, 07M82-3.2, -3.27, -15.1, -15.20, -15.21 en -15.40 besit *Sr2*. Plant 07M82-3.27 is homosigoties vir laasgenoemde translokasie (Fig. 4.11). Die heterogene kruisingspopulasie wat ontwikkel is, bestaan oplaas dus uit nege

plante wat elk twee hoofgene – *Lr19* en *Sr31* – en twee of drie addisionele gene – *Lr24/Sr24*, *Lr34/Yr18* en *Sr2* – besit. Hierdie nege plante is voorts gebruik vir die ontwikkeling van 'n ingeteelde populasie met behulp van die VH tegniek.



Figuur 4.11 Tipering van geselekteerde 07M82 plante met *Lr24/Sr24* en *Lr34/Yr18*.

A: Tipering vir *Lr24/Sr24*; **B:** Tipering vir *Lr34/Yr18*; **C:** Tipering vir *Sr2*.

In **figuur A** is die volgorde van die monsters as volg: **L1:** Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-9:** Geselekteerde 07M82 plante soos aangedui; **L10:** Positiewe kontrole; **L11-12:** Negatiewe kontroles.

In **figuur B & C** is die volgorde van die monsters as volg: **L1:** Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-10:** Geselekteerde 07M82 plante soos aangedui; **L11:** Positiewe kontrole; **L12-13:** Negatiewe kontroles.

4.2 Ontwikkeling van ingeteelde lyne

4.2.1 Identifisering van plante geskik vir gebruik in VH ontwikkeling

Die agt⁵ geselekteerde 07M82 plante is selfbestuif, waarna die F₂: 07M82 vir die ontwikkeling van verdubbelde haploïede aangewend sou word. Die F₂-nageslag word dikwels bo die F₁-nageslag verkies vir die produksie van VH. Hoewel VH produksie vanaf die F₂-nageslag langer neem as wanneer die F₁-generasie gebruik word, word dit beskou as 'n meer effektiewe sisteem, aangesien daar meer geleenthede vir rekombinasie tussen die ouergenome geskep word. Sodoende word die hoeveelheid koppelings-disekwilibrium wat moontlik in die populasie teenwoordig is, verlaag. 'n Verdere voordeel van die F₂-sisteem is dat daar vir beide hoofgene en kwantitatiewe eienskappe geselekteer kan word voordat die geenkombinasies fikseer word. Die hoeveelheid plante wat in die F₂-generasie vir 'n bepaalde kenmerk segregeer nadat seleksie in die F₁-generasie toegepas is, sal meer wees as die hoeveelheid plante wat vir dieselfde kenmerk in die F₁-generasie segregeer. Deur die F₂-generasie te gebruik, word die hoeveelheid plante as beginmateriaal vir VH produksie dus verhoog. (Hu, 1997)

Drie van die agt 07M82 plante het geen nageslag geproduseer nie. Daar was dus vyf families (07M82-3.2, 07M82-7.4, 07M82-7.15, 07M82-15.20 en 07M82-15.21) beskikbaar vir verdere gebruik. Die nageslag is geplant en saailing roestoetse met 'n seleksie blaarroesrasse (UVPrt8, UVPrt9 en UVPrt13) en stamroesrasse (UVPgt54, UVPgt55 en UVPgt56) is daarop uitgevoer. Eenhonderd en vyftien (uit 232) plante is as baie bestand (IT = ;), bestand (IT = 1) of matig bestand/matig vatbaar (IT = 2) geklassifiseer (Tabel 4.4).

⁵ Plant 07M82-3.27 (die negende plant) is later geïdentifiseer en is eers by die tweede VH poging ingesluit (sien 4.2.3).

Tabel 4.4 Resultate van saailing roestoetse.

Infeksietipe	07M82-3.2	07M82-7.4	07M82-7.15	07M82-15.20	07M82-15.21	Totaal
0	11	2	6	20	1	40
;	5	0	11	7	4	27
Blaarroes: ; ^a Stamroes: 1	2	7	13	1	9	32
1	7	5	2	4	11	29
2	3	2	4	3	6	18
Blaarroes: 1 ^a Stamroes: 2	1	0	2	1	1	5
Blaarroes: ; ^a Stamroes: 2	0	3	0	0	1	4
3	10	4	4	2	4	24
4	10	6	15	10	12	53
Totaal	59	29	57	48	49	232

Getalle word per familie per infeksietipe aangegee. Die geskakeerde area dui die subgroep plante wat geselekteer is, aan.

^aIn sommige gevalle het die plant verskillende reaksies vir blaar- en stamroes getoon.

Genomiese DNS is van elk van hierdie subgroep plante geëkstraer⁶ en die populasie is vir *Lr19⁺* en *Sr31⁺* plante geselekteer. Daar is in totaal 92 plante (met verteenwoordigers uit elk van die 5 families) geïdentifiseer wat beide hierdie gene bevat en wat voorts vir VH ontwikkeling gebruik is. Die 23 plante wat (na die roestoetse) geselekteer is, maar nie 'n weerstandsgeen besit nie, het moontlik aan roesinfeksie van een van die twee tipes ontsnap. In meeste van hierdie gevalle het die plant wel óf 'n blaarroes- óf 'n stamroesweerstandsgeen besit.

4.2.2 Eerste poging vir VH ontwikkeling

Weens 'n tekort aan mielie-stuifmeel kon slegs 33 are⁷ bestuif word. Daar is 'n totale hoeveelheid van 1051 blommetjies bestuif. Sewehonderd nege en dertig sade het ontwikkel, waarvan 622 sade groen en 116 wit was. Eenhonderd vier en tagtig

⁶ Individuele plante is van mekaar onderskei met behulp van 'n unieke kode. Dit het bestaan uit die nommer van die familie waaraan die plant behoort, gevolg deur 'n tweede syfer agtervoegsel, bv. 3.2-1, 3.2-2, ens.

⁷ Waar meer as een are op 'n plant bestuif is, is die individuele are aangedui deur 'n nommer in hakies agter die kode van die plant, bv. 3.2-1 (2).

embrios is gered. Hiervan het 37 groei (wortels en in sommige gevalle ook stingels) getoon, waarvan daar uiteindelik slegs 11 in grond uitgeplant is.

Tabel 4.5 Resultate van eerste poging vir VH ontwikkeling.

	07M82	07M82	07M82	07M82	07M82	Totaal
	-3.2	-7.4	-7.15	-15.20	-15.21	
Persentasie sade ontwikkel	94.78	95.45	92.45	81.55	84.16	86.50
Persentasie wit/groen sade	4.10	0.00	50.00	23.53	29.43	77.62
Persentasie embrios per sade ontwikkel	44.88	14.29	25.51	21.43	19.80	25.58
Persentasie embrios per groen sade	46.72	14.29	26.32	26.47	25.63	27.07
Persentasie embrios per blommetjies bestuif	42.54	13.64	23.58	17.48	16.67	23.30
Persentasie plantjies per embrio's	5.26	0.00	16.00	0.00	0.00	6.83
Persentasie plantjies per blommetjies bestuif	2.24	0.00	3.77	0.00	0.82	1.63
Persentasie plantjies per groen sade	2.46	0.00	4.21	0.00	0.00	1.85

Chromosoomtellings van hierdie plante is gedoen om die haploïede status daarvan te bevestig. Al die plante het slegs 21 chromosome gehad en was dus haploïed (Fig. 4.12).



Figuur 4.12 Bevestiging van haploïedie in plant 7.15-26 (2).

Die plantjies het egter nie optimaal gegroei nie. Dit het vroeg tydens ontwikkeling reeds 'n aar op 'n enkele stingel geproduseer en nie gestoel nie (Fig. 4.13).

Kolgisienbehandeling kon om hierdie rede nie toegedien word nie en die ontwikkeling van haploïede was dus onsuksesvol.



Figuur 4.13 Haploïede plantjies wat onvoldoende groei toon.

Die persentasie embryos per blommetjies bestuif wat hier verhaal is (23.30%) vergelyk goed met dié van ander studies. In 'n studie waar die invloed van mieliegenotipes op die produksie van VH ondersoek is, is persentasies tussen 17 en 36% gerapporteer (Matzk & Mahn, 1994). Niroula *et al.* (2007) het in 'n soortgelyke studie 5.17-21.45% aangeteken, terwyl Verma *et al.* (1999) persentasies tussen 8.4 en 10.2% vir verskillende koring-genotipes aangeteken het. Die embriovormingsfrekwensie van 40.7-51.4% soos aangeteken deur Laurie & Reymondie (1991) en 31.6-35.9% deur Lesch (1997) was daarteenoor hoër as die frekwensie hier gerapporteer. Laasgenoemde studie is in Suid-Afrika uitgevoer as deel van die ontwikkeling van die VH protokol soos wat hier gebruik word. Die kultivar "SST55" is vir die eksperimente gebruik. In teenstelling met die embriovormingsfrekwensie, is die persentasie plantjies per blommetjies bestuif (1.63%) merkbaar laer as ander studies. Persentasies van 0.96-10.15% deur Niroula *et al.* (2007), 64.3-43.2% deur Lesch (1997) en 34.5-50.3% deur Sharma *et al.* (2005) is aangeteken. Daar is verskeie faktore wat 'n bydrae tot die sukses van VH ontwikkeling lewer. Enige van hierdie faktore (of 'n kombinasie van faktore) kon hier vir die swak resultate verantwoordelik wees.

Die tydsberekening van bestuiwing is die eerste kritiese faktor in die proses van VH ontwikkeling. Suenaga (1994) het bevind dat die frekwensie van embryo-ontwikkeling die hoogste is wanneer koring op die dag van stuifmeelstorting bestuif word. Geen beduidende verskil in embryo-frekwensie is waargeneem in gevalle waar die plante twee dae voor of twee dae na stuifmeelstorting bestuif is nie. Daarteenoor is die frekwensie embryos beduidend laer waar bestuiwing drie dae voor of 4-6 dae na stuifmeelstorting plaasgevind het. Vir hierdie poging was die beskikbaarheid van stuifmeel 'n beperkende faktor. Die mielies is te laat geplant, wat meegebring het dat die koring gereed was vir bestuiwing voordat daar stuifmeel beskikbaar was. Aangesien die poging in die wintermaande uitgevoer is, het die lae temperature boonop veroorsaak dat die mielies teen 'n stadiger tempo ryp geword het en stuifmeelproduksie is dus verder vertraag. Daarom kon slegs 'n klein aantal kruisings gemaak word.

'n Tweede faktor met betrekking tot bestuiwing wat hier moontlik die sukses van die poging beïnvloed het, is die voorbereiding van die are vir bestuiwing. Laurie (1989) het gevind dat deur die blommetjies oop te knip wanneer bestuiwing gedoen word, die frekwensie van bevrugting op een dag voor en op die dag van stuifmeelstorting beduidend laer is in vergelyking met gevalle waar die blommetjies intact gehou word. Tydens hierdie studie is die blommetjies aanvanklik oopgeknip voor bestuiwing gedoen is. Die ontwikkelende sade was dus meer blootgestel aan omgewingsinvloede. Hoewel die frekwensie embryos wat hier verhaal is, goed vergelyk met ander studies, is dit moontlik dat die embryos se kiemkragtigheid hierdeur benadeel is. Dit bied 'n verklaring vir die klein hoeveelheid plantjies wat verhaal is.

Die tydsberekening en metode van GRO toediening na bestuiwing is 'n volgende kritiese faktor vir VH produksie. Suenaga (1994) het gevind dat daar nie 'n beduidende verskil in embryo produksie is wanneer die GRO onmiddellik en een dag na bestuiwing, onmiddellik na bestuiwing of een dag na bestuiwing toegedien word nie. Matzk en Mahn (1994) het gevind dat GRO toediening 2-4 dae na bestuiwing die mees effektiewe praktyk is. In die protokol wat hier gebruik is, stel Pienaar *et al.* (1997) voordat GRO toediening tussen 24 tot 30 h na bestuiwing geskied. Verskeie toedieningsmetodes word deur tegnisi aangewend. Hieronder ressorteer bespuiting

van die aar met die GRO, inspuiting van die GRO in óf die boonste lit van die aar óf die individuele blomkopies, indompeling van die aar in 'n GRO en kweek van bestuifde are op medium. Daar is gevind dat laasgenoemde die mees effektiewe metode is (Kaushik *et al.*, 2004). Die metode is egter arbeidsintensief en is nie in hierdie studie aangewend nie. Die samestelling van die GRO wissel volgens die protokol. Die mees algemene GRO wat gebruik word is die sintetiese 2,4D (Niroula & Bimb, 2009). Dit word alleen en ook in kombinasie met ander GRO's soos dicamba (Cambell *et al.*, 2000) toegedien. Pienaar *et al.* (1997) stel 'n kombinasie van 2,4D en GA₃ vir die gebruik in 'n Suid-Afrikaanse sisteem voor. Aangesien die protokol van Pienaar *et al.* (1997) streng gevolg is met betrekking tot die tydsberekening en metode van GRO toediening, is dit onwaarskynlik dat hierdie faktor 'n beduidende invloed op die uitslag van die prosedure gehad het.

Die ouderdom van die embrio wanneer dit gered word speel 'n kritiese rol in die kiemkragtigheid daarvan. Kammholz *et al.*, (1996) beveel aan dat embrios 12-15 dae na bestuiwing gered word, terwyl Suenaga (1994) die beste resultate 10-11 dae na bestuiwing waargeneem het. Daarteenoor het Kaushik *et al.* (2004) gevind dat embrioredding 17-19 dae na bestuiwing optimaal is. Dit blyk dat die tydsberekening van embrioredding en die omgewingstemperatuur 'n gesamentlike invloed op die ontkieming van die embrios uitoefen en dus nie onafhanklik van mekaar beoordeel moet word nie. Pienaar *et al.* (1997) gee twee riglyne aan om hierdie verband te illustreer: embrioredding moet tussen 16 en 20 dae na bestuiwing gedoen word indien die temperatuur in die glashuis >22°C is, maar teen 21-25 dae indien dit <18°C is. Tydens hierdie poging is embrios reeds op 14-15 dae gered, aangesien 'n langer wagperiode tot uitdroging van die saadjie en daaropvolgende abortering van embrios gelei het. Dit was 'n onverwagte waarneming, aangesien die glashuis temperatuur-beheerd (20°C) is. Dit versterk dus vroeëre veronderstelling dat dit 'n beter praktyk is om die blommetjies intakt te hou wanneer bestuiwing gedoen word. 'n Tweede omgewingsfaktor wat nou met temperatuur saamhang is ligintensiteit. Campbell *et al.* (2001) het die invloed van ligintensiteit op die groei van die stuifmeelbuis ondersoek. Hul navorsing het aan die lig gebring dat verhoogde stuifmeelbuisgroeï plaasvind by hoër ligintensiteit, wat waarskynlik 'n direkte invloed op die bevrugting van die eisel en die ontwikkeling van die embrio uitoefen.

Uit bogenoemde word daar afgelei dat laer temperature en hoër ligintensiteit optimaal is vir embryo-ontwikkeling. Hierdie poging is van middel herfs tot laat winter (April-Augustus) uitgevoer en lae omgewingstemperature was dus aan die orde van die dag vir die grootste deel van die tydperk. Dit het egter ook gepaardgegaan met lae ligintensiteit en kort daglengtes (<12 h). Dit is dus moontlik dat die ligintensiteit in die glashuis, sowel as die daglengte, beperkende faktore was vir die kwaliteit en vroeë ontwikkeling van die embryos. Na afloop van embrioredding is die botteltjies vir 'n week by kamertemperatuur gelaat ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) en daarna in 'n groeikabinet by 20°C geplaas. Pienaar *et al.* (1997) beveel egter aan dat die embryos by $6-8^{\circ}\text{C}$ vir die eerste 10 dae en daarna by 25°C gehou word. In 'n uitgebreide literatuuroorsig deur Porter & Gawith (1999) word gerapporteer dat die optimale temperatuur vir ontkieming 24°C is (Ali *et al.*, 1994). Dit blyk dus dat die embryos in hierdie poging nie by optimale temperature gekweek is nie, wat waarskynlik 'n deurslaggewende rol in die sukses van die poging gespeel het.

Die genotipe van die ouerplante word gereken om 'n beduidende – en soms beperkende – invloed op die produksie van VH uit te oefen. Hierdie waarneming is reeds deur verskeie navorsers ondersoek. Sommige studies het getoon dat daar geen verband tussen die genotipe van die koringouer en die aantal haploïede embryos wat verhaal word, bestaan nie (Matzk & Mahn, 1994; Campbell *et al.*, 2000). Oorweldigende bewyse tot die teendeel word egter in die literatuur aangetref. Bitsch *et al.* (1998) het die effek van winterkoringgenotipes op haploïede embryo produksie en plant-regenerasie bestudeer en 'n beduidende genotipiese invloed waargeneem. In 'n studie waar die reaksie van 23 verskillende genotipes tydens VH produksie ondersoek is, rapporteer Niroula & Thapa (2009) groen saad-frekwensies wat strek van 0-56%, embryo produksiefrekwensies tussen 12 en 56% en groen plant regenerasiefrekwensie van 0-10.1%. Sharma *et al.* (2005) het in 'n soortgelyke studie beduidende verskille tussen genotipes op grond van groen saadfrewensie, haploïede embryo produksie en plant-regenerasie vir beide lente-, winter- en lente- x winterkoring kombinasies waargeneem. Die genotipe van 'n koringouer het dus 'n bepalende effek op die sukses van verskeie fases van VH produksie en kon ook in hierdie studie die sukses van die poging beïnvloed het.

In ooreenstemming hiermee is die effek van mieliegenotipes ook reeds ondersoek, met soortgelyke resultate. Groen saad-frekwensies wat strek van 36.7-84.6% en embryo produksiefrekwensies tussen 1.1 en 23.4% is deur Verma *et al.* (1999) aangeteken in 'n studie waar die reaksie van 15 mieliegenotipes beduidend van mekaar verskil het. Niroula *et al.* (2007) onderskryf hierdie bevinding en vind ook 'n beduidende verskil in groen plant regenerasiefrekwensie tussen genotipes.

Ter opsomming is daar verskeie faktore wat moontlik 'n bydrae gelewer het tot die sukses van hierdie poging, naamlik die beskikbaarheid en van meliestuifmeel, die voorbereiding van die are vir bestuiwing, die tydsberekening van bestuiwing en embrioredding, die omgewingstoestande tydens die verskillende ontwikkelingsfases en die genotipe van beide die ouers. Daar is verder bewyse dat hierdie faktore interafhanklik is van mekaar. So byvoorbeeld het die genotipe van die koringouer 'n beduidende invloed op die reaksie en embryo produksiefrekwensie van hierdie ouer onder verskillende omgewingstoestande (Campbell *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001).

4.2.3 Tweede poging vir VH ontwikkeling

Met die geïdentifiseerde faktore vanaf die eerste poging vir VH ontwikkeling in gedagte is daar veranderinge aan die protokol aangebring. Die mieliekultivar wat tydens die eerste poging gebruik is, "Bonita" (Agricol (Edms) Bpk, Brackenfell, RSA), is vervang met die "Honey Sweet" kultivar. 'n Groter aantal mielies is aangeplant en stuifmeel was dus nie 'n beperkende faktor nie. Ontmanning is 2-4 dae voor (koring) stuifmeelstorting uitgevoer. Die blommetjies is intakt gehou tydens bestuiwing. Die poging is van middel lente tot middel somer (Oktober – Desember) uitgevoer, wat hoër ligintensiteit en langer dae impliseer. Die glashuitemperatuur is streng by 20°C gehandhaaf. Embrioredding is tussen 18-21 dae uitgevoer. Na afloop hiervan is die embryos vir 3-4 dae by 4°C in die donker geplaas, waarna dit na 'n groeikabinet by 24°C verskuif is ten einde 'n meer optimale omgewing vir ontwikkeling te skep.

Vir die tweede poging is die oorblywende (F_2) saad van drie families (07M82-15.20, 07M82-7.15 en 07M82- 3.27 – 'n lyn wat later geïdentifiseer is om ook $Lr19^+/Sr31^+$ te wees – geplant en vir die ontwikkeling van VH gebruik. Die plante is nie vooraf

geselekteer nie. Vier kontrole genotipes is by die eksperiment ingesluit ten einde die effek van die genotipe van die ontwikkelde families op die VH genereringsvermoë daarvan te ondersoek. Hierdie kontroles was “SST88” en “SST57” vir goeie VH genereringsvermoë (“positiewe kontroles”) en “W84-17” en “CS” vir swak VH genereringsvermoë (“negatiewe kontroles”). ’n Aansienlik groter hoeveelheid kruisings (218) is vir hierdie poging gemaak. Die resultate word in Tabel 4.6 aangegee.

Tabel 4.6 Resultate van tweede poging vir VH ontwikkeling.

	1ste poging	Gemiddeld Families 2de poging	Gemiddeld pos. Kontroles	Gemiddeld neg. Kontroles
Persentasie sade ontwikkel	86.50	86.60	81.64	76.73
Persentasie wit sade per groen sade	77.62	22.77	22.22	85.76
Persentasie embrios per sade ontwikkel	25.58	15.59	19.30	12.15
Persentasie embrios per groen sade	27.07	18.56	22.55	17.75
Persentasie embrios per blommetjies bestuif	23.30	13.78	16.57	10.97
Persentasie plantjies per embrios	6.83	28.14	24.13	9.33
Persentasie plantjies per blommetjies bestuif	1.63	4.46	4.36	1.27
Persentasie plantjies per groen sade	1.85	5.60	5.36	2.11

T-Toetsing (gelyke variansies) is met behulp van die “Data Analysis” pakket van die Microsoft® Office Excel® 2007 programmatuur (weergawe “6.0 6002 Service Pack 2 Build 6002”) uitgevoer ten einde die resultate van die twee pogings statisties met mekaar te vergelyk. Terwyl die persentasie sade ontwikkel en die verhouding wit/groen sade verkry in die tweede poging nie beduidend verskil van die eerste poging nie ($P = 0.978$ en 0.175 onderskeidelik), is daar beduidend minder embrios in die tweede poging verkry. Daarteenoor is die hoeveelheid plantjies per embrios gered in die tweede poging beduidend hoër as dié in die eerste poging met $P = 0.000342$. So ook is die hoeveelheid plantjies per blommetjies bestuif en plantjies per groen sade beduidend meer in die tweede poging (Tabel 4.7). Daar kan dus gesê word dat die groen plant regenerasiefrekwensie beduidend verbeter het.

Tabel 4.7 P-waardes na t-toetsing (gelyke variansies) om verskille in haploïede embryo en -plant-produksie tussen die twee pogings, asook tussen die tweede poging en die kontroles, te bepaal.

	1ste poging vs. 2de poging	2de poging vs. pos. kontrole	2de poging vs. neg. kontrole	Pos. kontroles vs. neg. kontroles
Persentasie sade ontwikkel	0.978	0.0671	0.00334	0.325
Persentasie wit/groen sade	0.175	0.948	0.0000	0.00263
Persentasie embryos per sade ontwikkel	0.0000	0.0304	0.0718	0.00356
Persentasie embryos per groen sade	0.00771	0.0768	0.758	0.153
Persentasie embryos per blommetjies bestuif	0.0000	0.0631	0.0957	0.0100
Persentasie plantjies per embryos	0.000342	0.352	0.0000	0.000726
Persentasie plantjies per blommetjies bestuif	0.00610	0.898	0.0000	0.000121
Persentasie plantjies per groen sade	0.00270	0.805	0.000290	0.00185

Die geskakeerde selle dui aan waar datastelle beduidend van mekaar verskil het (p-waardes < 0.05).

'n Vergelyking van die lyne wat in die tweede poging ontwikkel is met die positiewe kontroles wat hier gebruik is, dui daarop dat dié twee groepe nie beduidend van mekaar verskil het nie. Trouens, die hoeveelheid plantjies wat van die families verhaal is, is (hoewel nie beduidend nie) gemiddeld meer as wat van die positiewe kontroles verhaal is. Daarteenoor is die hoeveelheid plantjies van die families beduidend meer as dié van die negatiewe kontroles. Dit dui vervolgens daarop dat die genotipe van die families nie 'n belemmerende invloed op die VH genereringsvermoë daarvan het nie. Die verskil in groen plant regenerasiefrekwensies tussen die twee pogings kan om hierdie rede waarskynlik aan die ander mieliegenotipe wat gebruik is, sowel as aan verskille in die tegniek en omgewingstoestande tydens die tweede poging, toegeskryf word.

Navorsing het getoon dat 'n opmerklike verskil in haploïede plantproduksie tussen seisoene waargeneem kan word (Pienaar & Lesch, 1994). Wanneer redding in die herfs en lente plaasgevind het, was die kwaliteit van embryos beter en 'n groter aantal het ontwikkel tot plante in vergelyking met dié wat in die somer gered is. Campbell *et al.* (2000) het soortgelyke resultate gerapporteer. Die hoeveelheid embryos per blommetjies bestuif neem beduidend af waar kruisings in die somer gedoen is (18-28%) tot herfs (8-12%) en winter (0%). Die afleiding was dus dat ligintensiteit 'n rol in die sukses van haploïede ontwikkeling speel. Die resultate van hierdie studie is direk teenstrydig met dié van die bogenoemde studies. Hier is 'n beduidend groter

hoeveelheid embryos in die eerste poging (winter) as in die tweede poging (somer) gered, terwyl 'n beduidend groter aantal plantjies tydens die somer-poging verhaal is. Die seisoenale effek word deur drie veranderlikes – temperatuur, daglengte en ligintensiteit – verteenwoordig. Dit is moontlik dat die effek van temperatuur op die hoeveelheid embryos verhaal hier uitgeskakel is deur die konstante toestande in die glashuis. Die daglengte was soos verwag langer en die ligintensiteit hoër tydens die tweede poging, met die waarskynlike gevolg dat beter embryos geproduseer is.

Embrios kon tydens die tweede poging veel later (18-21 dae) as tydens die eerste poging (14 dae) gered word. Die saad het nie soos in die eerste poging vinnig verdroog nie, wat waarskynlik toegeskryf kan word aan die blommetjies wat intakt gelaat is. Die ontwikkelende embryo is dus vir 'n langer tydperk in 'n meer beskermde omgewing toegelaat om spontaan te ontwikkel. Dit het op sy beurt bygedra tot 'n groter hoeveelheid haploïede plantjies. Vir hierdie poging is die optimale temperatuur vir ontkieming nageboots. Hierdie veranderde temperatuur-regime was waarskynlik die mees prominente faktor wat bygedra het tot die groter hoeveelheid plantjies wat in die tweede poging verhaal is en beklemtoon dat die korrekte temperatuur onontbeerlik is vir die sukses van hierdie tegniek.

Nadat die plantjies in potte uitgeplant is en na die glashuis verskuif is, is dieselfde waarneming as met die eerste poging aanvanklik waargeneem. Die meerderheid van die plantjies het nie gestoel nie en vroeg are gemaak. Kolgisienbehandeling kon om hierdie rede aan slegs 89 van die 259 plantjies (van die ontwikkelde lyne) toegedien word. Die plantjies het gestoel en sekondêre spruite het ontwikkel en die behandeling kon dus toegedien word. Die 89 plantjies is vooraf met behulp van chromosoomtellings as haploïed bevestig.

Die rede vir die belemmerde groei van die oorblywende 170 plantjies is waarskynlik dat die plantjies aanvanklik nie by gekontroleerde omstandighede geplaas is nie, maar direk ná afhending na die glashuis verskuif is, waar die daglengte, ligintensiteit en die temperatuur nie optimaal vir ontwikkeling was nie. Daarteenoor is die 89 plantjies wat wel kolgisienbehandeling ontvang het, na afhending direk in 'n groeikamer by 'n konstante temperatuur van 21°C geplaas. Verlengde daglengte en hoër temperature en ligintensiteit soos wat tipies tydens die somer (tweede poging in hierdie studie) ervaar word, dwing koringplante normaalweg om vinniger te ontwikkel.

Die aantal dae tot aarvorming is minder in vergelyking met plante wat by 'n laer temperatuur en ligintensiteit en korter daglengte ontwikkel. Hierdie reaksie is egter weereens afhanklik van die genotipe van die plant. In studies uitgevoer met die kultivar "Thatcher", het dié kultivar 'n terminale aartjie ("spikelet") ontwikkel ongeag die daglengte. Tydens 'n kort daglengte het die plant egter afgesterf voor stuifmeelstorting plaasgevind het. Dit bied 'n moontlike verklaring vir die waarneming wat hier in die eerste poging (winter) opgemerk is. (Slafer & Rawson, 1994)

Die 89 plantjies wat kolgisienbehandeling ontvang het, het 47 verskillende lyne verteenwoordig. Al die plantjies het die behandeling oorleef. Uit die 89 plantjies het 29 (32.6%) VH saad geproduseer wat geplant en verder vir die weerstandsgeentranslokasies getipeer is. Pienaar *et al.* (1997) voorspel dat byna al die behandelde plantjies 'n aantal are met vrugbare (saadproduserende) areas behoort te produseer. So ook rapporteer Campbell *et al.* (2000) dat ongeveer 80% plantjies saad geproduseer het. Dit is dus duidelik dat hier 'n ongewoon lae aantal saadproduserende VH plantjies ontwikkel het. In teenstelling met die 32.5% van die lyne wat saad geproduseer het, het 65.2% van die positiewe kontroles wat kolgisienbehandeling ontvang het, saad geproduseer. Dit is dus waarskynlik dat 'n faktor(e) in die genetiese agtergrond van die ontwikkelde lyne verdubbelde haploïede saadproduksie strem. Studies het getoon dat sekere gene op chromosome 2A, 2B, 3A en 5B met groen plant regenerasie in helmknopkulture geassosieerd is. Die *Lr19*-translokasie het skynbaar 'n nadelige invloed op die frekwensie embryos en groen plante wat met die helmknopkultuur-tegniek verhaal word (Sibikeeva *et al.*, 2004). Hierdie effek, sowel as moontlike soortgelyke effekte van die ander wilde spesie translokasies, kan ook met die mielie-tegniek van toepassing wees.

4.3 Karakterisering van ingeteelde lyne

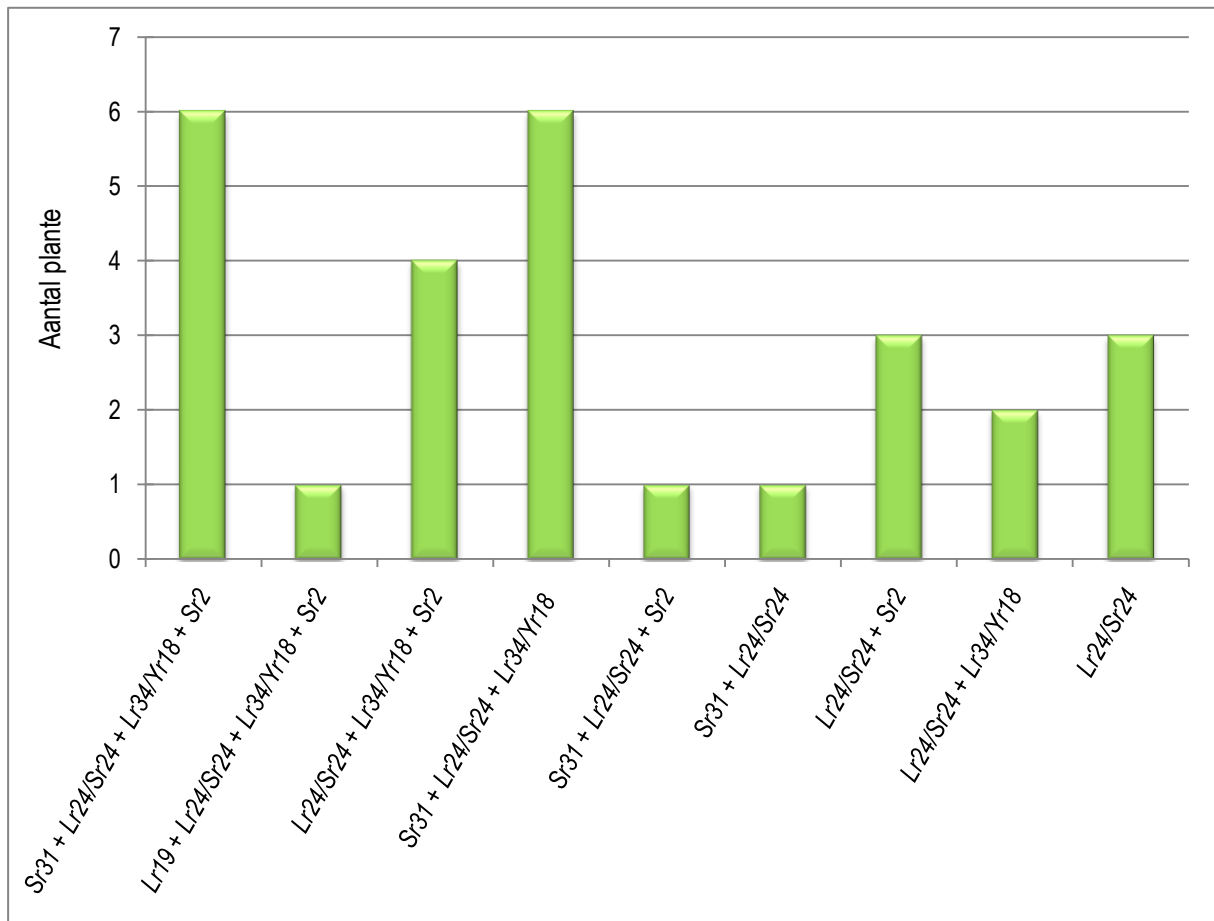
Die 29 VH plantjies is met die toepaslike molekulêre merkers vir *Lr19*, *Sr31*, *Lr24/Sr24*, *Lr34/Yr18* en *Sr2* getoets (Addendum A). Die resultate van die tipering word in Tabel 4.8 aangetoon. Plante VH3.27-17 (5) en VH15.20-13 is uit die populasie verwyder nadat die data aangedui het dat hierdie plante beide die positiewe en negatiewe allele vir *Sr2* besit en dus heterosigoties is (Addendum A,

Fig. 7.1 en Fig. 7.5). Die plante is dus nie VH nie, maar het moontlik 'n aantal haploïede selle bevat, wat veroorsaak het dat die plante tydens chromosoomtellings as haploïed geklassifiseer is. Hierdie bevinding beklemtoon die waarde van ko-dominante merkers, of die gelyktydige gebruik van verskillende merkers wat beide allele van 'n geen amplifiseer. Die frekwensie saadproduserende VH plante word vervolgens na 30.34% aangepas.

Tabel 4.8 Resultate van die tipering van die VH plante vir die weerstandsgeentranslokasies.

	<i>Lr19</i>	<i>Sr31</i>	<i>Lr24/Sr24</i>	<i>Lr34/Yr18</i>	<i>Sr2</i>
VH3.27-15 (5)	-	-	-	-	-
VH3.27-18 (2)	0	1	1	1	1
VH3.27-18 (3)	1	0	1	1	1
VH3.27-22 (3)	0	0	1	1	1
VH3.27-27 (4)	0	1	1	1	1
VH3.27-28 (4)	0	0	1	0	1
VH3.27-28 (6)	0	0	1	0	1
VH3.27-29 (7)	0	0	1	1	1
VH7.15-20 (2)	0	0	1	1	0
VH7.15-24 (2)	0	1	1	1	0
VH7.15-25 (5)	0	1	1	1	0
VH7.15-26 (4)	0	0	1	0	0
VH7.15-27 (3)	0	1	1	1	0
VH7.15-28 (3)	0	1	1	1	0
VH7.15-29 (4)	0	0	1	1	0
VH7.15-32 (3)	0	0	1	0	0
VH15.20-13	-	-	-	-	-
VH15.20-16 (2)	0	1	1	1	1
VH15.20-16 (3)	0	0	1	0	0
VH15.20-19 (2)	0	1	1	0	0
VH15.20-20 (2)	0	1	1	1	1
VH15.20-20 (4)	0	1	1	1	1
VH15.20-21 (4)	0	1	1	1	0
VH15.20-25 (3)	0	0	1	1	1
VH15.20-26 (3)	0	0	1	0	1
VH15.20-28 (2)	0	1	1	1	1
VH15.20-29 (2)	0	0	1	1	1
VH15.20-29 (3)	0	1	1	1	0
VH15.20-29 (4)	0	1	1	0	1

Die VH plante is voorts gegroepier volgens die geenprofiel waaroor hul beskik (Fig. 4.14).



Figuur 4.14 Diagrammatiese voorstelling van die aantal VH plante per geenkombinasie.

Die resultate toon aan dat daar sewe lyne is wat kombinasies van vier gene elk bevat, 11 lyne wat drie gene elk bevat, ses lyne met twee gene elk en drie lyne wat slegs *Lr24/Sr24* bevat. Die 11 lyne wat beide *Lr34/Yr18* en *Sr2* bevat, is veral voordelig, aangesien hierdie twee translokasies steeds effektief teen onderskeidelik blaar- en stamroes is. Slegs een lyn – VH3.27-18 (3) – bevat *Lr19*. Die lae frekwensie herwinning van *Lr19* in die VH nageslag dien as 'n bevestiging dat die *Lr19*-translokasie nadelig is vir groen plant regenerasie met die mielie-tegniek. Alle ander translokasies is in ooreenstemming met die voorspelde frekwensie (na aanleiding van die genotipe van die drie ouerlyne – 07M82-3.27, 07M82-7.15 en 07M82-15.20) in die nageslag waargeneem.

5. SAMEVATTING

Molekulêre merkers is tydens die studie aangewend om populasies vir weerstandsgeentranslokasies te tipeer. Die waarde van die kombinerings van merkers vir spesifieke translokasies (bv. *Lr34/Yr18* en *Sr2*) in 'n multipleksreaksie is geïllustreer deurdat 'n meer volledige beeld aangaande die genetiese samestelling van die lyne sodoende geskep is. Dit het meer akkurate voorspellings van geenfrekwensies in die nageslag gefassiliteer.

Die frekwensie plante wat in die vroeë kruisingspopulasies geselekteer is op grond van hul positiwiteit vir beide *Lr19* en *Sr31* was beduidend laer as verwag. Dit is moontlik as gevolg van die gebruik van die ouer wat *Lr19* sou bydra as die manlike ouer in voorafgaande kruisings, aangesien *Lr19* dikwels self-eliminasië in hierdie situasie toon. Dit sal dus raadsaam wees om *Lr19* in toekomstige studies as vroulike ouers aan te wend.

'n Kleinere hoeveelheid VH plante in vergelyking met soortgelyke studies, is verhaal. Tydens die studie het dit aan die lig gekom dat die genotipe van die koringouer nie 'n negatiewe invloed op die sukses van die tegniek uitgeoefen het nie. Daar is egter wel vasgestel dat die genotipe van die mielie-ouer, sowel as sekere omgewingsfaktore, vernameam temperatuur, daglengte en ligintensiteit, moontlik 'n beduidende invloed gehad het en waarskynlik vir die laer regenerasiefrekwensie verantwoordelik was. Daar is beduidende vordering aangaande die verfyning van die mielie-tegniek gemaak tydens die studie. Dit baan die weg vir soortgelyke projekte in die toekoms, asook die moontlike instelling van die tegniek as 'n roetine metode vir die inteling van lyne met wenslike eienskappe.

'n Verdere faktor wat bygedra het tot die kleiner persentasie saadproduserende VH lyne (27) wat verhaal is, is die teenwoordigheid van wilde spesie materiaal in die genetiese agtergrond van die donoryne. Wat meer is, die genetiese agtergrond waarin die translokasies beskikbaar is, is nie in alle gevalle van goeie gehalte gewees nie, soos meestal die geval wanneer wilde spesie translokasies gebruik word. Dit is dus moeilik om die negatiewe invloed op die affiniteit van die lyne vir VH ontwikkeling vooraf te voorspel. Dit skep risiko vir soortgelyke projekte se

implementering binne die milieu van kommersiële teelprogramme. Wilde spesie donorlyne se affiniteit jeens die produksie van VH vir die MB tegniek (of enige ander protokol, bv. mikrospre) behoort dus vooraf getoets te word voordat dit in 'n kommersiële teelprogram aangewend word.

Die 27 lyne wat voortspruit uit die studie is divers ten opsigte van die samestelling van die weerstandsgeentranslokasies waarvoor hul beskik. Ses lyne bevat vier weerstandsgeentranslokasies (*Lr24/Sr24*, *Lr34/Yr18*, *Sr2* en *Lr19* of *Sr31*) elk en slegs drie lyne beskik oor 'n enkele translokasie (*Lr24/Sr24*). Die belangrikheid van molekulêre merkers is ook hier beklemtoon, deurdat dit heterosigotiese plante (wat dus nie VH is nie) geïdentifiseer het. Die VH lyne kan voorts vir onder meer graanopbrengs, proteïen-inhoud en agronomiese eienskappe soos plant hoogte getoets word voordat dit ingesluit word as deel van 'n voor-telingskwekery wat tans jaarliks aan teelprogramme versprei word. Uit hierdie data kan ook 'n uitgebreide inligtingstuk saamgestel word wat die lyne kan vergesel en telers in staat sal stel om meer ingeligte besluite te neem.

Die oogmerke van hierdie studie, naamlik die ontwikkeling van 'n heterogene kruisingspopulasie wat verskeie weerstandsgeentranslokasies in kombinasies bevat en die daaropvolgende ontwikkeling van VH daaruit, is bereik. Die realiteit dat drie van die weerstandsgene wat in die finale populasie gevestig is – *Lr19*, *Sr31* en *Sr24* – nie meer teen die heersende roespatogene in Suid-Afrika effektief is nie, onderskryf die risiko verbonde aan die metodiek hier gevolg, waar grootliks op hoofgeen weerstand gefokus is. Die fokus behoort, soos wat merkerontwikkeling progressief meer omvattend raak, meer en meer op die aanwending van QTL te val. Sodoende sal MBS ook bydra tot meer duursame weerstand. Die studie illustreer egter die waarde van 'n geïntegreerde telsingstrategie vir die versnelling van die kultivarontwikkelingsproses. 'n Verskeidenheid weerstandsgene is met beperkte hoeveelheid bronne binne twee seisoene in 'n populasie ingeteelde lyne geïnkorporeer, wat beklemtoon dat MBS en VH as roetine strategieë in teelprogramme aangewend kan word.

6. VERWYSINGS

- ACQUAAH, G., 2007. Principles of plant genetics and breeding. p. 283. Blackwell Publishing, Oxford.
- AGRIOS, G.N., 2005. Plant pathology, 5de uitg., p. 208-209; 151-161. Elsevier Academic Press, Burlington.
- ALI, Z.I., MAHALAKSHMI, V., SINGH, M., ORITZ-FERRARA, G. & PEACOCK, J.M., 1994. Variation in cardinal temperatures for germination among wheat (*Triticum aestivum*) genotypes. *Ann. Appl. Biol.* 125, 367-375.
- ANTONOV, A.I. & MARAIS, G.F., 1996. Identification of leaf rust resistance genes in *Triticum* species for transfer to common wheat. *S. Afr. J. Plant Soil* 13, 55-60.
- AYLIFFE, M.A. & LAGUDAH, E.S., 2004. Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Ann. Bot.-London* 94, 765-773.
- AYLIFFE, M., SINGH, R. & LAGUDAH, E., 2008. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 187-192.
- BANKS, P.M., *et al.*, 1995. The use of cell culture for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome* 38, 395-405.
- BANSAL, U.K., HAYDEN, M.J., VENKATA, B.P., KHANNA, R., SAINI, R.G. & BARIANA, H.S., 2008. Genetic mapping of adult plant leaf rust resistance genes *Lr48* and *Lr49* in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 117, 307-312.
- BARIANA, H.S., BROWN, G.N., BANSAL, U.K., MIAH, H., STANDEN, G.E. & LU, M., 2007. Breeding triple rust resistant wheat cultivars for Australia using conventional and marker-assisted selection technologies. *Aus. J. Agr. Res.* 58, 576-587.
- BELKHADIR, Y., SUBRAMANIAM, R. & DANGL, J.L., 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LLR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 391-399.

- BEYNON, J.L., 1997. Molecular genetics of disease resistance: an end to the 'gene-for-gene' concept? p. 359-375. *In*: I.R. Crute, E.B. Holub & J.J. Burdon (reds.). The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions. CAB International, Oxon.
- BITSCH, C., GRÖGER, S. & LELLEY, T., 1998. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat x maize crosses. *Euphytica* 103, 319-323.
- BONAS, U. & LAHAYE, T., 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 44-50.
- BOSHOFF, W.H.P., PRETORIUS, Z.A. & VAN NIEKERK, B.D., 2003. Fungicide efficacy and the impact of stripe rust on spring and winter wheat in South Africa. *S. Afr. J. Plant Soil* 20, 11-17.
- BURDON, J.J. & THRALL, P.H., 2008. Pathogen evolution across the agro-ecological interface: implications for disease management. *Evol. Appl.* 1, 57-65.
- CAMPBELL, M.A., FITZGERALD, H.A. & RONALD, P.C., 2002. Engineering pathogen resistance in crop plants. *Transgenic Res.* 11, 599-613.
- CAMPBELL, A.W., GRIFFIN, W.B., BURRITT, D.J. & CONNER, A.J., 2000. Production of wheat doubled haploids via wide crosses in New Zealand wheat. *New Zeal. J. Crop Hort.* 28, 185-194.
- CAMPBELL, A.W., GRIFFIN, W.B., BURRITT, D.J. & CONNER, A.J., 2001. The importance of light intensity for pollen tube growth and embryo survival in wheat x maize crosses. *Ann. Bot.* 87, 517-522.
- CASTRO, A.J., *et al.*, 2003. Mapping and pyramiding of qualitative and quantitative resistance to stripe rust in barley. *Theor. Appl. Genet.* 107, 922-930.
- CHEN, Q., CONNER, R.L., LAROCHE, A. & THOMAS, J.B., 1998. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization. *Genome* 41, 580-586.

CHERUKURI, D.P., GUPTA, S.K., CHARPE, A., KOUL, S., PRABHU, K.V., SINGH, R.B., HAQ, Q.M.R. & CHAUHAN, S.V.S., 2003. Identification of a molecular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr19* for leaf rust resistance in wheat. *Plant Breeding* 122, 204-208.

COLLARD, B.C.Y. & MACKILL, D.J., 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. T. Roy. Soc. B* 363, 557-572.

DARLINGTON, C.D. & LA COUR, L.F., 1960. The handling of chromosomes. George Allan & Unwin Ltd., London.

DE WIT, P.J.G.M., 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2, 452-458.

DEVAUX, P. & PICKERING, R., 2005. Haploids in the improvement of *Poaceae*. p.215-226. *In*: C.E. Palmer, W.A. Keller & K.J. Kasha (reds.). *Biotechnology in agriculture and forestry* 56. Haploids in crop improvement II. Springer, Berlyn.

DODDS, P.N., CATANZARITI, A., LAWRENCE, G.J. & ELLIS, J.G., 2007. Avirulence proteins of rust fungi: penetrating the host-haustorium barrier. *Aus. J. Agr. Res.* 58, 512-517.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15

DUNDAS, I.S., ANUGRAHWATI, D.R., VERLIN, D.C., PARK, R.F., BARIANA, H.S., MAGO, R. & ISLAM, A.K.M.R., 2007. New sources of rust resistance from alien species: melioration linked defects and discovery. *Aus. J. Agr. Res.* 58, 545-549.

DUVEILLER, E., SINGH, R.P. & NICOL, J.M., 2007. The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica* 157, 417-430.

EASTHAM, K. & SWEET, J., 2002. Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer. *European Environment Agency (EEA) Environmental issue report* nr. 28. Copenhagen.

FAOSTAT, 2010. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. <http://faostat.fao.org/> (Besoek op 05/09/2010).

FEDAK, G., 1999. Molecular aids for integration of alien chromatin through wide crosses. *Genome* 42, 584-591.

FLOR, H.H., 1956. The complimentary genetic system in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8, 29-54.

FRIEBE, B., JIANG, J., RAUPP, W.J., McINTOSH, R.A. & GILL, B.S., 1996. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica* 91, 59-87.

GABRIEL, D.W., 1999. Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiol. Mol. Plant P.* 55, 205-214.

GARRETT, K.A. & MUNDT, C.C., 1999. Epidemiology in mixed host populations. *Phytopathology* 89, 984-990.

GENNARO, A., KOEBNER, R.M.D. & CEOLONI, C., 2009. A candidate gene for *Lr19*, an exotic gene conditioning leaf rust resistance in wheat. *Funct. Integr. Genomic.* 9, 325-334.

GUPTA, P.K., LANGRIDGE, P. & MIR, R.R., 2010. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Mol. Breeding* 26, 145-161.

GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., SHARMA, P.C. & RAMESH, B., 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant breeding* 118, 369-390.

GUZY-WRÓBELSKA, J. & SZAREJKO, I., 2003. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods. *Plant breeding* 122, 305-313.

HAWKES, J.G., 1985. Plant genetic resources: The impact of the international agricultural research centres. *CGIAR Study Report* Nr. 3. Washington, D.C.

HAYDEN, M.J., KUCHEL, H. & CHALMERS, K.J., 2004. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109, 1641-1647.

HOGENBOOM, N.G., 1993. Economic importance of breeding for disease resistance. p. 5-9. *In: Th. Jacobs & J.E. Parlevliet (reds.). Durability of disease resistance.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

HOSPITAL, F., 2009. Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica* 136, 303-310.

HOVMØLLER, M.S., YAHYAOU, A.H., MILUS, E.A. & JUSTESEN, A.F., 2008. Rapid global spread of two aggressive strains of a wheat rust fungus. *Mol. Ecol.* 17, 3818-3826.

HU, H., 1997. *In vitro* induced haploids in wheat. p. 73-97. *In: S.M. Jain, S.K. Sopory & R.E. Veilleux (reds.). In vitro haploid production in higher plants, vol. 4, Cereals.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

INAGAKI, M.N., VARUGHESE, G., RAJARAM, S., VAN GINKEL, M. & MUJEEB-KAZI, A., 1998. Comparison of bread wheat lines selected by doubled haploid, single-seed descent and pedigree selection methods. *Theor. Appl. Genet.* 97, 550-556.

JIN, Y., SINGH, R.P., WARD, R.W., WANYERA, R., KINYUA, M., NJAU, P., FETCH, T., PRETORIUS, Z.A. & YAHYAOU, A., 2007. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 91, 1096-1099.

JIN, Y., SZABO, L.J. & CARSON, M., 2010. Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* as an alternate host. *Phytopathology* 100, 432-435.

JIN, Y., SZABO, L.J., PRETORIUS, Z.A., SINGH, R.P., WARD, R. & FETCH, JR., T., 2008. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.* 92, 923-926.

JIN, Y., SZABO, L.J., ROUSE, M.N., FETCH, JR., T., PRETORIUS, Z.A., WANYERA, R. & NJAU, P., 2009. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant. Dis.* 93, 367-370.

JOHNSON, T., 1961. Man-guided evolution in plant rusts. *Science* 133, 357–362.

KAMMHOLZ, S.J., SUTHERLAND, M.W. & BANKS, P.M., 1996. Improving the efficiency of haploid wheat production mediated by wide crossing. *SABRAO J.* 28, 37-46.

KAUSHIK, N., SIROHI, M. & KHANNA, V.K., 2004. Influence of age of the embryo and method of hormone application on haploid embryo formation in wheat x maize crosses. p.771. *In*: T. Fischer, N. Turner, J. Angus, L. McIntyre, M. Robertson, A. Borrell, & D. Lloyd (reds.). *New directions for a diverse planet. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. 26 September – 1 Oktober 2004, Brisbane, Australië.*

KEOWN, D., 2008. The BRIC consumer economies: shopping but not dropping. Advisor Perspectives, Inc. [www.advisorperspectives.com/pdfs/The BRIC Consumer Economies Shopping but not Dropping.pdf](http://www.advisorperspectives.com/pdfs/The_BRIC_Consumer_Economies_Shopping_bu_t_not_Dropping.pdf) (Besoek op 01/09/2010).

KIM, K. & BAENZIGER, P.S., 2005. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture. *In vitro Cell. Dev.-Pl.* 41, 22-27.

KLUG, W.S. & CUMMINGS, M.R., 2003. *Concepts of genetics*, 7de uitg., p. 240-241. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey.

KNOTT, D.R., 1989. The wheat rusts - breeding for resistance. p. 6-20. Springer-Verlag, Berlyn.

KOLMER, J.A., 2005. Tracking wheat rust on a continental scale. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 441-449.

KOTA, R., SPIELMEYER, W., McINTOSH, R.A. & LAGUDAH, E.S., 2006. Fine genetic mapping fails to dissociate durable stem rust resistance gene *Sr2* from pseudo-black chaff in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 112, 492-499.

KRATTINGER, S.G., LAGUDAH, E.S., SPIELMEYER, W., SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J., McFADDEN, H., BOSSOLINI, E.L., SELTER, L.L. & KELLER, B., 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323, 1360-1363.

KUCHEL, H., FOX, R., REINHEIMER, J., MOSIONEK, L., WILLEY, N., BARIANA, H. & JEFFERIES, S., 2007. The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy. *Mol. Breeding* 20, 295-308.

LAGUDAH, E.S., McFADDEN, H., SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J., BARIANA, H.S. & SPIELMEYER, W., 2006. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 114, 21-30.

LAPITAN, N. & JAUHAR, P.P., 2006. Molecular markers, genomics, and genetic engineering in wheat. p. 99-114. *In*: R.J. Singh & P.P Jauhar (reds.). Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement, vol. 2, Cereals. CRC Press, Boca Raton, Florida.

LAUGÉ, R.L. & DE WIT, J.G.M., 1998. Fungal avirulence gene: structure and possible functions. *Fungal Genet. Biol.* 24, 285-297.

LAURIE, D.A., 1989. Factors affecting fertilization frequency in crosses of *Triticum aestivum* cv. 'Highbury' x *Zea mays* cv. 'Seneca 60'. *Plant breeding* 103, 133-140.

LAURIE, D.A. & BENNETT, M.D., 1988. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76, 393-397.

LAURIE, D.A. & REYMONDIE, S., 1991. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. *Plant breeding* 106, 182-189.

- LE MAITRE, N., 2010. Molecular genetic study of wheat rusts affecting cereal production in the Western Cape. M.Sc. Tesis, Universiteit Stellenbosch, Stellenbosch, Suid-Arika.
- LESCH, A.J.G., 1997. Production of doubled haploids in the wheat cultivar SST55. M.Sc. Tesis, Universiteit Stellenbosch, Stellenbosch, Suid-Afrika.
- LIU, J., LIU, D., TAO, W., LI, W., WANG, S., CHEN, P., CHENG, S. & GAO, D., 2000. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant breeding* 157, 21-24.
- LIU, S., YU, L., SINGH, R.P., JIN, Y., SORRELLS, M.E. & ANDERSON, J.A., 2010. Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26*. *Theor. Appl. Genet.* 120, 691-697.
- LOMBARD, B., 1986. Host-pathogen interaction involving wheat and *Puccinia graminis tritici* in South Africa. Ph.D. Tesis, Universiteit Stellenbosch, Stellenbosch, Suid-Afrika.
- LUKASZEWSKI, A.J., 2000. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci.* 40, 216-225.
- MA, H., BUSCH, R.H., RIERA-LIZARAZU, O., RINES, H.W. & DILL-MACKY, R., 1999. Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. *Theor. Appl. Genet.* 99, 432-436.
- MAGO, R., SPIELMEYER, W., LAWRENCE, G.J., LAGUDAH, E.S., ELLIS, J.G. & PRYOR, A., 2002. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines. *Theor. Appl. Genet.* 104, 1317-1324.
- MARAIS, G.F., 1992. The modification of a common wheat- *Thinopyrum distichum* translocated chromosome with a locus homoeoallelic to *Lr19*. *Theor. Appl. Genet.* 85, 73-78.

MARAIS, G.F. & BOTES, W.C., 2009. Recurrent mass selection for routine improvement of common wheat. p. 85-105. *In*: E. Lichtfouse (red.). Sustainable agricultural reviews, vol. 1, Organic farming, pest control and remediation. Springer, Dordrecht.

MARAIS, G.F., MARAIS, A.S. & GROENEWALD, J.Z., 2001. Evaluation and reduction of *Lr19-149*, a recombined form of the *Lr19* translocation of wheat. *Euphytica* 121, 289-295.

MARAIS, G.F., McCALLUM, B. & MARAIS, A.S., 2006. Leaf rust and stripe rust resistance genes derived from *Aegilops sharonensis*. *Euphytica* 149, 373-380.

MARAIS, G.F., McCALLUM, B., SNYMAN, J.E., PRETORIUS, Z.A. & MARAIS, A.S., 2005. Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi*. *Plant Breeding* 124, 538-541.

MARAIS, G.F., PRETORIUS, Z.A., MARAIS, A.S. & WELLINGS, C.R., 2003. Transfer of rust resistance genes from *Triticum* species to common wheat. *S. Afr. J. Plant Soil* 20, 193-198.

MARAIS, G.F., ROUX, H.S., PRETORIUS, Z.A. & PIENAAR, R. de V., 1988. Resistance to leaf rust of wheat derived from *Thinopyrum distichum* (Thunb.) Löve. p. 369-373. *In*: T.E. Miller & R.M.D. Koebner (reds.). Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium. 13-19 Julie 1988, Institute for Plant Science Research, Cambridge.

MARASAS, C.N., SMALE, M. & SINGH, R.P., 2004. The economic impact in developing countries of leaf rust resistance breeding in CIMMYT-related spring bread wheat. *Economics Program Paper 04-01*. CIMMYT, Mexico D.F.

MATZK, F. & MAHN, A., 1994. Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. *Plant breeding* 113, 125-129.

McINTOSH, R.A., DUBCOVSKY, J., ROGERS, W.J., MORRIS, C., APPELS, R. & XIA, X.C., 2009. Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2009.pdf> (Besoek op 01/08/2010).

- McINTOSH, R.A., DYCK, P.L. & GREEN, G.J., 1977. Inheritance of leaf rust and stem rust resistances in wheat cultivars Agent and Agatha. *Aus. J. Agr. Res.* 28, 37-45.
- McINTOSH, R.A., WELLINGS, C.R. & PARK, R.F., 1995. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Australia, Melbourne.
- McINTOSH, R.A., YAMAZAKI, Y., DUBCOVSKY, J., ROGERS, J., MORRIS, C., SOMERS, D.J., APPELS, R. & DEVOS, K.M., 2008. Catalogue of gene symbols for wheat. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2008/> (Besoek op 13/10/2008).
- McNEIL, M.D., KOTA, R., PAUX, E., DUNN, D., McLEAN, R., FEUILLET, C., LI, D., KONG, X., LAGUDAH, E., ZHANG, J.C., JIA, J.Z., SPIELMEYER, W., BELLGARD, M. & APPELS, R., 2008. BAC-derived markers for assaying the stem rust resistance gene, *Sr2*, in wheat breeding programs. *Mol. Breeding* 22, 15-24.
- MEREZHKO, A.F., 1998. Impact of plant genetic resources on wheat breeding. *Euphytica* 100, 295-303.
- MERKER, A., 1992. The Triticeae in cereal breeding. *Hereditas* 116, 277-280.
- MILUS, E.A., KRISTENSEN, K. & HOVMØLLER, M.S., 2009. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology* 99, 89-94.
- MISHRA, A.N., KAUSHAL, K., YADAV, S.R., SHIRSEKAR, G.S. & PANDEY, H.N., 2005. The linkage between the stem rust resistance gene *Sr2* and pseudo-black chaff in wheat can be broken. *Plant breeding* 124, 520-522.
- MUNDT, C.C., 2002. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 381-410.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- MURRAY, T.D., PARRY, D.W. & CATTILIN, N.D. (reds.), 1998. Rusts. p. 44-54. *In: Diseases of small grain cereal crops*, Manson Publishing, Londen.

NAZARI, K., MAFI, M., YAHYAOU, A., SINGH, R.P. & PARK, R.F., 2009. Detection of wheat stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) race TTKSK (Ug99) in Iran. *Plant Dis.* 93, 317.

NIROULA, R.K. & BIMB, H.P., 2009. Overview of wheat x maize system of crosses for dihaploid induction in wheat. *World Appl. Sci. J.* 7, 1037-1045.

NIROULA, R.K., BIMB, H.P., THAPA, D.B., SAH, B.P. & NAYAK, S., 2007. Production of haploid wheat plants from wheat (*Triticum aestivum* L.) x maize (*Zea mays* L.) cross system. *Him. J. Sci.* 4, 65-69.

NIROULA, R.K. & THAPA, D.B., 2009. Response of wheat genotypes to maize mediated polyhaploid production. *Am.-Eur. J. Agron.* 2, 151-161.

PARK, R.F., 2008. Breeding cereals for rust resistance in Australia. *Plant Pathol.* 57, 591-602.

PARLEVLIET, J.E., 1993. What is durable resistance, a general outline. p. 23-40. *In:* Th. Jacobs & J.E. Parlevliet (reds.). Durability of disease resistance. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

PARLEVLIET, J.E., 1995. Durable resistance and how to breed for it. p. 1-14. *In:* D.L. Danial (red.). Breeding for disease resistance with emphasis on durability. Proceedings of a regional workshop for eastern, central and southern Africa. 2-6 Oktober 1994, Njoro, Kenia.

PAUK, J., HASAN, M.S., PUOLIMATKA, M., LANTOS, C., MIHÁLY, R., MESTERÁZY, Á., KERTÉSZ, Z. & MATUZ, J., 2004. Microspore and anther culture improvements for wheat breeding. p. 133-153. *In:* A. Mujib, M. Cho, S. Predieri & S. Banerjee (reds.). In vitro application in crop improvement. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.

PAUL, I., 2009. Let op vir roessiektes en bestry tydlig. *Koring Fokus* 27, 22-27.

PIENAAR, R. DE V., HORN, M. & LESCH, A.J.G., 1997. A reliable protocol for doubled haploid accelerated wheat breeding. *Wheat Inf. Serv.* 85, 49-51.

PIENAAR, R. DE V. & LESCH, D. 1994. Doubled haploids. p.40-42. *In*: J.S. Quick (red.). Annual Wheat Newsletter 40. Wheat Genetic and Genomic Resources Center, Kansas State University.

PINK, D.A.C., 2002. Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* 124, 227-236.

PINK, D. & PUDDEPHAT, I., 1999. Deployment of disease resistance gene by plant transformation – a “mix and match” approach. *Trends Plant Sci.* 4, 71-75.

POEHLMAN, J.M., 1987. Breeding field crops. p. 187-213. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.

PORTER J.R. & GAWITH, M. (1999). Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *Eur. J. Agron.* 10, 23-36.

PRABHU, K.V., GUPTA, S.K., CHARPE, A. & KOUL, S., 2004. SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene *Lr19* uniquely marking the *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr24* in wheat: a revision. *Plant Breeding* 123, 417-420.

PRETORIUS, Z.A., BENDER, C.M., VISSER, B. & TEREFE, T., 2010. First report of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* race virulent to the *Sr24* and *Sr31* wheat stem rust resistance genes in South Africa. *Plant Dis.* 94, 784.

PRETORIUS, Z.A., BOSHOFF, W.H. & KEMA, G.H., 1997. First report of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* on Wheat in South Africa. *Plant Dis.* 18, 424.

PRETORIUS, Z.A., JIN, Y., PRINS, R., BENDER, C.M. & HERSELMAN, L., 2008. Stem rust resistance in South African wheat cultivars. p. 815-819. *In*: R. Appels, R. Eastwood, E. Lagudah, P. Langridge, M. Mackay, L. McIntyre & P. Sharp (reds.). Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium. 24-29 Augustus 2008, Brisbane, Australië.

PRETORIUS, Z.A., KLOPPERS, F.J. & VAN NIEKERK, D.B., 1996. Wheat leaf rust resistance in South Africa: present status and future prospects. p. 440-445. *In*: D.G. Tanner, T.S. Payne & O.S. Abdalia (reds.). The 9th regional wheat workshop for Eastern, Central and Southern Africa. 2-6 Oktober 1995, Addis Ababa, Ethiopië.

- PRETORIUS, Z.A., PAKENDORF, K.W., MARAIS, G.F., PRINS, R. & KOMEN, J.S., 2007. Challenges for sustainable cereal rust control in South Africa. *Aus. J. Agr. Res.* 58, 593-601.
- PRETORIUS, Z.A., SINGH, R.P., WAGOIRE, W.W. & PAYNE, T.S., 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 84, 203.
- PRINS, R., GROENEWALD, J.Z., MARAIS, G.F., SNAPE, J.W. & KOEBNER, R.M.D., 2001. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 103, 618-624.
- PRINS, R., MARAIS, G.F., JANSE, B.J.H., PRETORIUS, Z.A. & MARAIS, A.S., 1996. A physical map of the *Thinopyrum*-derived *Lr19* translocation. *Genome* 39, 1013-1019.
- RAINA, S.N. & RANI, V., 2001. GISH technology in plant genome research. *Methods Cell Sci.* 23, 83-104.
- REIGNAULT, P. & SANCHOLLE, M., 2005. Plant-pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? *C.R. Biol.* 328, 821-833.
- RICHTER, T.E. & RONALD, P.C., 2000. The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol. Biol.* 42, 195-204.
- ROSEWARNE, G.M., SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J. & REBETZKE, G.J., 2008. Quantitative trait loci for slow-rusting resistance in wheat to leaf rust and stripe rust identified with multi-environment analysis. *Theor. Appl. Genet.* 116, 1027-1034.
- ROSEWARNE, G.M., SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J., WILLIAM, H.M., BOUCHET, S., CLOUTIER, S., McFADDEN, H. & LAGUDAH, E.S., 2006. Leaf tip necrosis, molecular markers and β 1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*. *Theor. Appl. Genet.* 112, 500-508.
- SCOTT, D.B., 1990. Wheat diseases in South Africa. p. 22-25; 31-32. Dept. Agric. Develop., Pretoria.

SCOTT, D.B., 1996. Disease control and yield improvement obtained with fungicide applications to spring wheat in South Africa. *Crop Prot.* 15, 167-170.

SEARS, E.R., 1977. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 19, 585-593.

SHANER, G., STORMBERG, E.L., LACY, G.H., BARKER, K.R. & PIRONE, T.P., 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Ann. Rev. Phytopathology* 30, 47-66.

SHARMA, D. & KNOTT, D.R., 1966. The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Can. J. Genet. Cytol.* 8, 137-143.

SHARMA, S., SETHI, G.S. & CHAUDHARY, H.K., 2005. Influence of winter and spring wheat genetic backgrounds on haploid induction parameters and trait correlation in the wheat x maize system. *Euphytica* 144, 199-205.

SHI, J., SONG, Q., SINGH, S., LEWIS, J., WARD, R.W., CREGAN, P. & GILL, B.S., 2003. Genetic and physical maps of *Xbarc* SSR loci in wheat. p. 41-45. *In*: S.M. Canty, J. Lewis & R.W. Ward (reds.). 2003 National fusarium head blight forum proceedings. 13-15 Desember 2003, Bloomington, Minnesota.

SIBIKEEVA, Y.E., SIBIKEEV, S.N. & KRUPNOV, V.A., 2004. The effect of *Lr19*-translocation on *in vitro* androgenesis and inheritance of leaf-rust resistance in DH₃ lines and F₂ hybrids of common wheat. *Russ. J. Genet.* 40, 1003-1006.

SINGH, R.P., HODSON, D.P., JIN, Y., HUERTA-ESPINO, J., KINYUA, M.G., WANYERA, R., NJAU, P. & WARD, R.W., 2006. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB abstracts: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 054, 1-13.

SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J. & ROELFS, A.P., 2002. The wheat rusts. p. 227-250. *In*: B.C. Curtis, S. Rajaram & H. Gómez Macpherson (reds.). Bread wheat: improvement and production. FAO of the UN, Rome.

- SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J. & WILLIAM, H.M., 2005. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. *Turk. J. Agric. For.* 29, 121-127.
- SINGH, R.P., MUJEEB-KAZI, A. & HUERTA-ESPINO, J., 1998. *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88, 890-894.
- SLAFER, G.A. & RAWSON, H.M., 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: A re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Aus. J. Plant Physiol.* 21, 393-426.
- SMITHSON, J.B. & LENNE, J.M., 1996. Varietal mixtures: a viable strategy for sustainable productivity in subsistence agriculture. *Ann. Appl. Biol.* 128, 127-158.
- SORRELLS, M.E., 2007. Application of new knowledge, technologies, and strategies to wheat improvement. *Euphytica* 157, 299-306.
- SOURDILLE, P., SINGH, S., CADALEN, T., BROWN-GUEDIRA, G.L., GAY, G., QI, L., GILL, B.S., DUFOUR, P., MURIGNEUX, A. & BERNARD, M., 2004. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct. Integr. Genomics* 4, 12-25.
- SPIELMEYER, W., McINTOSH, R.A., KOLMER, J. & LAGUDAH, E.S., 2005. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 111, 731-735.
- SPIELMEYER, W., SHARP, P.J. & LAGUDAH, E.S., 2003. Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 43, 333-336.
- SUENAGA, K., 1994. Doubled haploid system using the intergeneric crosses between wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). *Bull. Nat. Inst. Agrobiol. Resour.* 9, 83-139.
- SYDENHAM, S.L., 2007. Pyramiding wheat rust resistance genes using marker-assisted selection. M.Sc. Agric. Tesis, Universiteit van die Vrystaat, Bloemfontein, Suid-Afrika.

TAJI, A., KUMAR, P. & LAKSHMANAN, P., 2002. *In vitro* plant breeding. p. 45-56. Food Products Press, Binghamton, New York.

THOMAS, W.T.B., FORSTER, B.P. & GERTSSON, B., 2003. Doubled haploids in breeding. p. 337-349. *In: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster & I. Szarejko (reds.). Doubled haploid production in crop plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.*

TILMAN, D., CASSMAN, K.G., MATSON, P.A., NAYLOR, R. & POLASKY, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-677.

VAN DER BIEZEN, E.A. & JONES, J.D.G., 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* 23, 454-456.

VAN DER PLANK, J. E., 1968. Disease resistance in plants. p. 6-11. Academic Press, New York.

VERMA, V., BAINS, N.S., MANGAT, G.S., NANDA, G.S, GOSAL, S.S. & SINGH, K., 1999. Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat x maize system. *Crop Sci.* 39, 1722-1727.

VISSER, B., HERSELMAN, L. & PRETORIUS, Z.A., 2009. Genetic comparison of Ug99 with selected South African races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mol. Plant Pathol.* 10, 201-222.

WANYERA, R., KINYUA, M.G., JIN, Y. & SINGH, R.P., 2006. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa. *Plant Dis.* 90, 113.

WIESE, M. V., 1987. Compendium of wheat diseases, 2de uitg., p. 37-42. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minesota.

WILLIAM, H.M., TRETOWAN, R. & CROSBY-GALVAN, E.M., 2007. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica* 157, 307-319.

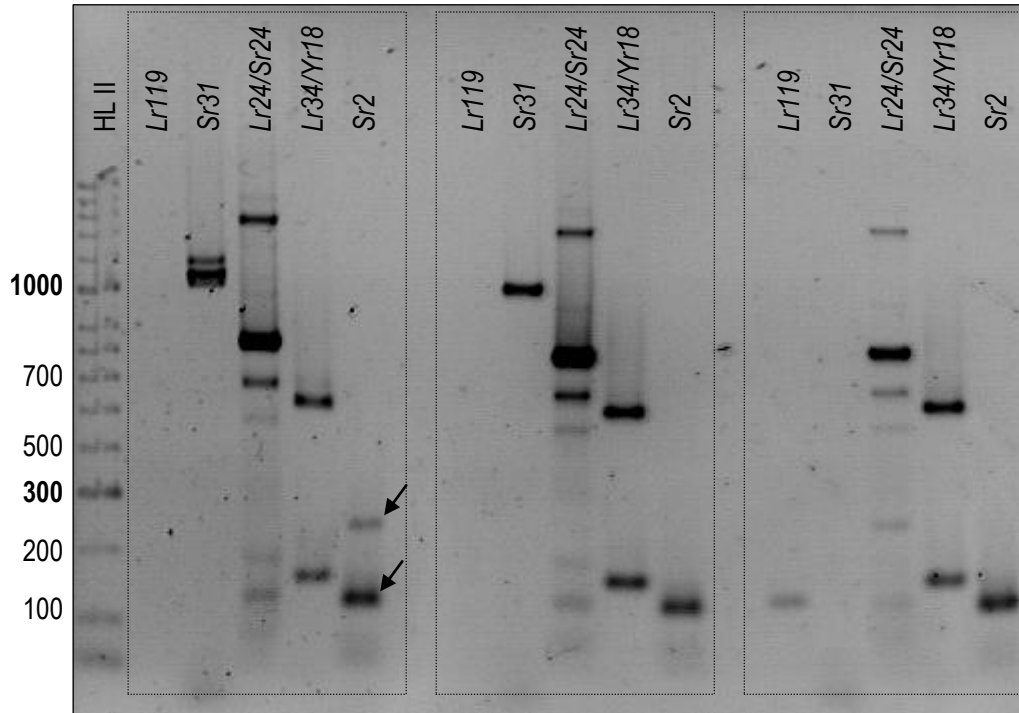
WILLIAM, M., SINGH, R.P., HUERTA, J., PALACIOS, G., SUENAGA, K. & HOISINGTON, D., 2001. Characterization of durable rust resistance genes with molecular markers in wheat. p.124-125. *In*: J. Reeves, A. McNab & S. Rajaram (eds.). Proceedings of the Warren E. Kronstad Symposium. 15-17 Maart 2001, Ciudad Obregón, Mexico.

ZHANG, H. & DVOŘÁK, J., 1990. Characterization and distribution of an interspersed repeated nucleotide sequence from *Lophopyrum elongatum* and mapping of a segregaton-distortion factor with it. *Genome* 13, 927-936.

ZHANG, P., FRIEBE, B., GILL, B. & PARK, R.F., 2007. Cytogenetics in the age of molecular genetics. *Aus. J. Agr. Res.* 58, 498-506.

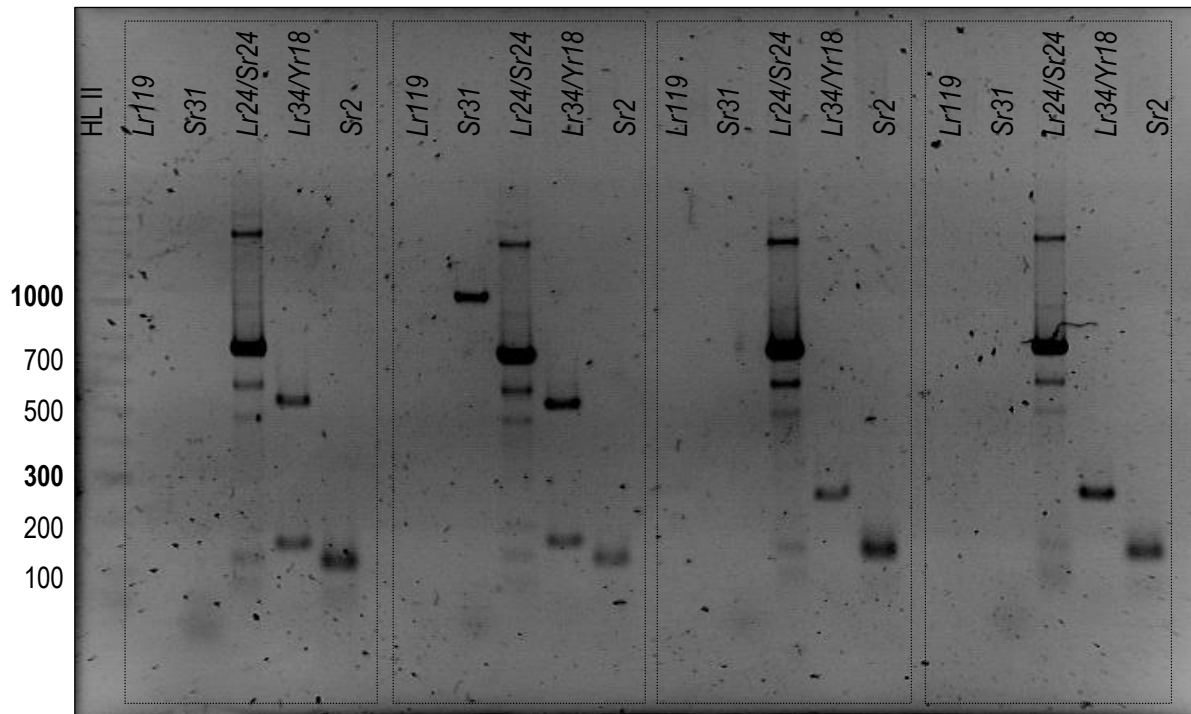
7. ADDENDUM A

Hierdie addendum bevat die jelfoto's wat tydens die tipering van die VH populasie verkry is. Vir elke afsonderlike plant is die vyf merkers langs mekaar op die jel gelaai.

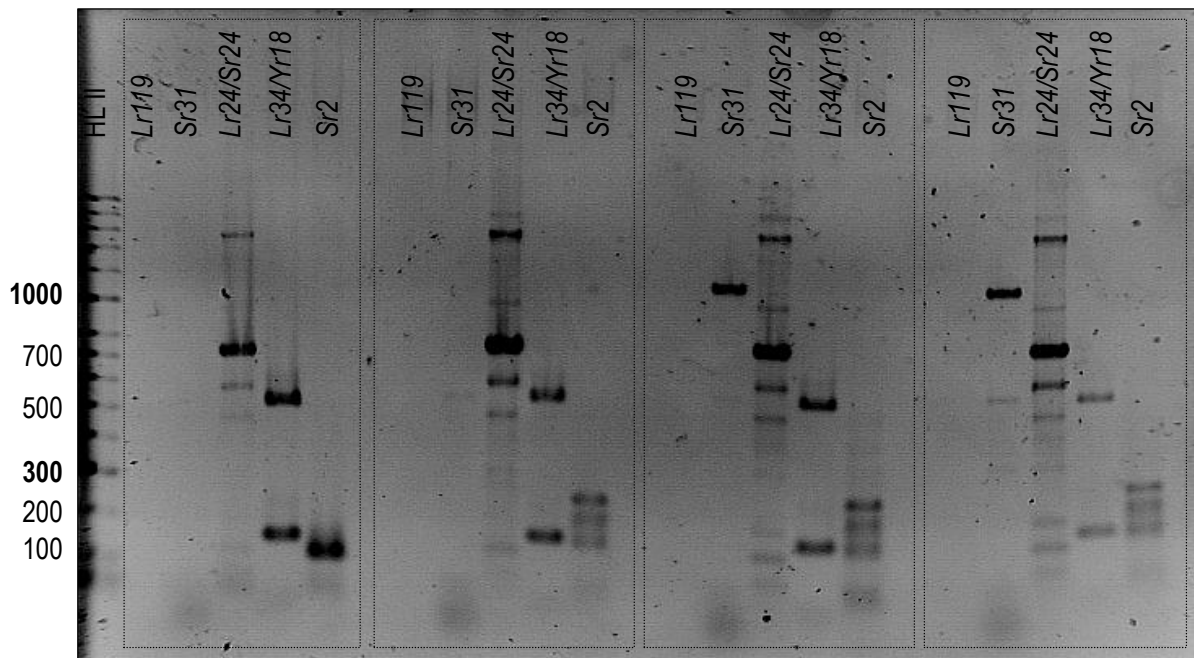


Figuur 7.1 Tipering van VH plante lyne 1-3 vir weerstandsgentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH3.27-17 (5);
L7-11: Lyn VH3.27-18 (2); **L12-16:** Lyn VH3.27-18 (3)

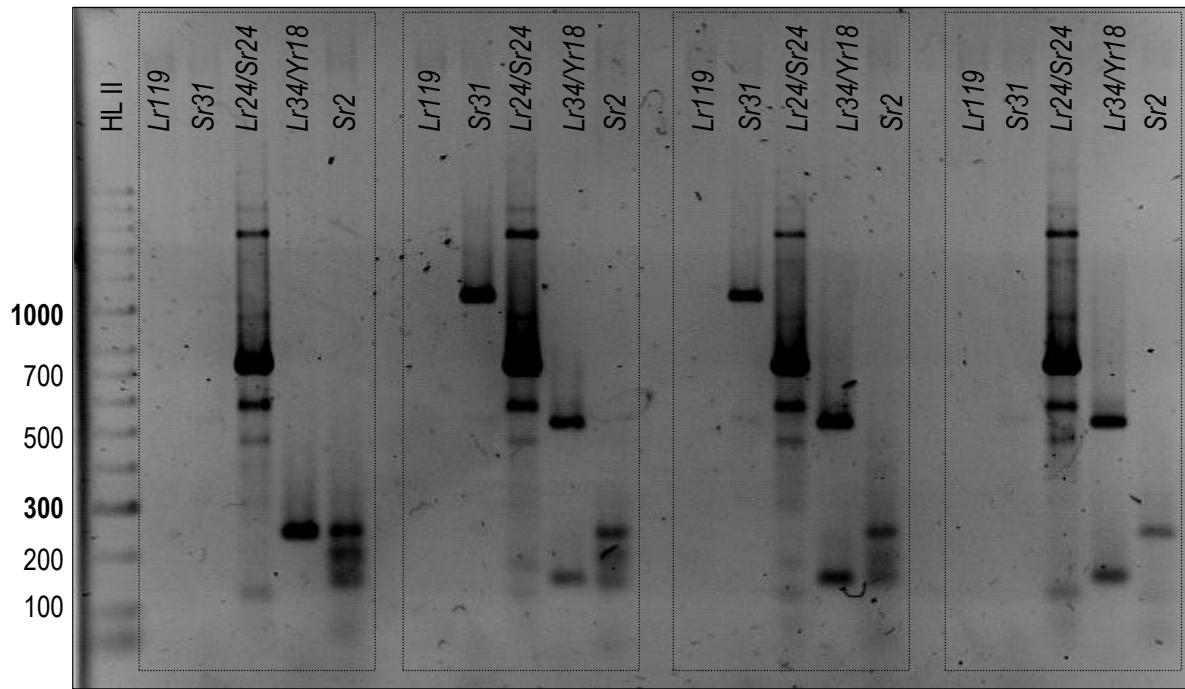
Die bostaande figuur toon aan dat plant VH3.27-17 (5) positief toets vir beide die positiewe alleel (120 bp) en die negatiewe alleel (243 bp) van *Sr2*. Hierdie plant is dus 'n heterosigoot en nie 'n verdubbelde haploïed nie. Die plant is dus uitgegooi.



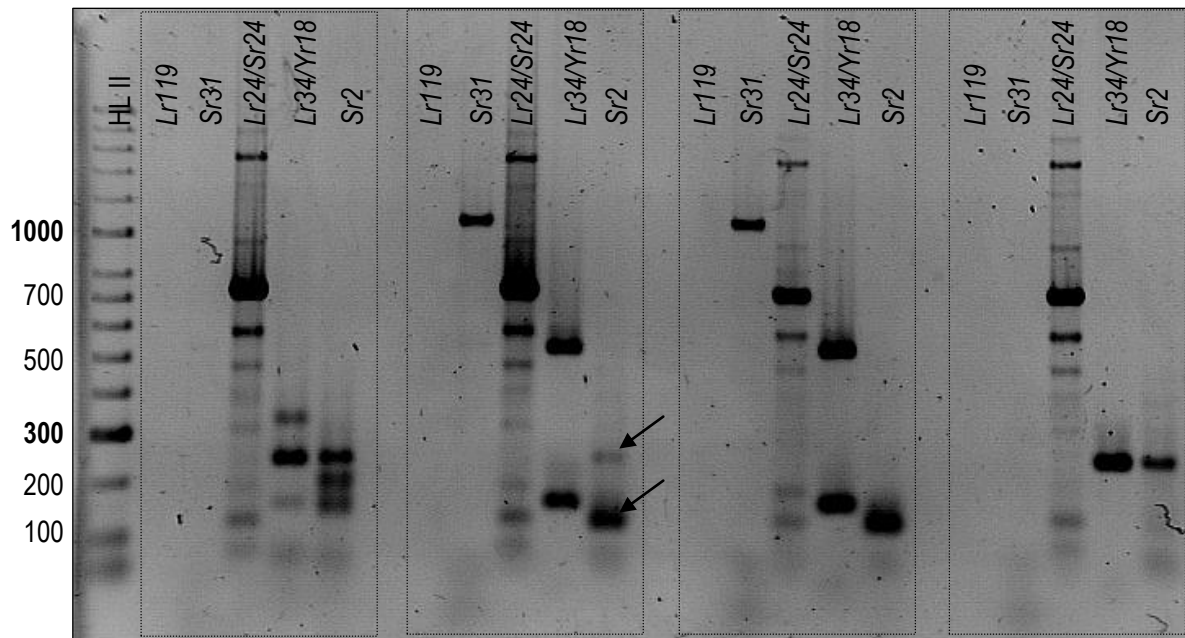
Figuur 7.2 Tipering van VH plante lyne 4-7 vir weerstandsgeentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH3.27-22 (3);
L7-11: Lyn VH3.27-27 (4); **L12-16:** Lyn VH3.27-28 (4); **L17-21:** Lyn VH3.27-28 (6)



Figuur 7.3 Tipering van VH plante lyne 8-11 vir weerstandsgeentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH3.27-27 (7);
L7-11: Lyn VH7.15-20 (2); **L12-16:** Lyn VH7.15-24 (2); **L17-21:** Lyn VH7.15-25 (5)

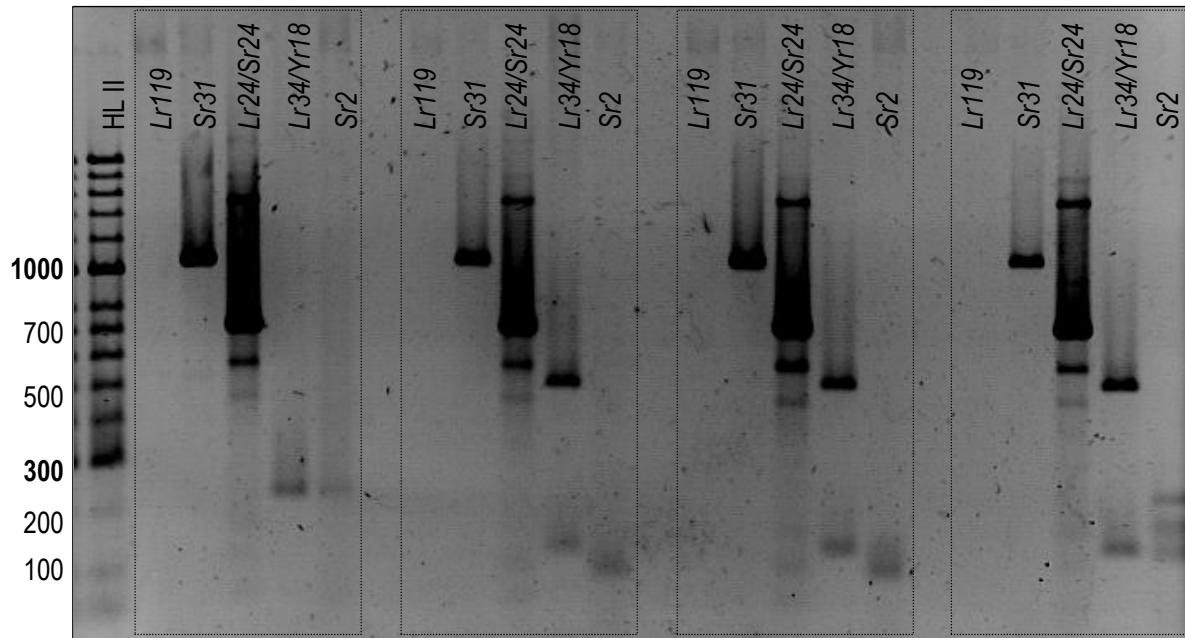


Figuur 7.4 Tipering van VH plante lyne 12-15 vir weerstandsgentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH7.15-26 (4);
L7-11: Lyn VH7.15-27 (3); **L12-16:** Lyn VH7.15-28 (3); **L17-21:** Lyn VH7.15-29 (4)

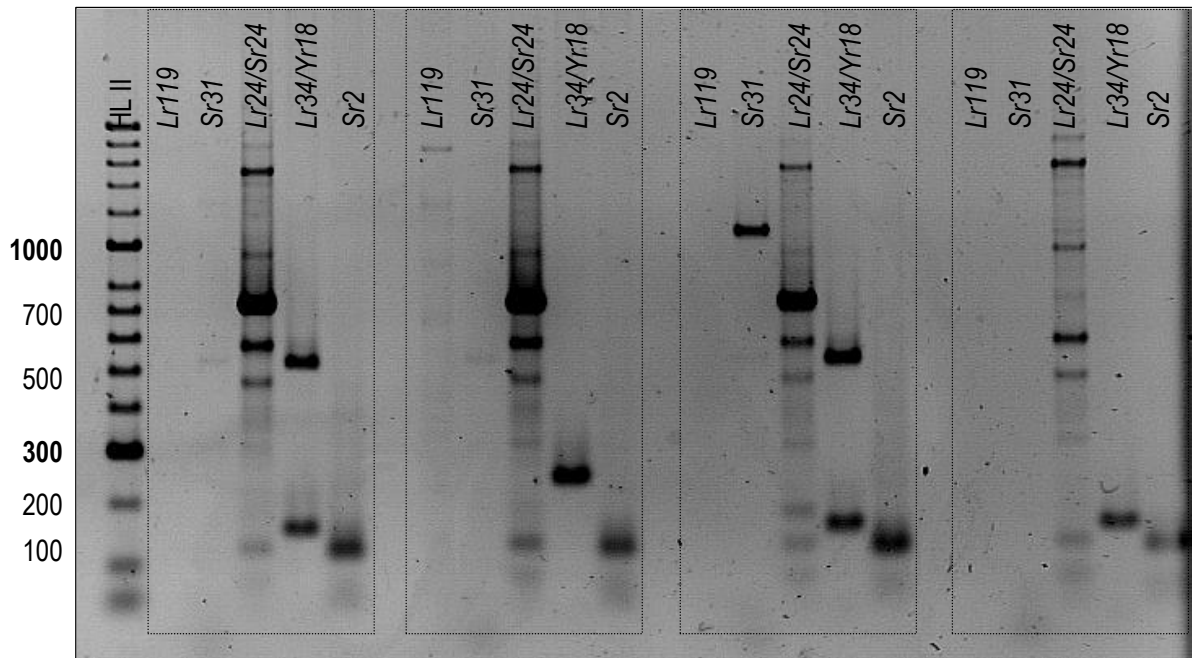


Figuur 7.5 Tipering van VH plante lyne 16-19 vir weerstandsgentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH7.15-32 (3);
L7-11: Lyn VH15.20-13; **L12-16:** Lyn VH15.20-16 (2); **L17-21:** Lyn VH15.20-16 (3)

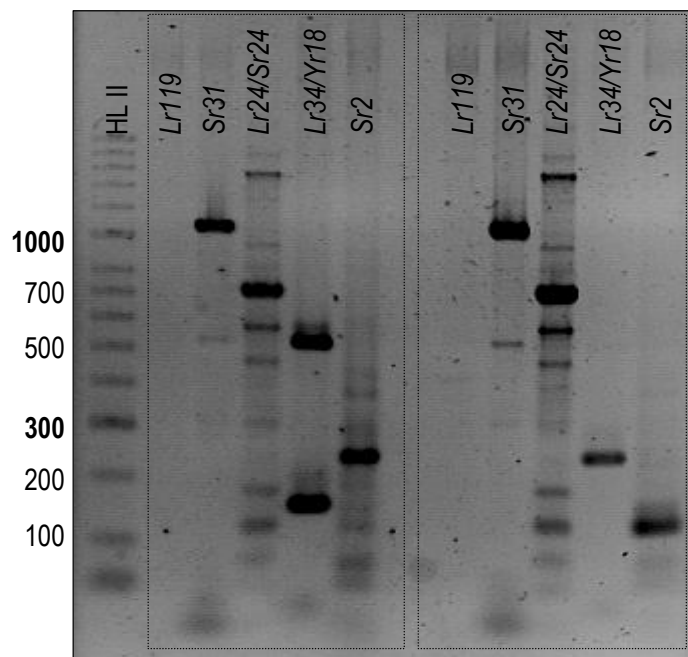
Die voorafgaande figuur toon aan dat plant VH15.20-13 positief toets vir beide die positiewe alleel (120 bp) en die negatiewe alleel (243 bp) van *Sr2*. Hierdie plant is dus 'n heterosigoot en nie 'n verdubbelde haploïed nie. Die plant is dus uitgegooi.



Figuur 7.6 Tipering van VH plante lyne 20-23 vir weerstandsgentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH15.20-19 (2);
L7-11: Lyn VH15.20-20 (2); **L12-16:** Lyn VH15.20-20 (4); **L17-21:** Lyn VH15.20-21 (4)



Figuur 7.7 Tipering van VH plante lyne 24-27 vir weerstandsgentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH15.20-25 (3);
L7-11: Lyn VH15.20-26 (3); **L12-16:** Lyn VH15.20-28 (2); **L17-21:** Lyn VH15.20-29 (2)



Figuur 7.8 Tipering van VH plante lyne 28-29 vir weerstandsgentranslokasies.
L1: Hyperladder II molekulêre massa merker; **L2-6:** Lyn VH15.20-29 (3);
L7-11: Lyn VH15.20-29 (4)