

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Aleksandra M. Dimitrijević

**UPOTREBA MOLEKULARNIH MARKERA I
IN VITRO METODA U DETEKCIJI
OTPORNOSTI SUNCOKRETA PREMA
TRIBENURON-METILU**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Aleksandra M. Dimitrijević

**USE OF MOLECULAR MARKERS AND *IN*
VITRO METHODS FOR DETECTION OF
TRIBENURON-METHYL RESISTANCE IN
SUNFLOWER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

MENTOR:

prof. dr Gordana Šurlan-Momirović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

prof. dr Slaven Prodanović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Dragana Miladinović, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

prof. dr Tomislav Živanović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Siniša Jocić, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

DATUM ODBRANE:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Biotehnološkoj laboratoriji Instituta za ratarstvo i povtarstvo u Novom Sadu.

Zahvaljujem se dr Dragani Miladinović na podršci i korisnim savetima prilikom izrade doktorske disertacije. Takođe, i svojoj mentorki na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, prof. dr Gordani Šurlan-Momirović na korisnim sugestijama tokom pisanja rada.

Zahvalnost dugujem i dr Siniši Jociću na datom biljnom materijalu i sugestijama tokom izrade ove disertacije, kao i podršci prof. dr Slavena Prodanovića i prof. dr Tomislava Živanovića.

Takođe, se zahvaljujem svojim dragim kolegama Milki Glamočić, Gordani Jocić, mr Zvonimiru Sakaču, Snežani Merdović, Ivani Imerovski i Dragani Đokić na divnoj atmosferi u laboratoriji i prijateljskim savetima.

Želim da se zahvalim svojoj porodici na podršci i ljubavi koju su mi pružili.

UPOTREBA MOLEKULARNIH MARKERA I *IN VITRO* METODA U DETEKCIJI OTPORNOSTI SUNCOKRETA PREMA TRIBENURON-METILU

Rezime

U ovom radu su razvijeni *in vitro* test i molekularni markeri za detekciju tolerantnosti suncokreta prema tribenuron-metilu (gen *Ahas11-2*). Pošto proces unošenja gena tolerantnosti povratnim ukrštanjem traje dugo, razvoj *in vitro* testova i molekularnih markera koji bi omogućili detekciju tolerantnih genotipova značajno bi skratio period konverzije linija i hibrida suncokreta u otpornu formu. Od posebnog je značaja razvoj testova i markera koji omogućavaju razlikovanje homozigotno i heterozigotno tolerantnih genotipova.

Za razvijanje *in vitro* testa korišćeno je devet različitih genotipa suncokreta: četiri homozigotno tolerantna, četiri heretozigotno tolerantna i jedan osetljiv. Testiranje je vršeno različitim koncentracijama herbicida, u rasponu od 2,0 μM - 4,0 μM na dve pH, pH 7 i 8. Praćen je uticaj pH podloge i koncentracije herbicida na razvoj nadzemnog dela biljke i korena u cilju identifikacije optimalne kombinacije za detekciju tolerantnih genotipova suncokreta. Tokom testiranja tolerantnosti, razvoj osetljivog genotipa je zaustavljen tri dana nakon postavljanja klijanaca suncokreta u MS podlogu sa prethodno dodatim herbicidom. Sve testirane kombinacije su zaustavile razvoj osetljivog genotipa, dok se za razlikovanje homozigotno tolerantnih od heterozigotnih genotipova najbolje pokazala 3,0 μM na pH 7, a sveža masa korena kao najpovoljnija morfološka osobina za razlikovanje genotipova. Test je omogućio razlikovanje tolerantnih od osetljivog genotipa za 5 dana i homozigotno tolerantnih i heterozigota za 12 dana.

U okviru molekularne analize tolerantnosti suncokreta prema tribenuron-metilu analizirane su tolerantna i osetljiva roditeljska linija, F₁ i F₂ potomstvo. Analizirana je mogućnost upotrebe SSR markera za detekciju tolerantnosti. SSR markeri se nisu pokazali kao pouzdani indikatori tolerantnosti zbog svoje udaljenosti od gena *Ahas11-2*. Stoga su razvijeni CAPS markeri za detekciju tolerantnosti prema tribenuron-metilu. Ispitivane su različite kombinacije prajmera koji su dizajnirani na osnovu sekvence gena *Ahas11-2* i pronađena su tri restrikciona enzima čija se mesta digestije razlikuju između sekvence mutiranog gena *Ahas11-2* i divljeg tipa *ahas11*. Neke kombinacije prajmera i enzima su omogućile razvoj dominantnih CAPS, a neke kodominantnih markera. Razvijeno je šest kodominantnih CAPS markera koji će se koristiti u marker-asistiranoj selekciji.

Ključne reči: Suncokret, tolerantnost prema herbicidima, tribenuron-metil, *in vitro* testiranje, molekularni markeri, MAS, SNP

Naučna oblast: Ratarstvo i povrtarstvo

Uža naučna oblast: Biotehnologija

UDK: 663.542:632.954(043.3)

USE OF MOLECULAR MARKERS AND *IN VITRO* METHODS FOR DETECTION OF TRIBENURON-METHYL RESISTANCE IN SUNFLOWER

Abstract

Development of an *in vitro* test and molecular markers for detection of tribenuron-methyl (*Ahas1-2* gene) tolerance in sunflower is presented in this study. Since, introduction of tolerance in sunflower by conventional breeding takes years, quick tests and molecular markers that can detect tolerant genotypes will shorten the time for developing tolerant sunflower lines and hybrids. Special emphasis of this work was to develop methods for discrimination between homozygous and heterozygous tolerant genotypes, since those methods are the most useful for facilitating backcrossing.

Nine sunflower genotypes: four homozygous tolerant, four heterozygous and one susceptible sulfonylurea genotype were used for development of an *in vitro* test. MS media supplemented with different concentrations of herbicide (in range between 2.0 μM - 4.0 μM) and with pH either 7 or 8 were used for resistance testing. The effect of medium pH and herbicide concentration on above-ground and root mass of sunflower seedlings was observed in order to identify the optimal tribenuron-methyl concentration and pH combination, as well as morphological parameter most useful for resistance testing. All tested herbicide concentrations were found to be suitable for discrimination of tribenuron-methyl susceptible genotype, since the growth of tested susceptible genotype was halted after 3 days of culture on all tribenuron-methyl supplemented media. The best pH and herbicide concentration combination for discrimination between homozygous and heterozygous tolerant sunflower genotypes was 3.0 μM at pH 7, while root mass was found to be the best parameter for discrimination between homozygous and heterozygous tolerant genotypes. The test enabled discrimination between tolerant and susceptible genotypes in 5 days, as well as discrimination between homozygous and heterozygous tolerant genotypes in 12 days.

Molecular analysis of tribenuron-methyl tolerance included resistant and susceptible parental lines, F₁ and F₂ progeny. Analysis of use of SSR markers for tolerance gene detection showed that SSRs were not suitable because of the distance between markers and *Ahas1-2* gene. Therefore, CAPS markers were developed. Specific primers for *Ahas1-2* gene were designed and three restriction enzymes that have different patterns of restriction between resistant *Ahas1-2* gene and wild type, *ahas1*, were identified. Some of the combinations of primers and enzymes showed dominant nature, however six markers proved to be co-dominant. Those markers will be used in marker assisted selection and for shortening long period for backcrossing.

Key words: sunflower, herbicide resistance, tribenuron-methyl, *in vitro* testing, molecular markers, MAS, SNP

Scientific field: Field and Vegetable Crops

Narrow scientific field: Biotechnology

UDK: 663.542:632.954(043.3)

SKRAĆENICE

AFLP - polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism)

AHAS - acetohidroksikisela sintaza

ALS - acetolaktat sintaza

bp - bazni par

CAPS - oslobodene umnožene polimorfne sekvence (eng. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

CTAB - cetiltrimetilamonijum bromid

DALP - direktna amplifikacija dužine polimorfizma (eng. Direct Amplification of Length Polymorphism)

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP - dezoksiribonukleozid trifosfat (eng. Deoxyribonucleoside triphosphate)

EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina

EMS - etil-metan-sulfat

EST - ekspresovana sekvenca (eng. Express Sequence Tag)

IMI - imidazolinoni

INDEL - insercija i delecija (eng. Insertion-Deletion)

LG - grupe vezanosti (eng. Linkage Groups)

LSD - najmanja značajna razlika (eng. Least Significant Difference)

MAS - marker asistirana selekcija (eng. Marker Assisted Selection)

PASA - umnožavanje specifičnih alela PCRom (eng. PCR Amplification of Specific Alleles)

DHPLC - denaturišuća tečna hromatografija visoke performance (eng. Denaturating High-Performance Liquid Chromatography)

PCR - lančana reakcija polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction)

RAPD - polimorfnost slučajno amplifikovane DNK (eng. Random Amplification of Polymorphic DNA)

RFLP - polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism)

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (eng. Single Nucleotide Polymorphism)

SSR – jednostavni kratki ponovci (eng. Simple Sequence Repeat)

SU - sulfonilurea

T_a - temperatura vezivanja prajmera (eng. Annealing Temperature)

Tris-HCl - 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol-hidrohlorid

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	4
3. PREGLED LITERATURE.....	5
3.1. Poreklo suncokreta.....	5
3.1.1. Genom suncokreta.....	6
3.1.2. Razvoj mape vezanosti kod suncokreta	7
3.2. Tolerantnost suncokreta prema AHAS inhibitorima	8
3.3. AHAS inhibitori i sulfoniluree.....	10
3.4. Upotreba različitih laboratorijskih testova za detekciju genotipova tolerantnih prema AHAS inhibitorima.....	14
3.4.1. Razvoj različitih vrsta laboratorijskih testova za analizu tolerantnosti prema herbicidima.....	14
3.4.2. Laboratorijski testovi razvijeni za analizu tolerantnosti kod suncokreta	15
3.5. Upotreba molekularnih markera u marker asistiranoj selekciji	16
3.5.1. Razvoj različitih vrsta markera za detekciju SNP-a.....	16
3.5.2. Molekularna analiza tolerantnih genotipova suncokreta prema AHAS inhibitorima	19
4. RADNA HIPOTEZA	21
5. MATERIJAL I METOD RADA	22
5.1. Razvoj <i>in vitro</i> testa	22
5.1.1. Biljni materijal.....	22
5.1.2. Priprema hranljive podloge za testiranje.....	23
5.1.3. <i>In vitro</i> testiranje tolerantnosti	23
5.1.4. Statistička obrada podataka.....	25
5.2. Razvoj molekularnih markera.....	25
5.2.1. Biljni materijal.....	25
5.2.2. Izolacija DNK i provera čistoće izolovane DNK.....	25
5.2.3. Umnožavanje SSR markerima	26
5.2.4. Razvoj CAPS markera	26

6. REZULTATI	29
6.1. Razvoj <i>in vitro</i> testa	29
6.1.1. Analiza sveže mase nadzemnog dela biljke	32
6.1.2. Analiza suve mase nadzemnog dela biljke.....	34
6.1.3. Analiza sveže mase korena biljke	35
6.1.4. Analiza suve mase korena biljke.....	37
6.2. Upotreba SSR markera za analizu gena <i>Ahas11-2</i>	39
6.3. Molekularna analiza gena <i>Ahas11-2</i>	45
6.3.1. Umnožavanje <i>Ahas11-2</i> gena DNK-specifičnim prajmerima.....	45
6.3.2. Razvoj CAPS markera	48
6.3.3. Optimizacija reakcije digestije enzimima	48
6.3.4. Razvoj dominantnih markera za detekciju tolerantnosti prema tribenuron-metilu	50
6.3.5. Razvoj kodominantnih markera za detekciju tolerantnosti prema tribenuron-metilu.....	52
7. DISKUSIJA	60
7.1. <i>In vitro</i> test za detekciju tolerantnih genotipova.....	60
7.2. Upotreba SSR markera u marker asistiranju selekciji	63
7.3. Učestalost pojave nultih alela usled nehomologije sekvenci gajenog suncokreta i divljih srodnika sucokreta	63
7.3. CAPS markeri	64
8. ZAKLJUČAK.....	67
9. LITERATURA	70
PRILOG 1 – Sastav MS podloge	85
PRILOG 2 – Sastav rastvora koji čine MS podlogu	86
PRILOG 3 – Sterilizacija semena	88
PRILOG 4 - Rastvori za ekstrakciju DNK	89
PRILOG 5 - Protokol za ekstrakciju DNK	90
PRILOG 6 - Sekvence SSR prajmera i pozicija na mapi vezanosti suncokreta	91
PRILOG 7 - PCR programi za umnožavanje DNK SSR markerima.....	92

1. UVOD

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) je jedna od najznačajnijih uljanih kultura na svetu koja se gaji na preko 23 miliona hektara (<http://www.fao.org/>). Potencijal rodosti savremenih hibrida suncokreta varira od 4 do 6 t/ha (Aksyonov, 2007), dok prosečan prinos suncokreta u širokoj proizvodnji varira između 1,5 i 3 t/ha (Škorić i sar., 2007). Jedan od faktora koji negativno utiče na prinos je prisustvo korova. Smanjenje prinosa može da iznosi između 20% i 53% u odnosu na neinficirana polja (Blamey i Zollinger, 1997). Stoga je stvaranje hibrida suncokreta tolerantnih prema herbicidima od izuzetnog značaja u oplemenjivanju.

Acetohidroksikisela sintaza (AHAS, EC2.2.1.6 ili acetolaktat sintaza ALS; EC 4.1.3.18) je prvi enzim u signalnom putu sinteze esencijalnih aminokiselina valina, leucina i izoleucina. Inhibicija sinteze navedene tri esencijalne aminokiseline dovodi do inhibicije deobe ćelija i, konačno, do njene smrti (Umbarger, 1978; LaRossa i Schloss, 1984). Herbicidi koji inhibišu aktivnost ovog enzima su se pokazali kao izuzetno korisni u suzbijanju korova, ne samo kod suncokreta, već i kod velikog broja biljnih vrsta (pšenice, kukuruza, uljane repice, soje, krompira, paradajza itd.). Prednost upotrebe AHAS inhibitora je njihova efikasnost u suzbijanju širokolisnih korova u usevu suncokreta, nakon nicanja. AHAS inhibitori se vrlo često koriste za suzbijanje korova, jer AHAS enzim nije nađen u sisarskim ćelijama, ali je identifikovan u ćelijama algi, gljiva, bakterija i viših biljaka (Chipman i sar., 1998).

Razvoj biljaka tolerantnih prema herbicidima je omogućen otkrićem gena tolerantnosti različitim metodama (kroz proces klasičnog oplemenjivanja, mutagenezom, direktnom selekcijom *in vitro* i transgenom tehnologijom), saznanjima o mehanizmu i ključnom mestu njihovog delovanja na molekularnom nivou, kao i razvojem novih metoda biotehnologije. Kao rezultat navedenog, krajem prošlog veka stvoren je veći broj genotipova tolerantnih prema herbicidima (IT i IR hibridi kukuruza, Smart uljana repica, Roundup Ready[®] soja, kukuruz, šećerna repa, uljana repica, Clearfield[®] kukuruz, uljana

repica, itd.). Teoretski je moguće stvoriti tolerantne biljke prema svim herbicidima, ali komercijalnu primenu imaju ekonomski važnije biljne vrste i herbicidi povoljnih svojstava (glifosat, glufosinat amonijum, sulfoniluree, imidazolinoni i dr.) (Malidža i sar., 1999).

Inhibitorima AHAS pripada 5 hemijski različitih grupa herbicida, a jedna od njih su sulfoniluree. Sulfoniluree sadrže različite aktivne supstance od kojih je jedna tribenuron-metil. Nakon otkrića populacije divljeg suncokreta *Helianthus annuus* L., ANN-KAN u Kansasu (SAD) (Al-Khatib i sar., 1999) tolerantne prema tribenuron-metilu, stvorena je mogućnost proširenja programa oplemenjivanja suncokreta na tolerantnost prema herbicidima. Gen tolerantnosti prema tribenuron-metilu je prenesen u komercijalne linije suncokreta (Miller i Al-Khatib, 2004), a unesen je i u genetički materijal Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu (Jocić i sar., 2008; 2011). Jocić i sar. (2008) su utvrdili dominantan način nasleđivanja tolerantnosti prema tribenuron-metilu.

Promene koje dovode do razvijanja tolerantnosti biljnih vrsta prema AHAS inhibitorima su promene jednog nukleotida (SNP - Single Nucleotide Polymorphism). Kod gajenih biljnih vrsta, do sada je otkriveno 5 različitih SNP koji uslovljavaju pojavu tolerantnosti prema jednom ili više AHAS inhibitora (Tranel i Wright, 2002; Kolkman i sar., 2004). Kod suncokreta je C-T supstitucija na kodonu 197 gena *AHAS1* haplotipa 3 identifikovana kao nosilac tolerantnosti prema hlorsulfuronu (Kolkman i sar., 2004).

Klasično oplemenjivanje na tolerantnost prema herbicidima traje godinama, međutim razvojem tehnika moderne biotehnologije ovaj proces se može znatno ubrzati. Upotrebom *in vitro* metoda i molekularnih markera mogu se identifikovati tolerantni genotipovi suncokreta u nekoliko dana do nedelja. Testiranje tolerantnosti *in vitro* se pokazalo efikasno za detekciju tolerantnih genotipova, jer se njihovom primenom skraćuje vreme potrebno za dobijanje istih rezultata kalsičnim oplemenjivanjem. Vršiti se u kontrolisanim uslovima (temperature, dnevnog režima, vlažnosti) i daje pouzdane rezultate, iste onima na polju (Cirujeda i sar., 2001). Prilikom razvijanja *in vitro* testova najvažnije je poznavati karakteristike molekula herbicida i odrediti koncentraciju herbicida za testiranje. Osim upotrebe *in vitro* testova, pogodna je i upotreba molekularnih markera u marker asistiranoj selekciji (MAS). Za razvoj markera je potrebno razviti mapirajuću populaciju, imati dobru fenotipsku ocenu roditeljskih linija i potomstva i poznavati prirodu promene

koja dovodi do razvijanja tolerantnosti kod biljaka. Najpogodniji markeri za detekciju tolerantnih genotipova su kodominantni markeri, jer omogućavaju razlikovanje homozigotno tolerantnih genotipova od heterozigotno tolerantnih genotipova, te se njihovom upotrebom u MAS značajno skraćuje vreme unošenja gena u linije i hibride suncokreta.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je implementiranje tehnika moderne biotehnologije i molekularne biologije u cilju skraćivanja dugotrajnog procesa oplemenjivanja na tolerantnost prema tribenuron-metilu (aktivna materija herbicida iz grupe sulfonilurea). Praktično to znači kreirati pouzdan *in vitro* test za detekciju tolerantnih genotipova suncokreta i kodominantnog molekularnog markera pogodnog za korišćenje u marker asistiranoj selekciji.

Prvi korak u razvijanju *in vitro* testa je pronalazak najboljeg metoda koji će omogućiti analizu velikog broja biljaka u što kraćem vremenu. Najvažniji momenat je utvrđivanje optimalne koncentracije herbicida koji će omogućiti razlikovanje tolerantnih od osetljivih genotipova, a potencijano i homozigotno tolerantnih od heterozigotno tolerantnih genotipova.

Za razvoj molekularnog markera, važno je poznavati sekvencu gena tolerantnosti prema tribenuron-metilu i prirodu promene koja dovodi do razvijanja tolerantnosti prema herbicidu. Cilj je razvijanje kodominantnog molekularnog markera, odnosno markera koji će omogućiti razlikovanje homozigotno tolerantnih od heterozigotno tolerantnih genotipova i od osetljivih genotipova suncokreta.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Poreklo suncokreta

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) je jedna od retkih poljoprivrednih vrsta koje vode poreklo sa Američkog kontinenta. Pripada rodu *Helianthus*, porodici *Asteraceae*, a ime mu potiče od grčkih reči „helios” što znači sunce i „anthos” što znači cvet. Porodica *Asteraceae* je najveća porodica u biljnom carstvu sa preko 25000 opisanih vrsta koje naseljavaju sve kontinente, sem Antarktiku (Funk i sar., 2005). Rod *Helianthus* čine 67 vrsta: *H. annuus*, *H. tuberosus*, *H. argophyllus*, *H. debilis*, *H. angustifolius*, *H. giganteus*,... (Heiser, 1978).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na postojanje dva centra domestifikacije suncokreta. Jedan centar domestifikacije se nalazi na području istočne Severne Amerike, a drugi u blizini San Andresa u Meksiku (Lentz i sar., 2001). Međutim, Blackman i sar. (2011) su upotrebom molekularnih markera ustanovili da najverovatnije postoji jedno mesto domestifikacije u istočnoj Severnoj Americi. Zapadna domorodačka plemena Severne Amerike su gajila suncokret negde 1000 godine p.n.e., te su ga svojim migracijama prenosila na istok i jug kontinenta. Prvi Evropljani koji su došli na severnoamerički kontinent su se susreli sa suncokretom od Meksika do juga Kanade.

U Evropu, tačnije u Španiju, suncokret je donet u 16. veku (Putt, 1997). Do 19. veka je korišćen kao ukrasna biljka. Tek je u Rusiji suncokret počeo da se koristi i kao industrijska biljka, te dobio svoju ekonomsku primenu. Obzirom na post koji je uobičajen u pravoslavnom hrišćanstvu, ulje suncokreta je bila retka masnoća dozvoljena tokom dugih postova. Selekcija na povećan sadržaj ulja je započela u Rusiji 1860. godine, te je sadržaj ulja u sortama suncokreta povećan sa 28% na oko 50% (Putnam i sar., 1990).

Suncokret ima širok spektar namene. Domoroci u Severnoj Americi su koristili ljusku kao izvor boje, list u medicinske svrhe, a polen u religijskim obredima. U današnje vreme, suncokret predstavlja važan izvor ulja, koristi se u ishrani ljudi, ptica i kao stočna hrana, ali i kao ukrasna biljka. U velikom broju zemalja suncokret je osnovna sirovina za dobijanje ulja (Marinković i sar., 2003). Procenat ulja u uljanim genotipovima se kreće od

40% do 50%. Ulje suncokreta je visokog kvaliteta zbog prisustva visoke koncentracije esencijalne linolne nezasićene masne kiseline. Više od 90% svetske proizvodnje ove kulture čini uljani tip suncokreta. U poslednjih desetak godina proizvodnja suncokreta u svetu je varirala između 21.4 miliona tona u periodu 2001/2002 i 30.1 milion tona u 2006/2007, a poslednjih godina oko 32 miliona tona (<http://www.fao.org>). Najveći proizvođači semena suncokreta su Rusija i Ukrajina, a zatim i zemlje EU, pre svega, Francuska, Mađarska, Italija i Španija (Jan i Seiler, 2006) i Argentina u Južnoj Americi. Prosečan prinos semena suncokreta je 2010. godine u Argentini iznosio 2,32 t/ha, u Ukrajini 1,72 t/ha, Rusiji 1,06 t/ha, Francuskoj i Španiji 0,77 t/ha, a u Srbiji 2,59 t/ha (USDA, <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>).

Posle kukuruza, suncokret je kultura čiji se hibridi najviše koriste u širokoj proizvodnji. Rad na razvijanju inbred linija je počeo u SSSR-u posle Prvog svetskog rata, ali hibridi nisu ulazili u proizvodnju, jer nije bilo muško-sterilnih linija, te je bilo nemoguće proizvesti hibride. Citoplazmatsku mušku sterilnost (cms) je otkrio Francuz Leclercq (Leclercq), 1969. ukrštanjem *Helianthus petiolaris* x *Helianthus annuus*, a godinu dana kasnije je otkriven i gen za restauraciju fertilitnosti (*Rf* geni) (Kinman, 1970). Sa otkrićem citoplazmatske muške sterilnosti i gena restauratora fertilitnosti, sa gajenja sorti prešlo se na gajenje hibrida, što je dovelo do povećanja površine na kojima se suncokret uzgaja.

3.1.1. Genom suncokreta

Genom gajenog suncokreta je velik i sadrži oko 3.5 Gb (Kane i sar., 2011). Generalno, u rodu *Helianthus* haploidan broj hromozoma je 17, a gajeni suncokret je diploid. Osim diploida, kod divljih srodnika suncokreta javljaju se i tetraploidi i heksaploidi. Levan i sar. (1964) su podelili hromozome na medialne, submedijalne, subterminalne i terminalne na osnovu odnosa velikog i malog kraka 1.0 do 1.7 μ , 1.7 do 3.0 μ , 3.0 do 7.0 μ i 7.0 μ . Kod gajenog suncokreta, različiti autori su u zavisnosti od analiziranog materijala uočili prisustvo različitog odnosa medijalnih, submedijalnih i subteličnih hromozoma. Raicu i sar. (1976) su ispitivanjem sorte Record uočili prisustvo 10 medijalnih, 3 submedijalnih i 4 subteličnih hromozoma. Godinu dana kasnije, Al-Allaf i

Godward (1977) su kod svih ispitivanih bugarskih i rumunskih sorti koje vode poreklo od ruske sorte Peredovik, zatim jedne sorte iz Iraka i jednog prirodnog hibrida uočili prisustvo 4 medijalnih, 8 submedijalnih i 5 subteličnih hromozoma. Kulshreshtha i Gupta (1981) su analizom *H. annuus*-a uočili prisustvo 5 medijalnih, 10 submedijalnih i 2 subteličnih hromozoma.

3.1.2. Razvoj mape vezanosti kod suncokreta

Različiti markeri su korišćeni za konstrukciju mape vezanosti (linkage map). RFLP (Random Fragment Length Polymorphism) markeri su prvi korišćeni za mapiranje genoma suncokreta u Odeljenju za istraživanje suncokreta u USDA-ARS (Sunflower Research Unit) (Jan i sar., 1992 prema Hu, i sar., 2010). U konstrukciji ove mape je učestvovala jedna privatna kompanija, te je ova mapa objavljena tek posle izvesnog vremena od konstruisanja. Prva mapa vezanosti gajenog suncokreta konstruisana upotrebom RFLP markera je objavljena 1995. godine (Berry i sar., 1995; Gentzbittel i sar., 1995). Kasnije je mapa dopunjivana novim probama (Berry i sar., 1996, 1997; Jan, 1998; Gentzbittel i sar., 1999). Početkom devedesetih godina prošlog veka, konstruisana je i mapa vezanosti upotrebom RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markera (Rieseberg i sar., 1993; Rieseberg, 1998) i AFLP markera (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Peerbolte i Peleman, 1996). Početkom 21. veka, Langar i sar. (2003) su mapirali genom suncokreta kombinovanjem AFLP i DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism) markera.

Genom suncokreta je bogat repetitivnim sekvencama. Cavallini i sar. (2009) su uočili da oko 62% genoma suncokreta čine repetitivne sekvence, dok su preliminarne analize Kane i sar. (2011) pokazale da je ovaj postotak veći (78.5%). Postojanje kratkih repetitivnih sekvenci u genomu suncokreta je omogućilo konstruisanje relativno bogate mape vezanosti SSR (Simple Sequences Repeat) markerima, jer se dužina kratkih repetitivnih sekvenci uglavnom razlikuje između različitih genotipova suncokreta. Na osnovu EST (Express Sequences Tag) sekvenci koje su prijavljene u bankama gena razvijeni su SSR markeri suncokreta. Brunel (1994) je prvi dizajnirao SSR marker za suncokret, dok je nekoliko godina potom objavljen veliki broj SSR markera i kreirane su mape vezanosti

na nekoliko različitih mapirajućih populacija (Paniego i sar., 2002; Tang i sar., 2002, 2003; Yu i sar., 2003). Kasnije su Heesacker i sar. (2008) na osnovu EST sekvenci dopunili mapu vezanosti SSR markerima i razvili INDEL (Insertion-Deletion) markere.

Sa razvojem novih molekularnih tehnika počeo je razvoj SNP markera (Single Nucleotide Polymorphism). Kod suncokreta je uočena nešto veća učestalost pojave SNP-a u odnosu na prosek koji se javlja kod biljaka (Hu i sar., 2010). Međutim, Liu i Burke (2006) su uočili da je stepen polimorfnosti kod divljih srodnika suncokreta u najmanju ruku na istom nivou kao kod ostalih divljih vrsta, dok je kod gajenog suncokreta zadržano između 40-50% polimorfnosti u odnosu na divlji suncokret. Liu i Burke (2006) su uočili da je učestalost SNP-s u genomu gajenog suncokreta 1SNP/38.8 bp, dok su Kolkman i sar. (2007) uočili da je ova frekvencija nešto manja 1SNP/45.7 bp. U nekodirajućim sekvencama frekvencija pojave SNP-a je veća (1SNP/32.1 bp) nego u kodirajućim sekvencama (1SNP/62.8 bp).

Razvojem novih „high throughput“ metoda poslednjih nekoliko godina počeo je razvoj novih SNP mapa suncokreta. Do sada je većina ovih markera u rukama privatnih kompanija, te nedostupna opštoj naučnoj javnosti. Venkatramana i sar. (2012) su koristili Illumina Assay Design Tool za ispitivanje i razvoj SNP i INDEL markera kod suncokreta. Burke i sar. (2012) su takođe razvili svoju platformu i razvili SNP mapu vezanosti suncokreta.

3.2. Tolerantnost suncokreta prema AHAS inhibitorima

Suncokret kao biljna vrsta nije bio uključen u ispitivanjima u početnim fazama oplemenjivanja gajenih biljaka na tolerantnost prema herbicidima, iako korovi značajno umanjuju njegov prinos. Kod suncokreta je poseban problem nedostatak efikasnih herbicida za suzbijanje širokolisnih korova i za primenu posle nicanja useva (Jocić i sar., 2001; 2011; Dimitrijević i sar. 2010a). Postojeće hemijske mere nisu efikasne u suzbijanju krupnosemenih širokolisnih korova, a postojeći zemljišni herbicidi često ne daju zadovoljavajući efekat u suzbijanju sitnosemenih korova, a posebno u godinama sa deficitom padavina nakon njihove primene (Malidža i sar., 2004). Stoga, je pronalazak

izvora tolerantnosti prema AHAS inhibitorima omogućio i proširenje programa oplemenjivanja kod suncokreta.

Kao posledica intenzivne upotrebe AHAS inhibitora, na polju soje na kojem je imazapir korišćen 7 uzastopnih godina pojavile su se prve biljke samoniklog suncokreta koje su razvile tolerantnost na ovaj herbicid. Prva populacija suncokreta tolerantna prema nekom od AHAS inhibitora je bila populacija suncokreta ANN-PUR (Al-Khatib i sar., 1998). Gen tolerantnosti iz ove populacije je unesen u komercijalne hibride suncokreta (Miller i Al-Khatib, 2000). Nakon otkrića populacije divljeg *Helianthus annuus* L. (ANN-KAN) u Kansasu (SAD) (Al-Khatib i sar., 1999) tolerantne na herbicid iz grupe sulfoniluree tj. tribenuron-metil, stvorena je mogućnost proširenja programa oplemenjivanja suncokreta na tolerantnost prema herbicidima. Kasnije su pronađene i druge populacije divljeg suncokreta, kao npr. Severnoj Dakoti, SAD, tolerantne prema imazetapiru i hlorimuron-metil (White i sar., 2002; 2003).

Kao kod drugih biljnih vrsta, tako se i kod suncokreta u poslednjih nekoliko godina intenzivno radi na otkrivanju novih izvora tolerantnosti prema jednom, a poželjnije prema više AHAS inhibitora. Tako su Sala i sar. (2008 a; b) razvili liniju suncokreta, CLHA-Plus, upotrebom indukovane mutacije semena EMS-om (etil-metan-sulfatom). Ova linija je potpuno osetljiva na sulfoniluree, ali tolerantna prema nekoliko herbicida iz grupe imidazolinona (imazamoks, imazapir and imazapik). Sala and Bulos su 2011. godine razvili inbred liniju suncokreta, RW-B ukrštene tolerantnosti prema sulfonilureama i imidazolinonima.

Prvi registrovani genotipovi suncokreta, tolerantni na tribenuron-metil su razvijeni u USDA-Fargo, Severna Dakota. To su populacije SURES-1 (Reg. no. GC-28, PI 633749) i SURES-2 (Reg. no. GC-29, PI 633750) (Miller i Al-Khatib, 2004). SURES-1 je populacija majki, dok je SURES-2 restorer populacija. Gen, nosilac tolerantnosti prema tribenuron-metil je tačkasta mutacija na genu *AHAS1* haplotipa 3 (koji potiče od ANN-KAN tolerantne divlje populacije *Helianthus annuus* L.) (Kolkman i sar., 2004). Ovaj gen je unet u genetički materijal Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu (Jocić i sar., 2008; 2011). Zbog velikog broja prijavljenih gena nosilaca tolerantnosti prema jednom ili više herbicida iz grupe AHAS inhibitora, Sala i sar. (2008b) su predložili promenu

nomenklature divljeg tipa gena (osetljiv genotip) i različitih gena tolerantnosti. Pa su, tako, divlji tip označili sa *ahas11*, zatim nepotpuno dominantan alel *Imr1* ili Ar_{pur} sa *Ahas11-1*, alel Ar_{kan} sa *Ahas11-2*, *Ahas11-3* alel koji je prisutan u CLHA-Plus i *Ahas11-4* koji je prisutan u liniji RW-B. Oznaka je *ahas1* zato što ove sekvence suncokreta kodiraju katalitičku (veliku) subjedinicu AHAS enzima (1 je od large subunit), te je na ovaj način razlikujemo od regulatorne (male) subjedinice AHAS enzima.

Geni tolerantnosti prema AHAS inhibitorima su najčešće dominantni geni (puna ili parcijalna dominacija). Jocić i sar. (2004; 2008) su utvrdili dominantan način nasleđivanja tolerantnosti prema tribenuron-metilu i parcijalnu dominaciju prema imidazolinonima. Bruniard i Miller (2001) su prilikom prenosa tolerantnosti prema imidazolinonima iz divljeg *Helianthus annuus* L. u gajene hibride, primetili prisustvo gena koji modifikuje efekat dominantnog gena tolerantnosti prema ovom hibridu, te su zaključili da potpuno tolerantne biljke moraju da poseduju oba gena (*Imr1* i *Imr2*) u dominantnom obliku.

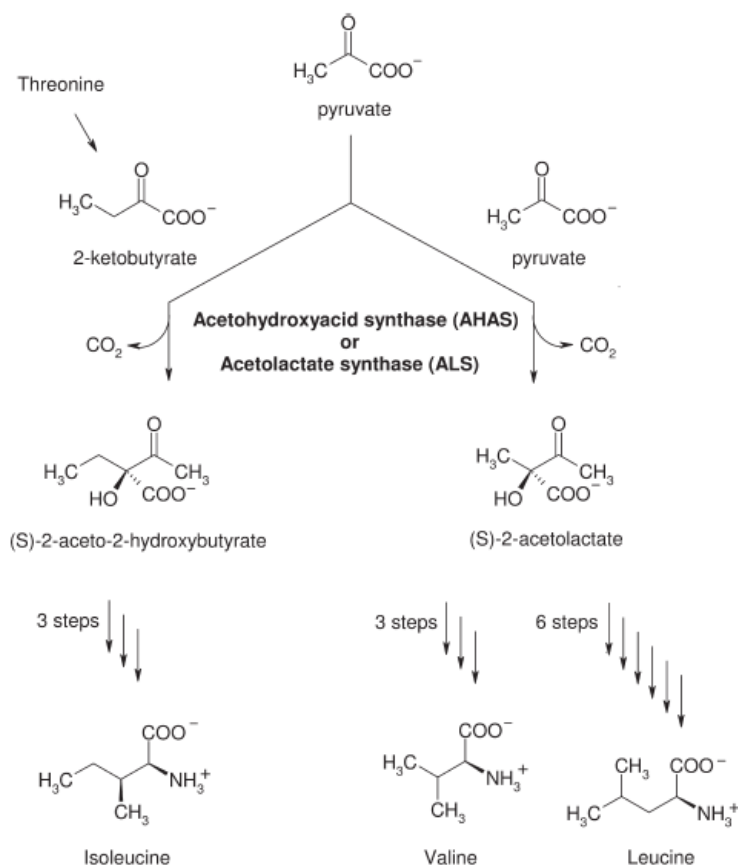
Tolerantnost prema tribenuron-metilu je označena kao „target site-based” (Preston i Mallory-Smith, 2001). Kod suncokreta je pronađen veći broj tačkastih mutacija na vezujućem domenu AHAS. Kolkman i sar. (2004) su identifikovali tri gena (*AHAS1*, *AHAS2* i *AHAS3*) u tolerantnim (mutantnim) i osetljivim (divlji tip) genotipovima. Ovi geni su mapirani na različitim LG (Linkage Group - grupa vezanosti): *AHAS1* na LG2, *AHAS2* na LG6 i *AHAS3* na LG9. Kod gena *AHAS1* utvrđeno je postojanje čak 48 SNP-a, jedan indel veličine 6 bp u genu *AHAS2* i jedan SNP kod gena *AHAS3*. Neke od ovih promena nose tolerantnost prema AHAS inhibitorima, međutim one su različitog nivoa u zavisnosti o vrste herbicida.

3.3. AHAS inhibitori i sulfoniluree

Herbicidi koji pripadaju familiji AHAS inhibitora su vrlo efikasni u suzbijanju širokolisnih korova, ali i pojedinih travnih korova. Ovoj familiji herbicida pripada bar pet hemijski različitih grupa herbicida: sulfoniluree, sulfonilamino-karbonil-triazolinonini, pirimidinil-oxibenzoati, triazolopirimidini i imadazolinoni (Corbett i Tardif, 2006; Menne i Kocher, 2007). Sve ove grupe herbicida imaju isti način delovanja, tj. inhibiciju aktivnosti

enzima AHAS, odnosno imaju visoko specifičnu aktivnost (Beckie i sar., 2000). Razlikuje se jedino domen za koji se vezuju molekuli herbicida.

AHAS predstavlja prvi enzim koji učestvuje u sintezi tri esencijalne, razgranate aminokiseline: valina, leucina i izoleucina (sl. 1) (Umbarger, 1978; LaRossa i Schloss, 1984). U signalnom putu sinteze valina i leucina katališe reakciju u kojoj učestvuju dva molekula piruvata, pri čemu se gubi jedan molekul ugljen dioksida i nastaje (S)-2-acetolaktat, dok u signalnom putu sinteze izoleucina katališe reakciju nastanka (S)-2-aceto-2-hidroksibutirata iz molekula piruvata i 2-ketobutirata. U navedenim reakcijama učestvuju i kofaktori AHAS enzima: tiamin difosfat (ThDP) i flavin adenin dinukleotid (FAD) i divalent jona metala, obično Mg^{2+} .



Slika 1. Uloga AHAS u sintezi razgranatih aminokiselina (Thompson, 2007)

Sulfoniluree su prva otkrivena grupa herbicida koja inhibišu AHAS. Sulfoniluree karakteriše prisustvo sulfonilurea mosta koji povezuje heterocikličan prsten koji sadrži azot sa aromatičnim prstenom (alkil radikal, koji se preko sumpora vezuje za sulfonilurea most) (sl. 2). Prvi istraživač koji je radio sa sulfonilureama je Koog (1966). George Levitt je kasnije, sedamdesetih godina prošlog veka, počeo da sintetiše sulfoniluree i 1977. godine patentirao prvu sulfonilureu. Upotreba sulfonilurea u komercijalne svrhe je počela tek 1982. godine, a prvi preparat koji se upotrebljavao za suzbijanje širokolisnih korova bio je Glean (aktivna materija - hlorsulfuron). Od tada su se herbicidi iz grupe sulfonilurea pokazali kao izuzetno važni u suzbijanju korova kod velikog broja vrsta, kao npr. uljane repice, soje, kukuruza, pšenice, krompira, paradajza i dr. Kod suncokreta, upotreba sulfonilurea ima poseban značaj, jer za suzbijanje korova na poljima suncokreta postoji mali broj herbicida. Postoji više prednosti upotrebe sulfonilurea za suzbijanje korova, a to su:

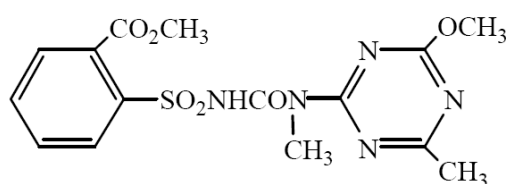
- visok stepen efikasnosti za suzbijanje korova nakon nicanja
- AHAS enzim nije nađen u sisarskim organizmima, te ispoljava nizak nivo toksičnosti u sisarskim ćelijama, ali je zato identifikovan u ćelijama algi, gljiva, bakterija i viših biljaka (Chipman i sar., 1998)
- nisku količinu herbicida je potrebno upotrebiti na polju u cilju suzbijanja korova i ona se kreće između 9 i 18 g a.m./ha (Janjić, 2002).



Slika 2. Osnovni izgled sulfoniluree

Tribenuron-metil predstavlja samo jednu od različitih aktivnih materija koji pripadaju sulfonilureama. Hemijski naziv mu je 2-[[[(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il) metil-amino] karbonil] amino] sulfonil] benzoat (C.A.) (sl. 3). Prvi put je opisan 1985. godine (Ferguson i sar., 1985), a prvi put je primenjen dve godine kasnije. Komercijalizovala ga je firma DuPont. Tribenuron-metil je supstanca svetlo braon boje i

nalazi se u obliku granula. Rastvorljiv je u vodi i organskim rastvaračima (npr. acetonu, acetonitrilu, ugljentetrahloridu, etil acetatu, heksanu, metanolu). Stabilan je na temperaturi do 45°C i pH 8-12, a brzo se razlaže na pH manjoj od 7 (Janjić, 2002). Kisela hidroliza je glavni put hidrolize tribenuron-metila, kao i svih sulfonilurea (Sarmah i sar., 2000; Sarmah i Sabadie, 2002). U zemljištu poluživot tribenuron-metila je 1-7 dana (Janjić, 2002), a slabo se razlaže fotodegradacijom.



Slika 3. Strukturna formula tribenuron-metila

Tribenuron-metil se koristi za suzbijanje širokolisnih korova u ekstenzivnoj poljoprivredi i pri slaboj rotaciji (Janjić, 2002; 2009). Prednost njegove upotrebe je što se brzo apsorbira folijarno i korenima i brzo se translocira u biljci. Primenjuje se posle nicanja, zaustavlja rast osetljivih korova odmah i dovodi do smrti biljke 7-21 dana posle prskanja (Janjić, 2002). Tribenuron-metil je manje postojan u zemlji u odnosu na ostale sulfoniluree (npr. hlorsufuron i metsufuron) jer podleže brzom hidrolizi (Beyer i sar., 1987).

Iako je prvobitno korišćen za suzbijanje korova strnih žita, tribenuron-metil se uspešno koristi i za suzbijanje korova suncokreta. Kod suncokreta se tribenuron-metil pokazao vrlo efikasan za suzbijanje palamide (*Cirsium arvense*), *Xanthium strumarium* i *Sinapsis arvensis*, ali i *Ambrosia artemisiifolia* (Malidža i sar., 2006). Dicu i sar. (2009) su preporučili upotrebu tribenuron-metila do vegetativne faze suncokreta od 6-8 parova listova. Većina autora koristi herbicid čija je aktivna materija tribenuron-metil (Granstar, DuPont ili Express, DuPont) kada je suncokret u vegetativnoj fazi od 4-6 parova listova u poljskim uslovima (Beres i sar., 2005; Sarpe i sar., 2007; Božić i sar., 2012). Božić i sar. (2012) su upotreбили herbicid Express kada je suncokret bio u fazi 4 parova listova u staklari.

3.4. Upotreba različitih laboratorijskih testova za detekciju genotipova tolerantnih prema AHAS inhibitorima

3.4.1. Razvoj različitih vrsta laboratorijskih testova za analizu tolerantnosti prema herbicidima

Kako je razvoj useva tolerantnih prema herbicidima postao bitan u oplemenjivanju, potreba za razvojem brzih i pouzdanih testova za identifikaciju tolerantnih genotipova prema herbicidima se povećala. Prednosti korišćenja laboratorijskih testova su da oni ne zavise od uslova spoljašnje sredine i mogu da se koriste za testiranje velikog broja biljaka u kratkom vremenskom periodu (Dimitrijević i sar., 2012). Ovi testovi su jeftiniji, od onih koji se izvode u polju, i zahtevaju daleko manje vremena istraživača i površine na kojoj se ispitivanje vrši.

Prvi testovi koji se koriste za analizu tolerantnih i osetljivih genotipova su *in vivo* i *in vitro* biotestovi koji se baziraju na merenjima aktivnosti AHAS enzima. Ovi biotestovi se koriste u prvim koracima evaluacije stepena tolerantnosti različitih korova: *Amaranthus rudis* (Hinz i Owen, 1997), *Galium spurium* (Hall i sar., 1998), *Kochia scoparia* (Kwon i Penner, 1995), *Monochoria vaginalis* (Kuk i sar., 2003). Baziraju se na merenju akumulisanog acetoina koji nastaje usled inhibicije aktivnosti enzima ketoacid reduktoizomeraze (KARI), koji predstavlja drugi enzim u putu sinteze valina, leucina i izoleucina (sl. 1) (Corbett i Tardif, 2006). Mana ovih testova je što zahtevaju mnogo vremena i rada.

Nekoliko autora je analiziralo mogućnost upotrebe testa naklijavanja semena u petri posudama u cilju skraćenja vremena testiranja. Burnet i sar. (1994) su tretirali otpornu i osetljivu populaciju *Lolium rigidum* Gaudin. različitim koncentracijama sulfometurona (0.09 do 27 nM) i odredili koncentraciju od 27 nM kao potencijalno preporučenu za testiranje *L. rigidum* na tolerantnost prema sulfometuron. Cirujeda i sar. (2001) su testirali tolerantne i osetljive populacije *P. rhoeas* prema tribenuron-metilu na agarnoj podlozi i pri različitim koncentracijama herbicida (0.24-7.68 μ M) bez giberelina i sa giberelinom u rasponu koncentracija herbicida od 7.68 do 122.88 μ M. Ovaj test ima određene prednosti, koje se pre svega ogledaju u brzini dobijanja rezultata, koji se prema Cirujeda i sar. (2001)

skoro potpuno poklapaju sa testiranjem *in vivo*. Druga vrsta testa u petri posudama podrazumeva analizu klijavosti polena. Richter and Powles (1993) su koristili ovaj test za ispitivanje tolerantnosti *L. rigidum* prema različitim AHAS inhibitorima dodajući sulfometuron-metil, triasulfuron ili imazapir u agarnu podlogu i prateći klijavost polena nakon 2 h. Nedostatak ovog testa je da se ne mogu otkriti tolerantni genotipovi ako mehanizam tolerantnosti nije izražen u polenu. Treća vrsta testa podrazumeva analizu nekroze lisnog diska u petri posudama, u kojima je lisni disk različitih biotipova *Amaranthus*-a gajen na hranljivoj podlozi sa dodatkom hloransulama, imazetapira ili hlorimurona (Patzoldt i Tranel, 2002; 2007). U ovom testu je uočena nekroza lista kod osetljivih genotipova.

Saunders i sar. (1992) su koristili *in vitro* test za detekciju tolerantnih genotipova šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) prema hlorsulfuronu putem odabira somatskih ćelija. Takođe, kultura embriona je korišćena za testiranje tolerantnosti nekoliko jarih i ozimih sorti pšenice (*Triticum aestivum* L.) prema različitim herbicidima iz grupe sulfonilurea (Kondić-Špika i Jevtić, 2002; Kondić-Špika i sar., 2009).

3.4.2. Laboratorijski testovi razvijeni za analizu tolerantnosti kod suncokreta

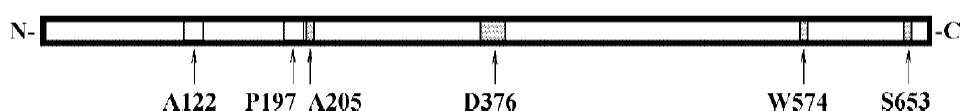
Kod divljih populacija i hibridnog suncokreta korišćeni su različiti testovi za analizu tolerantnosti prema AHAS inhibitorima. Kao i kod svih do sada otkrivenih tolerantnih genotipova, analizirana je aktivnost AHAS enzima *in vitro* i *in vivo* metodama. Baumgartner i sar. (1999) su analizirali pojavu ukrštene tolerantnosti divljeg suncokreta prikupljenog na polju soje kod Rossville-a (Kansas, SAD) tolerantnog prema imazamoksu i tifensulfuronu, hlorimuronu i hloransulamu *in vitro* testom, dok su Zelaya i Owen (2004) *in vivo* analizirali AHAS aktivnost kod divljeg suncokreta sakupljenog kod Cherokee (Iowa, SAD) i utvrdili heterogenu ukrštenu tolerantnost prema imazetapiru i hlorimuronu. Vrbničanin i sar. (2008) su analizirali aktivnost AHAS enzima *in vivo* kod Rimi hibrida suncokreta (Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad) pri različitim koncentracijama imazetapira, dok su Božić i sar. (2012) analizirali tolerantnost hibrida Rimi prema imazamoksu i Rsu prema tribenuron-metil u merenju aktivnosti AHAS enzima *in vitro*.

Vega i sar. (2009) su razvili brz „soil-less” (bez upotrebe zemlje) test za detekciju tolerantnih genotipova suncokreta prema imazapiru, dok su Breccia i sar. (2011) koristili *in vitro* test naklijavanja za detekciju suncokreta tolerantnog prema imazapiru.

3.5. Upotreba molekularnih markera u marker asistiranoj selekciji

3.5.1. Razvoj različitih vrsta markera za detekciju SNP-a

Razvoj metoda moderne biotehnologije omogućio je detekciju promena koje dovode do razvijanja tolerantnosti na molekularnom nivou. Kao što je pomenuto, do sada je utvrđeno da promena samo jednog nukleotida u sekvenci gena *ahas* uzrokuje promenu konformacije enzima AHAS, te uzrokuje razvijanje tolerantnosti prema AHAS inhibitorima (jedini izuzetak je uočen kod *Sisymbrium orientale* kod kog dolazi do promene dva susedna nukleotida CCT u ATT, što rezultira promenom Pro197Ile Boutsalis i sar. (1999)). Upravo ova priroda tolerantnosti zahteva upotrebu sekvenciranja u cilju identifikacije tačnog mesta promene na genu *ahas*. Uočeno je da najčešće dolazi do promene na jednoj od sledećih 6 pozicija: Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Trp574 i Ser653. Prve tri pozicije su bliže amino-terminalnom kraju enzima, dok su poslednje dve na karboksi-terminalnom kraju (Tranel i Wright, 2002; Whaley i sar., 2007) (sl. 4).



Slika 4. Pozicija aminokiselina čijom promenom se razvija tolerantnost prema AHAS inhibitorima kod korova (pozicija je određena na osnovu standardizovane sekvence *Arabidopsis*-a) (A - alanin, P - prolin, D - aspartat, W - triptofan, S - serin) (prema Corbett and Tardif, 2006)

Poznavanje promene nukleotida omogućuje dizajniranje molekularnog markera koji će moći da se koristi u marker asistiranoj selekciji (MAS - Marker Assisted Selection). U zavisnosti od same mutacije i dostupne opreme, razvijene su različite vrste molekularnih

markera: PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorohism) ili CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), PASA (PCR Amplification of Specific Alles) i DHPLC (Denaturating High-Performance Liquid Chromatography).

CAPS se karakteriše umnožavanjem gena *ahas* i restrikcijom produkta PCR-a restrikcionim endonukleazama. Restrikcione endonukleaze prepoznaju kratke sekvence nukleotida i seku DNK na mestima prepoznavanja. Promena nukleotida dovodi do stvaranja ili gubitka mesta prepoznavanja restrikcionog enzima. Shodno ovoj promeni ukoliko je došlo do npr. gubitka restrikcionog mesta kod mutanta u odnosu na divlji tip, restrikcioni enzim će iseći sekvencu divljeg tipa, dok neće mutiranu sekvencu, i obratno. Razlika između divljeg tipa i mutantnog genotipa je uočljiva nakon razdvajanja tako dobijenih fragmenata tokom elektroforeze. Razvijanje ovakvog molekularnog markera je ograničena postojanjem restrikcionog enzima koji će seći mutiranu sekvencu u odnosu na sekvencu divljeg tipa na mestu mutacije, i obratno. Ukoliko restrikcioni enzim za dato mesto ne postoji, razvijeni su dCAPS markeri. Ovi markeri podrazumevaju upotrebu prajmera koji sadrži jednu ili više nukleotida, koji se nepodudaraju sa ciljnom DNK. Tokom PCR reakcije vrši se umnožavanje DNK koja sadrži promenjen nukleotid, odnosno onaj koji odgovara prajmeru. Na taj način se kreira restrikciono mesto za enzim koji je komercijalno dostupan. Produkt PCR reakcije se seče restrikcionim enzimom koji prepoznaje mesto mutacije, a profili PCR reakcije se dalje očitavaju nakon elektroforeze. Guttieri i sar. (1992) su razvili prvi CAPS marker za detekciju AHAS tolerantnih genotipova *Kochia scoparia* (L.) Schrad., *Letuca serriola* L. i *Salsola iberica* Sennen i Pau. za poziciju Pro197. Tan i Medd (2002) su kod *Raphanus raphanistrum* L. (divlje rotkve) razvili CAPS markere za detekciju mutacije na pozicijama Pro197Ala, Pro197Thr i Trp574Leu. Mutacija na poziciji Pro197 je, generalno, nosilac tolerantnosti prema sulfonilureama (Legere, 2005), dok npr. mutacija Pro197His nosi tolerantnost i prema imidazolinonima (Corbett i Tardif, 2006). Foes i sar. (1999) razvili CAPS marker za detekciju Trp574Leu kod *K. scoparia* (L.), Ashigh i sar. (2009) marker za detekciju Asp376Glu kod *Amaranthus powellii*, dok su Yu i sar. (2008) razvili CAPS i dCAPS markere za šest različitih mutacija (Pro-197-Ala, Pro-197-Arg, Pro-197-Gln, Pro-197-Leu, Pro-197-Ser i Trp-574-Leu) kod *L. rigidum*. Corbett i

Tardif (2008) su razvili CAPS markere za detekciju mutacija Ala122Thr i Ala205Val i Ser653Thr za neki od dva biotipa *Amarantrus*-a (*A. powellii* ili *A. retroflexus*). Ovi autori su ispitivali i mogućnost upotrebe dve restikcione endonukleaze u detekciji mutacija Trp574Leu i Ser653Thr. Zaključili su da je moguće koristiti više enzima u jednoj reakciji u cilju smanjenja troškova u MAS. Upotreba multipleks CAPS u kojoj se istovremeno upotrebljava više endonukleaza moguća je jedino ako enzimi koriste isti pufer i ako im je optimalna aktivnost na istoj temperaturi (Bloch i Grossmann, 1995).

Od izuzetnog zanačaja za detekciju SNP-a su i PASA (PCR Amplification of Specific Alles) markeri. Ovi markeri podrazumevaju upotrebu tri prajmera. Kao i u standardnom PCR mixu, dodaju se prajmeri forward i reverse koji se univerzalno vezuju za sekvencu divljeg tipa i sekvencu na kojoj je došlo do promene (SNP), ali dodatak je reverzni prajmer koji se vezuje za deo DNK sekvence u kom se nalazi tačkasta mutacija. U ovoj reakciji prajmeri forward i reverse su nespecifični i koriste se kao kontrola, jer imaju sposobnost umnožavanja sekvence sa i bez tačkaste mutacije. Profil homozigotno tolerantnih i homozigotno osetljivih genotipova karakteriše prisustvo jednog fragmenta koji su umnožili prajmer forward i jedan od reverse prajmera, dok profil heterozigotno tolerantnih genotipova sadrži dva fragmenta različite dužine (Edwards i Gibbs, 1994). Wagner i sar. (2002) su koristili PASA marker za detekciju SNP mutacija kod različitih biotipova *Amaranthus*-a. Ovi autori su razvili PASA za detekciju mutacije na poziciji Pro197Leu kod *A. retroflexus* i nested (umetnuta) PASA za detekciju Trp574Leu kod *A. rudis*. Nested PASA podrazumeva upotrebu dve PCR reakcije jednu za drugom, te razvijanje posebnih uslova PCR reakcije. Iz navedenih razloga nested PASA je vrlo nepraktična za upotrebu u MAS. Corbett and Tardif (2008) su razvili bipleks i kvadrupleks PASA za detekciju mutacija Ala122Thr i Ala205-Val i Trp574Leu i Ser653Thr kod *Amaranthus* spp., a godinu dana kasnije su Ashigh i sar. (2009) razvili PASA marker za detekciju Asp376Glu kod *A. powellii*.

Osim klasičnih molekularnih markera, za detekciju tolerantnih genotipova se koristi i tečna hromatografija. DHPLC se bazira na različitom stepenu zadržavanja DNK homo ili heterodupleksa na HPLC koloni (Corbett i Tardif, 2006). Ovaj marker se pokazao kao izuzetno značajan u detekciji SNP-a, a ima sposobnost razdvajanja produkta PCR-a do

1000 bp. HPLC analizi prethodi PCR reakcija. Potrebno je uraditi dve PCR reakcije (jednu sa uzorkom koji se ispituje i jednu sa sekvencom divljeg tipa). Nakon PCR-a pomešaju se, u jednakim zapreminama, produkti reakcije, nakon čega se vrši denaturacija dvostrukih lanaca DNK i ponovna renaturacija. Ukoliko je uzorak koji se ispituje divlji tip, nakon renaturacije će se isključivo formirati homodupleksi, međutim ako je uzorak mutirana sekvenca doći će do formiranja heterodupleksa. Homo i heterodupleksi se na koloni HPLC zagrevaju, a detekcija je omogućena činjenicom da se heterodupleksi denaturišu na nižim temperaturama nego homodupleksi. Na alkilovanom silika matriksu HPLC kolone, zadržavanje dsDNA je veće nego ssDNK na temperaturama višim od 50°C (Siminszky i sar., 2005). Siminszky i sar. 2005 su razvili DHPLC za detekciju mutacija Ala122Thr, Leu574Trp i Ser653Thr kod *Powell amaranth* i *A. powellii*.

3.5.2. Molekularna analiza tolerantnih genotipova suncokreta prema AHAS inhibitorima

Kod suncokreta je otkriven veći broj SNP-a koji su nosioci tolerantnosti ili ukrštene tolerantnosti prema AHAS inhibitorima. Prva molekularna istraživanja su objavljena početkom 21. veka (White i sar., 2003). Ova grupa autora je detektovala promenu na kodonu 205 sekvenciranjem i na osnovu poređenja sekvenci izolovanih iz tolerantnih genotipova suncokreta i već prethodno opisanih SNP promena kod drugih vrsta utvrdila da je baš ova mutacija koja je dovela do promene aminokiseline Ala205Val nosilac ukrštene tolerantnosti prema imazetapiru i hlorimuron-etilu. Kolkman i sar. (2004) su sekvenciranjem detektovali promenu na kodonu 197 koja je nosilac tolerantnosti prema hlorsulfuronu. Ova substitucija dovodi do promene u aminokiselinskoj sekvenci enzima AHAS gde se na 197 poziciji (po nomenklaturi kodona prema *A. thaliana*) nalazi leucin (CTC) umesto prolina (CCC). Ova grupa autora je identifikovala i drugu mutaciju koja dovodi do razvijanja tolerantnosti prema imidazolinonima na kodonu 205. To je promena alanina (GCG) u valin (GTG). Sala i sar. (2008b) su sekvenciranjem detektovali da je tolerantnost inbred linije CLHA-Plus uzrokovana promenom na kodonu 122 (Ala122Thr - GCG-ACG). Ovaj genotip je razvijen EMS mutiranjem i nosi tolerantnost prema

imazapiru. Sala i Bulos (2011) su pronašli novi izvor tolerantnosti u Argentini i klasičnim oplemenjivanjem kreirali inbred liniju RW-B ukrštene tolerantnosti prema imidazolinonima i sulfonilureama. Sekvenciranjem je utvrđeno da je u pitanju nov izvor tolerantnosti, jer se mutacija nalazi na kodonu 574 (Trp574Leu - TGG - TTG) koji do tad nije bio opisan kod suncokreta.

Kolkman i sar. (2004) su kreirali test za detekciju SNP na kodonu 281 (G/A) i 205 (C/T) gena *AHAS1* i na kodonu 581 (G/A) gena *AHAS3* upotrebom čitača fluorescentne polarizacije. Detekcija SNP-a ovom metodom se zasniva na upotrebi dva neobeležena prajmera (forward i reverse) koji se vezuju za *AHAS* gen i još jednog prajmera se vezuje za sekvencu pored SNP-a i fluorescentno obeleženih dNTP-ova. Prvo se izvodi jedna PCR reakcija sa standardnim forward i reverse prajmerima, a zatim u sledećoj reakciji se dodaje treći prajmer i vrši se ekstenzija samo jednog nukleotida koji je fluorescentno obeležen. Nukleotid koji se javlja u divljem tipu je obeležen jednom bojom, dok je nukleotid koji se javlja u mutiranoj sekvenci obeležen drugom bojom (Gibson i Muse, 2002). Nakon ove reakcije vrši se detekcija fluorescentnosti.

4. RADNA HIPOTEZA

Na osnovu dosadašnjih saznanja o prirodi mehanizma tolerantnosti suncokreta prema AHAS inhibitorima polazi se od činjenice da se tolerantnost prema tribenuron-metil nasleđuje dominantno i da je promena jednog nukleotida odgovorna za razvijanje tolerantnosti prema tribenuron-metil.

Za razvijanje *in vitro* testa polazi se od pretpostavke da biljke apsorbuju tribenuron-metil, kako lisnom površinom, tako i korenom. Shodno tome, herbicid, čija je aktivna materija tribenuron-metil, će se dodavati u hranljivu MS podlogu. Očekuje se identifikacija optimalnih uslova u kojima će biti omogućeno razlikovanje, ne samo osetljivih od tolerantnih biljaka, već i homozigotno tolerantnih biljaka od heterozigotnih biljaka.

Za identifikaciju najpovoljnijeg molekularnog markera upotrebiće se SSR markeri blisko vezani za gen *Ahas11-2* u cilju provere mogućnosti njihove upotrebe u MAS. Za dizajniranje kodominantnog molekularnog markera analiziraće se sekvence gena suncokreta *Ahas11-2* (mutirana sekvenca) i *ahas11* (sekvenca divljeg tipa) bioinformatičkim putem. Na osnovu sekvenci gena će se dizajnirati prajmeri koji umnožavaju gen *Ahas11-2*, a pre svega deo gena koji sadrži mesto mutacije. Daljom analizom te sekvence i prisustva restrikcionog mesta na mestu SNP-a identifikovaće se restrikcioni enzim koji će seći sekvencu na mestu mutacije.

5. MATERIJAL I METOD RADA

5.1. Razvoj *in vitro* testa

5.1.1. Biljni materijal

Za razvoj *in vitro* testa upotrebljeno je devet hibrida suncokreta: četiri homozigotno tolerantna na tribenuron-metil, četiri heterozigotno tolerantna na tribenuron-metil i jedan osetljiv hibrid (tab. 1). Svi ispitivani hibridi suncokreta su deo oplemenjivačkog programa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Prilikom razvoja testa korišćen je veći broj hibrida zbog ispitivanja uticaja ostalih gena u genomu (tzv. „genetic background“) na ispitivanu osobinu tolerantnosti. Gen *Ahas11-2* je unešen pedigre metodom u linije sa drugim agronomski povoljnim osobinama (Jocić i sar., 2008).

Tabela 1. Hibridi suncokreta korišćeni u razvijanju *in vitro* testa

Hibrid	Fenotip	Genotip
HoF	Homozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/Ahas11-2*</i>
HoT	Homozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/Ahas11-2</i>
HoP	Homozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/Ahas11-2</i>
HoM	Homozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/Ahas11-2</i>
HtF	Heterozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/ahas11</i>
HtT	Heterozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/ahas11</i>
HtP	Heterozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/ahas11</i>
HtM	Heterozigotno tolerantan	<i>Ahas11-2/ahas11</i>
Os	Homozigotno osetljiv	<i>ahas11/ahas11</i>

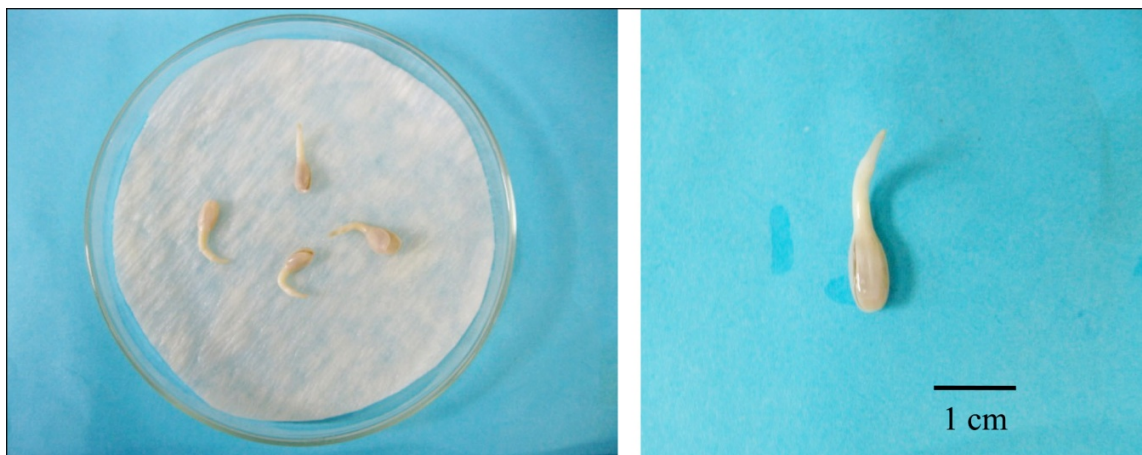
*nomenklatura predložena od strane Sala i sar. (2008b)

5.1.2. Priprema hranljive podloge za testiranje

Herbicid (Express 50SX, aktivna materija tribenuron-metil) je rastvoren u sterilnoj destilovanoj vodi čija je pH podešena na 9 (u cilju boljeg rastvaranja herbicida), a potom je rastvor herbicida sterilisan upotrebom filtera za špric (Rotilabo - syringe filters, Roth). Rastvor herbicida je pripremljen svež svaki put pre dodavanja u rashlađenu MS podlogu (pri temperaturi podloge oko 37°C), Murashige i Skoog (1962). Testiranje je vršeno na podlogama čija je pH 7 ili 8, u konačnim koncentracijama herbicida 2,0 µM, 2,5 µM, 3,0 µM, 3,5 µM i 4,0 µM. Herbicid nije dodat u kontrolama.

5.1.3. *In vitro* testiranje tolerantnosti

Sterilizacija semena je izvršena u skladu sa Taški-Ajduković i Vasić (2005). Semena su postavljena u petri posude sa filter papirom natopljenim sterilnom d_2H_2O i naklijavana u inkubatoru u mraku 2 dana na 25°C da bi se dobili zdravi klijanci odgovarajuće veličine (sl. 5).



Slika 5. Naklijano seme suncokreta

Nakon 2 dana naklijavanja, izabrani su zdravi klijanci suncokreta dugi oko 1,5 cm i postavljeni u MS podlogu sa prethodno dodatim herbicidom u različitim koncentracijama i kontrole. Po tri klijanca su postavljena u svaku Erlenmajer posudu od 250 ml. Svaki

tretman je postavljen u četiri ponavljanja. Erlenmajer posude su postavljene u komore na 25°C i fotoperiod 16h dan i 8h noć (sl. 6).

Razvoj klijanaca tri genotipa (HoF, HtF i Os) je preliminarno posmatran u periodu od 16 dana u cilju određivanja najpogodnijeg dana za očitavanje tolerantnosti i ponašanja herbicida pri različitim pH podloge. Kasnije su sve analize razvoja nadzemnog dela i korena klijanaca na MS podlozi vršene nakon 12 dana tretmana. Dvanaestog dana, biljke su izvađene iz Erlenmajer posuda, koren biljaka je opran u vodi i uklonjena je podloga vezana za koren. Koren je blago prosušen papirnom vatom, nakon čega je merena sveža masa nadzemnog dela biljke (g) i korena (g). Nadzemni deo biljaka i koren su zatim sušeni u sušnici 48h na 105°C, nakon čega je merena suva masa nadzemnog dela (g) i suva masa korena (g).



Slika 6. Komora za testiranje tolerantnosti

5.1.4. Statistička obrada podataka

Eksperiment je postavljen kao potpuno slučajan plan (Stanković i sar., 2002). Dobijeni podaci su obrađeni metodom analize varijanse, dok su razlike između tretmana analizirane testom najmanje značajne razlike (LSD testom) u programu STATISTICA10.

5.2. Razvoj molekularnih markera

5.2.1. Biljni materijal

Roditeljske linije i njihovo F_1 , F_2 i F_3 potomstvo je testirano herbicidom Express 50-SX (Du Pont) na oglednom polju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, na Rimskim Šančevima i ocena tolerantnosti je poznata (Jocić i sar., 2008). Molekularna analiza tolerantnosti prema tribenuron-metilu obuhvatila je analizu tolerantne i osetljive roditeljske linije, i njihovog F_1 i F_2 potomstva:

- tolerantan roditelj (SU-T-42gr) – grupni uzorak (tzv. „bulk sample“) od 10 biljaka
- netolerantan roditelj (RHA-N-49) – grupni uzorak od 10 biljaka
- F_1 potomstvo – grupni uzorak od 10 biljaka
- F_2 potomstvo – pojedinačni uzorci (120 biljaka).

5.2.2. Izolacija DNK i provera čistoće izolovane DNK

Lisni materijal biljaka koji je uzorkovan je zamrznut u tečnom azotu i čuvan na -70°C do izolacije genomske DNK. Za izolaciju DNK je korišćen izmenjen CTAB metod prema Permingeat i sar. (1998). Kvalitet i kvantitet izolovane DNK je određen spektrofotometrijski (Spectrofotometar Ultrospec 2000). Merene su apsorbance na 3 talasne dužine: A_{260} nm, A_{280} nm i A_{230} nm, a zatim su izračunati odnosi apsorbanci $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$.

5.2.3. Umnožavanje SSR markerima

Umnožavanje DNK SSR markerima je vršeno u Mastercycler Gradient (Eppendorf) u ukupnoj zapremini reakcije od 15 μ l: približno 40 ng genomske DNK 0,2 mM dNTP (Fermentas), 1U Taq DNK polimeraze (Fermentas), 1x Taq pufer (Fermentas), 0,3 μ M prajmera (Forward i Reverse) (Metabion), 3 mM MgCl₂ (Fermentas) i 2,5 μ g BSA (Bovine Serum Albumine) (Fermentas) (sekvence SSR prajmera su date u prilogu 6).

Dva PCR programa, TOUCH DOWN 3 i SUMOTOUCH, su testirana u cilju određivanja najboljeg za umnožavanje DNK fragmenata SSR markerima (ciklusi PCR programa su dati u prilogu 7). Oba programa se karakterišu smanjivanjem temperature vezivanja prajmera za jedan 1°C u nekoliko početnih ciklusa. U daljoj analizi je za umnožavanje DNK fragmenata korišćen program TOUCH DOWN 3. Produkti PCR reakcije su razdvojeni na 1% do 3% MetaPhor agaroznom gelu (Lonza, Switzerland), a za elektroforezu su korišćene DNK lestvice: 50 bp i pBr322 (Fermentas).

5.2.4. Razvoj CAPS markera

Prajmeri za umnožavanje gena *AHAS1* haplotipa 3 (još označenog i kao gen *Ahas1-2*) su dizajnirani u programu Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) na osnovu prijavljene sekvence u NCBI banci gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> - pristupni broj: AY541453.1) (tab. 2) Umnožavanje DNK-specifičnim prajmerima je vršeno u reakciji ukupne zapremine od 15 μ l: približno 40 ng genomske DNK 0,4 mM dNTP (Fermentas), 1U Taq DNK polimeraze (Fermentas), 1x Taq pufer (Fermentas), 0,6 μ M prajmera (Forward i Reverse) (Metabion), 3 mM MgCl₂ (Fermentas) i 2,5 μ g BSA (Bovine Serum Albumine) (Fermentas) u Mastercycler Gradient (Eppendorf) po programu SUMO:

Prvi ciklus: inicijalna denaturacija DNK 4 min na 95°C;

30 ciklusa:

- Denaturacija 95°C u trajanju od 10 s
- Aniling na 65°C u trajanju od 30 s
- Ekstenzija na 72°C u trajanju od 1 min
- Finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 min.

Tabela 2. Sekvence DNK-specifičnih prajmera

Ime prajmera	Sekvenca
For1	ATCGCCACTTCCGGTCCTGG
For2	CAACCCTTCCATCTCCTTCA
For3	TCTCCCGTTACGCGCCTGAT
For4	AGGCGCAGACGTGTTGGTGG
For5	TCCGCAATGTGCTCCACGT
For6	AAGCTCTCACGCGCTCAAGC
For7	TCCGCCTTCCTCCCCCGTTT
For8	CCACTCAACCACCGTTACAGG
ForBru*	TTCCTCCCCCGTTTCGCATTAC
Rev1	CCCGAACTCGCAAGATAAAA
Rev2	TCGAAGCCGGGTACGCTCCA
Rev3	CCATTTCCGGCACCCTAACT
Rev4	CACTCGAAGCCGGGTACGCT
Rev5	GGGTACGCTCCAAGCCCCAT
Rev6	ATCAAACCGGGCCGGGTCGA
Rev7	CGCTTCCCCCACCACCTAA
Rev8	CGGTTCCGATCATTCTCCGGA
RevBru*	CGCCGCCCTGTTTCGTGAC

* Kolkman i sar., 2004

Na osnovu sekvenci gena *Ahas11-2* i *ahas11* pronađena su restrikciona mesta koja se razlikuju između mutirane sekvence i sekvence divljeg tipa i enzimi koji seku mesto mutacije ili sekvencu divljeg tipa u programu NEBcutter2 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, Vincze i sar., 2003). Produkti umnožavanja DNK-specifičnim prajmerima su podvrgnuti reakciji digestije endonukleazama: Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaJI) i BcnI (NciI). U cilju identifikacije optimalnih uslova reakcije, preliminarno je vršena digestija različitim količinama restrikcionog enzima (2U, 3U, 5U i 10U) u vremenskom periodu od 4h do 6h u uslovima preporučenim za svaki enzim (enzimi Kpn2I i BseDI na temperaturi od 55°C, a enzim BcnI na temperaturi od 37°C).

Za analizu svih genotipova vršena je digestija 4h sa 3U enzima na temperaturi preporučenoj od strane proizvođača. Za restrikciju je korišćen 2 x pufer za restrikcioni enzim u ukupnoj zapremini reakcije od 20 µl. Produkti umnožavanja DNK-specifičnim prajmerima i restrikcije enzimima su razdvojeni na 2% MetaPhor agaroznom gelu (Lonza, Switzerland), a za elektroforezu su korišćene DNK lestvice od 50 bp i 100 bp (Fermentas). Gelovi su slikani sistemom Bio-Print (Vilber Laurmat, Francuska), a dužina fragmenata je određena upotrebom programa BIO-CAPT V.97 (Vilber Laurmat, Francuska).

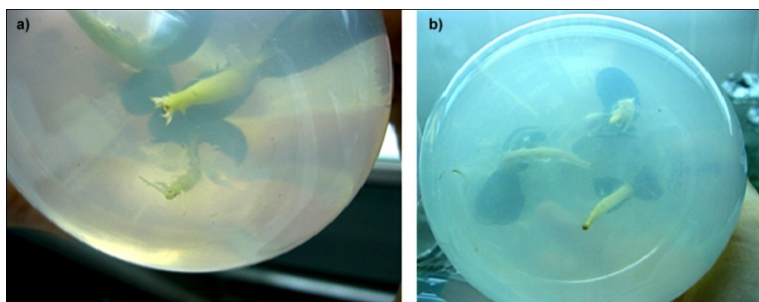
Fenotipski odnosi u poljskim uslovima i genotipski odnosi razdvajanja razvijenih markera su testirani χ^2 testom, prema Hadživuković (1973).

6. REZULTATI

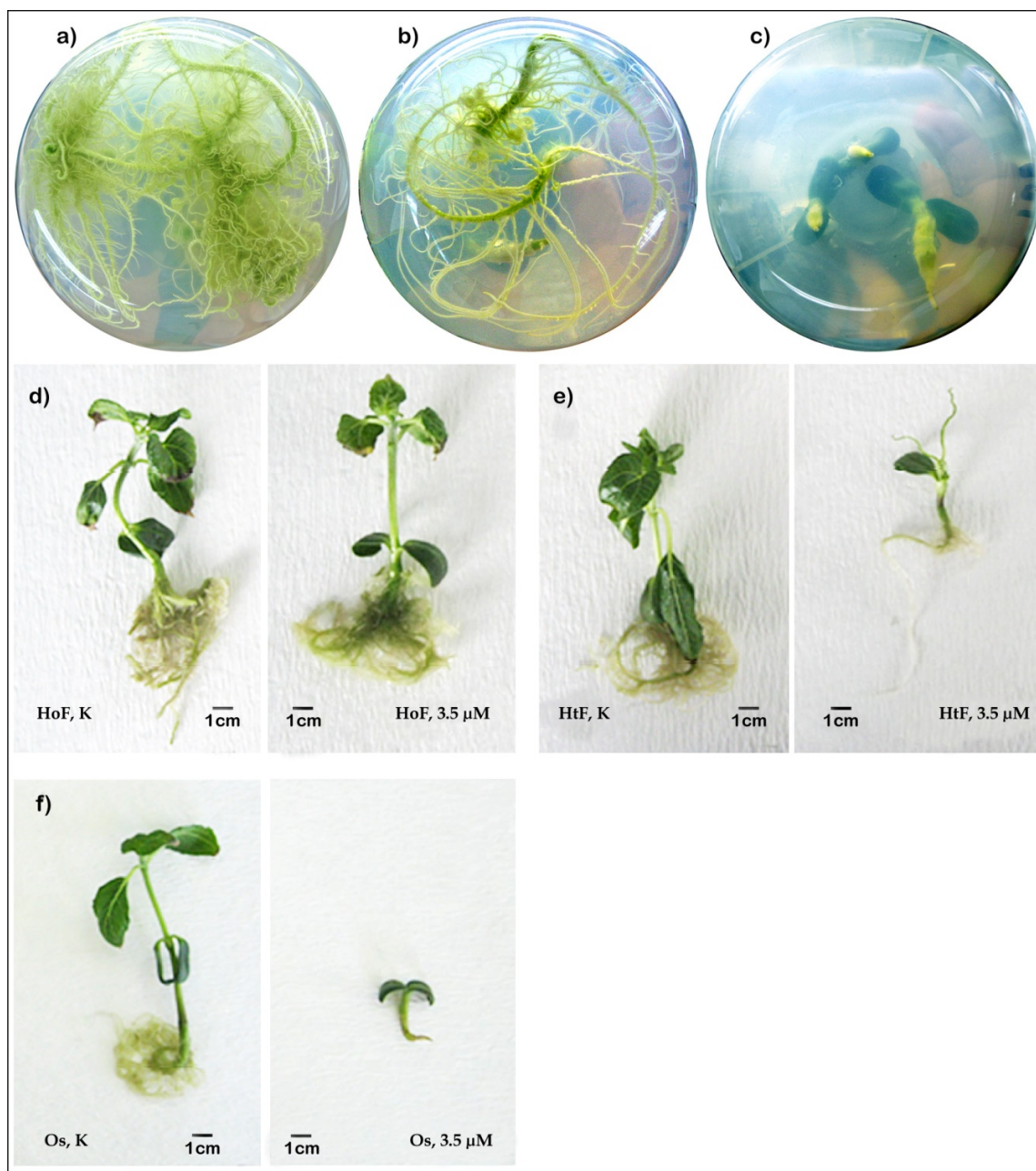
6.1. Razvoj *in vitro* testa

Nakon dva dana naklijavanja u petri posudama, klijanci svih ispitivanih genotipova su postavljeni na MS podlogu (tretmane i kontrole) i nastavili da se razvijaju. U cilju praćenja reakcije biljaka suncokreta u podlogama sa različitim koncentracijama herbicida i različitim pH vrednostima, vršena je preliminarna analiza razvoja biljaka u periodu od 16 dana. Dvanaestog dana je na pojedinim biljkama osetljivog genotipa uočen početak razvoja korena na pH 7, dok je ista reakcija osetljivog genotipa uočena petnaestog dana na pH 8. Razvoj korena se javio u vidu elongacije osnovnog korena i/ili pojave kratkih korenčića (sl. 7).

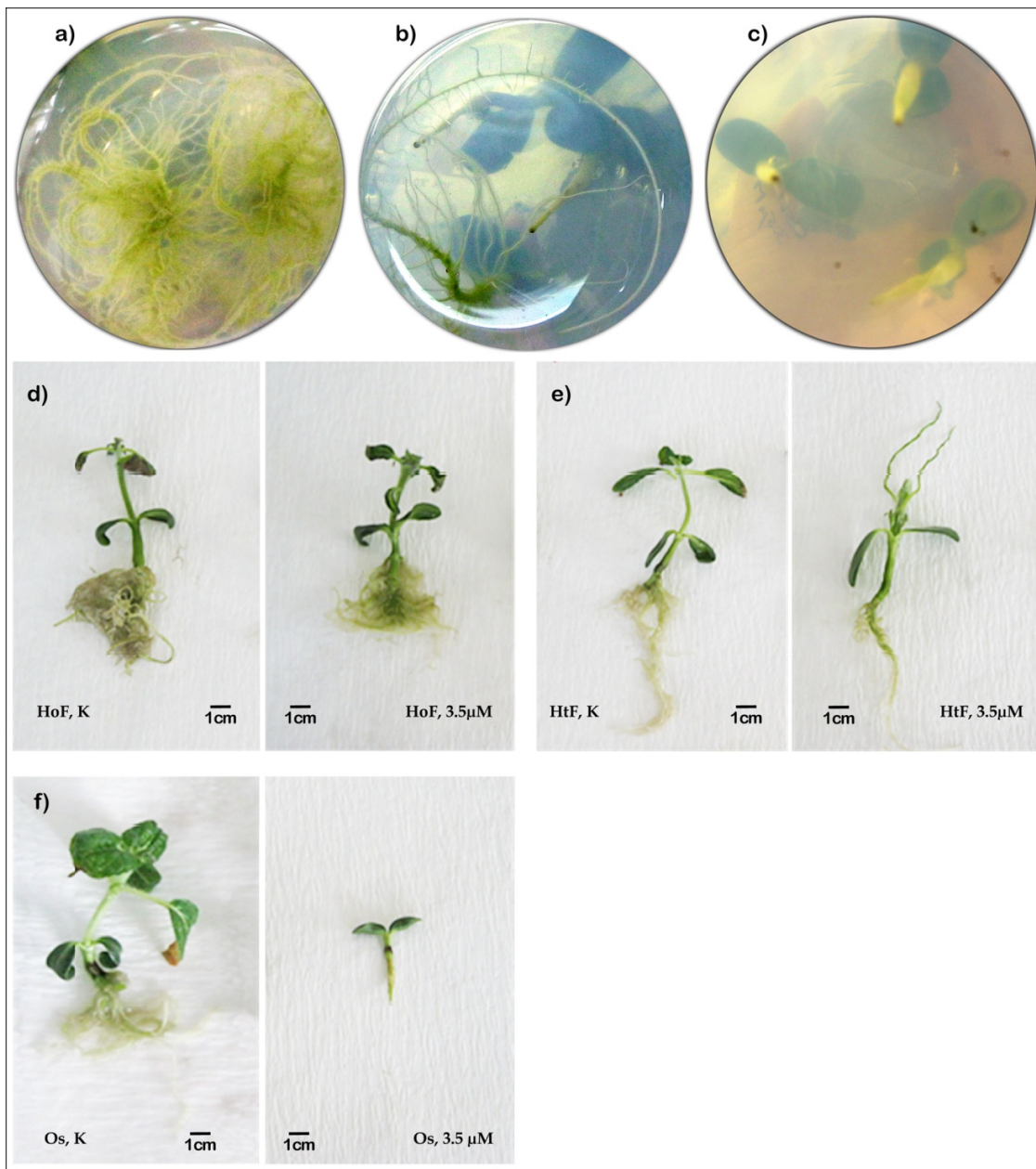
Nakon tri dana razvoja biljaka na MS podlozi, razvoj korena kod osetljivog genotipa je zaustavljen u svim tretmanima, a kod nekih biljaka, koje su uglavnom gajene na pH 8, uočena je nekroza korena (sl. 7). Za razliku od biljaka osetljivih na tribenuron-metil, biljke homozigotnih i većina biljaka heterozigotnih genotipova su nastavila da se razvijaju (sl. 8 i 9). Kod pojedinih biljaka heterozigotnih genotipova razvili su se uži listovi u odnosu na kontrolu, te je došlo do uvijanja listova. Osim toga, uočena je i razlika u morfologiji korena između homozigotno i heterozigotno tolerantnih biljaka. Koreni homozigotno tolerantnih biljaka su razgranati, dok su koreni heterozigotno tolerantnih biljaka imali dobro razvijen osnovni koren, koji je izdužen i slabo razvijene bočne korene (sl. 8 a,b,c; 9 a,b,c), što je posebno vidljivo na pH 8 pri tretmanu višim koncentracijama herbicida (sl. 9). Koren svih genotipova u kontrolama je bio dobro razvijen i nije uočena razlika u morfologiji korena između pH 7 i 8 u kontrolama (sl. 8 e,f,g; 9 e,f,g).



Slika 7. Morfologija korena biljaka osetljivog genotipa suncokreta nakon 12 dana razvoja na MS podlozi (tretman sa 3,0 μ M herbicida Express 50SX) pri a) pH 7 i b) pH 8.



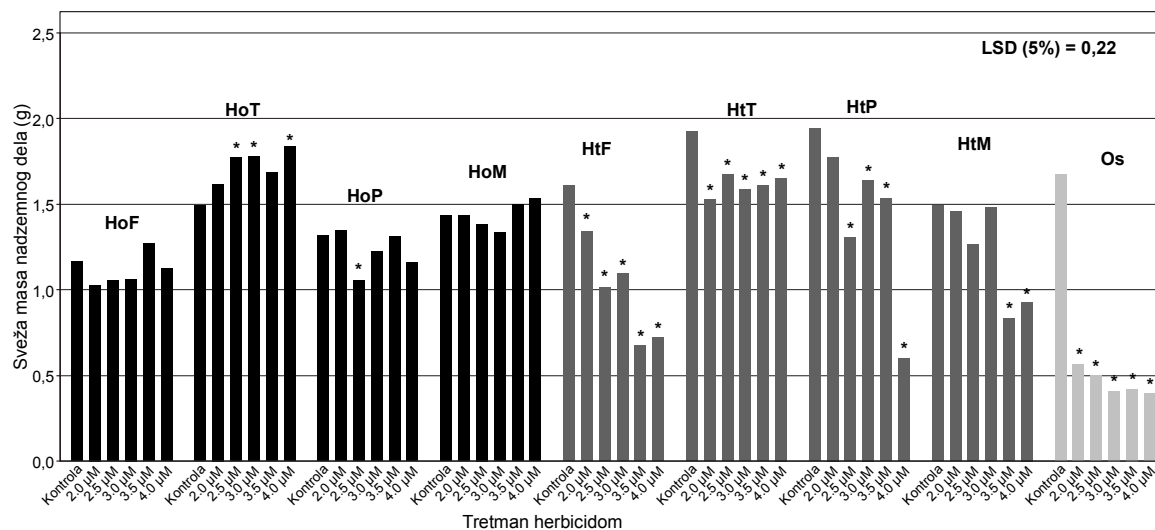
Slika 8. Morfologija korena biljaka tretiranih sa 3,5 μM herbicida Express 50SX na pH 7: a) homozigotno tolerantne biljke; b) heterozigotno tolerantne biljke; c) osetljive biljke. Poređenje izgleda biljaka tretiranih sa 3,5 μM tribenuron-metila na pH 7 i netretirane biljke (K): d) homozigotno tolerantne biljke; e) heterozigotno tolerantne biljke; f) osetljive biljke.



Slika 9. Morfologija korena biljaka tretiranih sa 3,5 μ M herbicida Express 50SX na pH 8: a) homozigotno tolerantne biljke; b) heterozigotno tolerantne biljke; c) osetljive biljke. Poređenje izgleda biljaka tretiranih sa 3,5 μ M tribenuron-metila na pH 8 i netretirane biljke (K): d) homozigotno tolerantne biljke; e) heterozigotno tolerantne biljke; f) osetljive biljke.

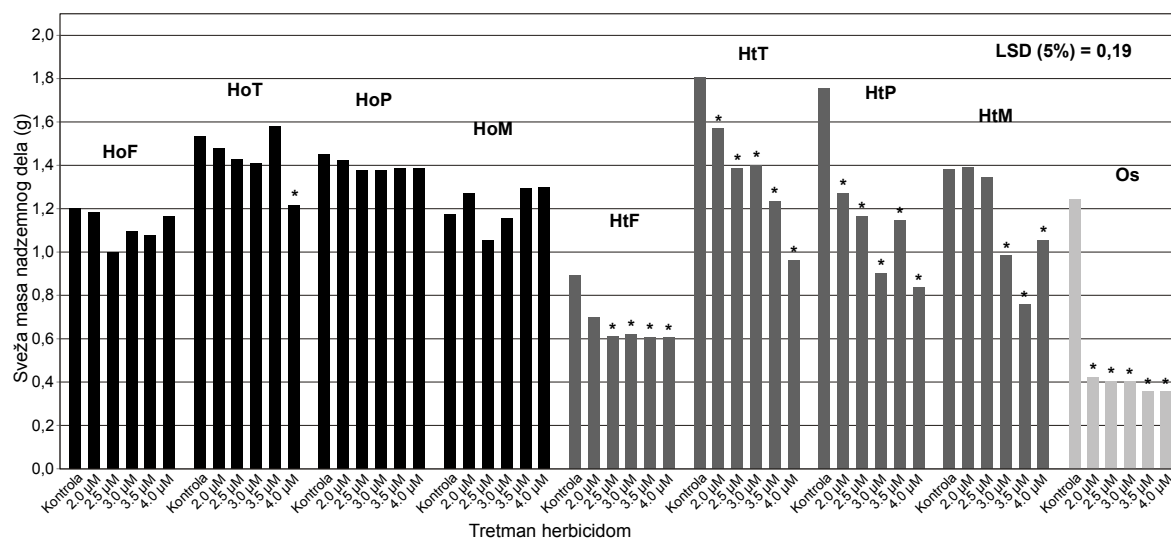
6.1.1. Analiza sveže mase nadzemnog dela biljke

ANOVA je pokazala da je na obe pH vrednosti došlo do statistički značajnog smanjenja sveže mase nadzemnog dela svih tretiranih osetljivih biljaka u poređenju sa kontrolom (graf. 1, 2). Generalno, tretmani tribenuron-metilom su na pH 7 doveli do smanjenja mase nadzemnog dela heterozigotnih genotipova, mada to smanjenje nije bilo statistički značajno u svim tretmanima (graf. 1). Značajano smanjenje mase svih ispitivanih heterozigotnih genotipova u odnosu na kontrolu (HtF - 1,6 g; HtT - 1,9 g; HtP - 1,9 g; HtM - 1,5 g) je zabeleženo na tretmanima sa 3,5 μM (HtF - 0,7 g; HtT - 1,6 g; HtP - 1,5 g; HtM - 0,8 g) i 4,0 μM herbicida (HtF - 0,7 g; HtT - 1,7 g; HtP - 0,6 g; HtM - 0,9 g). Tretman tribenuron-metilom ili nije imao uticaj ili je imao pozitivan uticaj na nadzemnu masu homozigotnih genotipova. Jedini izuzetak je uočen kod genotipa HoP pri tretmanu sa 2,5 μM herbicida (1,1 g), gde je došlo do značajnog smanjenja sveže mase u odnosu na kontrolu (1,3 g) (graf. 1). Na pH 8, tretmani tribenuron-metilom uzrokovali su smanjenje nadzemne mase ispitivanih heterozigotnih genotipova, iako ovo smanjenje nije bio značajano u svim tretmanima (graf. 2). Značajano smanjenje mase svih ispitivanih heterozigotnih genotipova u odnosu na kontrolu (HtF - 0,9 g; HtT - 1,8 g; HtP - 1,8 g; HtM - 1,4 g) je zabeleženo na tretmanima sa 3,0 μM (HtF - 0,6 g; HtT - 1,4 g; HtP - 0,9 g; HtM - 1,0 g), 3,5 μM (HtF - 0,6 g; HtT - 1,2 g; HtP - 1,1 g; HtM - 0,8 g) i 4,0 μM herbicida (HtF - 0,6 g; HtT - 1,0 g; HtP - 0,8 g; HtM - 1,1 g). Generalno, tretman herbicidom nije imao efekat na nadzemnu masu homozigotno tolerantnih genotipova, osim kod genotipa HoT pri tretmanu sa 4,0 μM herbicida, gde je uočen negativan uticaj herbicida na masu (kontrola - 1,5 g; 4,0 μM - 1,2 g) (graf. 2).



Grafikon 1. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na svežu masu (g) nadzemnog dela tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 7 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0.05}$

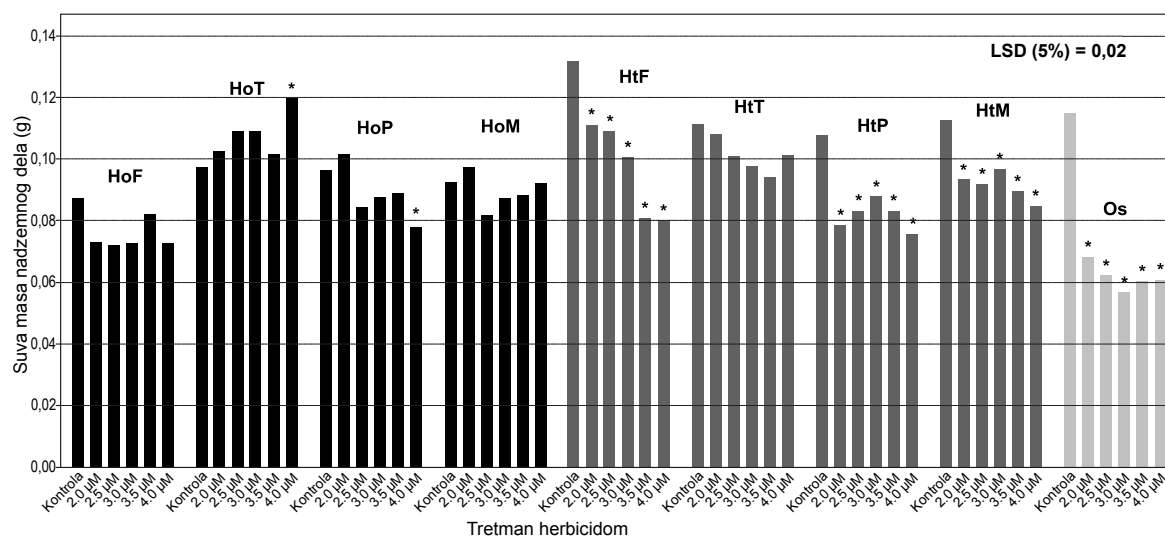


Grafikon 2. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na svežu masu (g) nadzemnog dela tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 8 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0.05}$

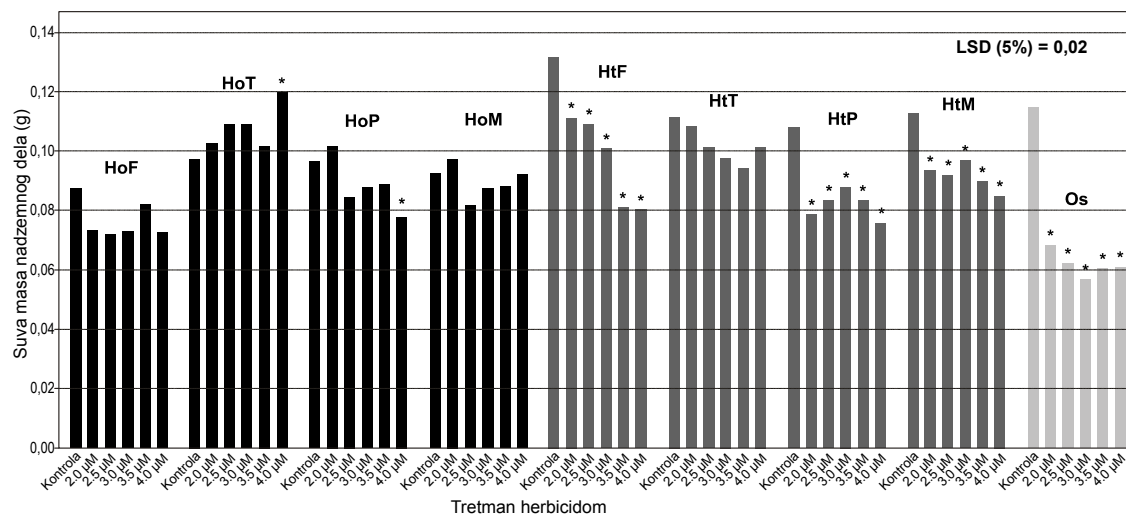
6.1.2. Analiza suve mase nadzemnog dela biljke

LSD test je pokazao da je došlo do značajnog smanjenja suve nadzemne mase osetljivog genotipa u svim tretmanima u odnosu na kontrolu na obe pH vrednosti (graf. 3, 4). Svi tretmani su doveli do statistički značajnog smanjenja suve mase genotipova HtF, HtP i HtM, dok ovo smanjenje nije bilo statistički značajno kod genotipa HtT (kontrola - 0,11 g; 2,0 μ M - 0,11 g; 2,5 μ M - 0,10 g; 3,0 μ M - 0,10 g; 3,5 μ M - 0,09 g; 4,0 μ M - 0,10 g). Generalno, tretmani herbicidom nisu uticali na suhu masu homozigotno tolerantnih genotipova. Izuzeci su se javili pri tretmanu sa najvišom ispitivanom koncentracijom herbicida pri čemu je došlo do statistički značajnog povećanja suve mase genotipa HoT (kontrola - 0,01 g; 4,0 μ M - 0,12 g) i statistički značajnog smanjenja suve mase genotipa HoP (kontrola - 0,01 g; 4,0 μ M - 0,08 g) (graf. 3). Na pH 8, tretman sa 4,0 μ M herbicida je dovelo do značajnog smanjenja suve mase svih heterozigotnih genotipova (HtF - 0,07 g; HtT - 0,07 g; HtP - 0,07 g; HtM - 0,07 g) u odnosu na kontrolu (HtF - 0,09 g; HtT - 0,14 g; HtP - 0,10 g; HtM - 0,10 g), dok tretmani herbicidom nisu imali efekat na suhu masu homozigotno tolerantnih genotipova (graf. 4).



Grafikon 3. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na suhu masu nadzemnog dela (g) tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 7 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0,05}$

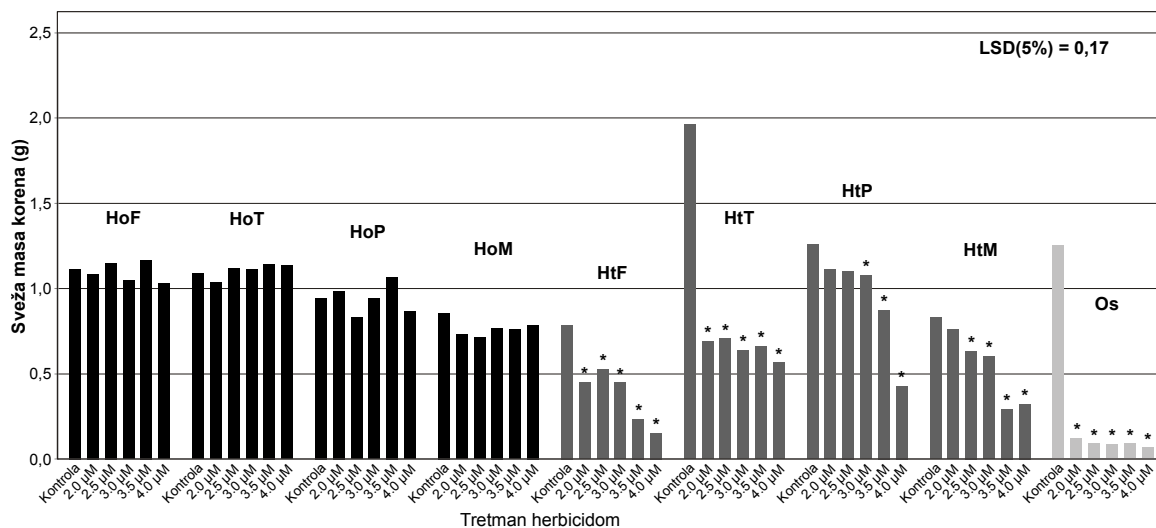


Grafikon 4. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na suhu masu nadzemnog dela (g) tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 8 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0,05}$

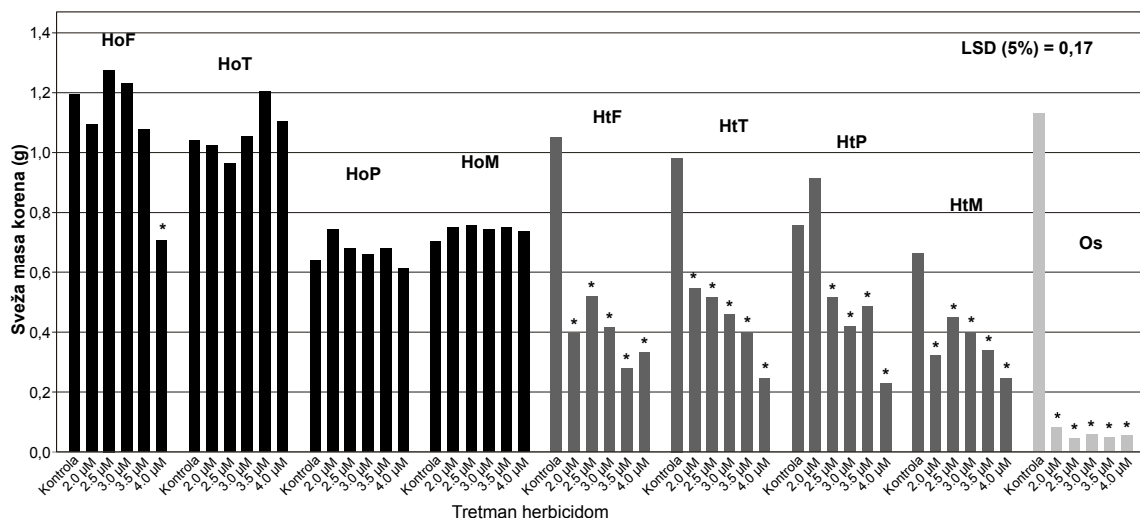
6.1.3. Analiza sveže mase korena biljke

ANOVA analiza sveže mase korena pokazala je da je došlo do statistički značajnog smanjenja mase osetljivog genotipa u svim tretmanima u odnosu na kontrolu na obe pH vrednosti (graf. 5, 6). Na pH 7, tretman herbicidom doveo do smanjenja mase korena svih tretiranih heterozigotno tolerantnih genotipova u odnosu na kontrolu (HtF - 0,8 g; HtT - 2,0 g; HtP - 1,3 g; HtM - 0,8 g), iako ovo smanjenje nije statistički značajno u svim tretmanima. Značajno smanjenje mase korena svih heterozigotno tolerantnih genotipova je primećeno pri upotrebi 3,0 µM (HtF - 0,4 g; HtT - 0,6 g; HtP - 1,1 g; HtM - 0,6 g), 3,5 µM (HtF - 0,2 g; HtT - 0,7 g; HtP - 0,9 g; HtM - 0,3 g) i 4,0 µM (HtF - 0,2 g; HtT - 0,6 g; HtP - 0,4 g; HtM - 0,3 g) herbicida. Tretman tribenuron-metilom nije uticao na svežu masu ispitivanih homozigotno tolerantnih genotipova (graf. 5). Na pH 8, tretman herbicidom je doveo do smanjenja mase korena svih ispitivanih heterozigotno tolerantnih genotipova, osim kod genotipa HtP tretiranim sa 2,0 µM herbicida (kontrola - 0,8 g; 2,0 µM - 0,9 g). Tretman herbicidom nije uticao na svežu masu korena homozigotno tolerantnih genotipova, sem na genotip HoF gde je uočeno smanjenje mase korena prilikom tretmana sa 4,0 µM herbicida (kontrola - 1,2 g; 4,0 µM - 0,7 g) (graf. 6).



Grafikon 5. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na svežu masu (g) korena tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 7 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0,05}$

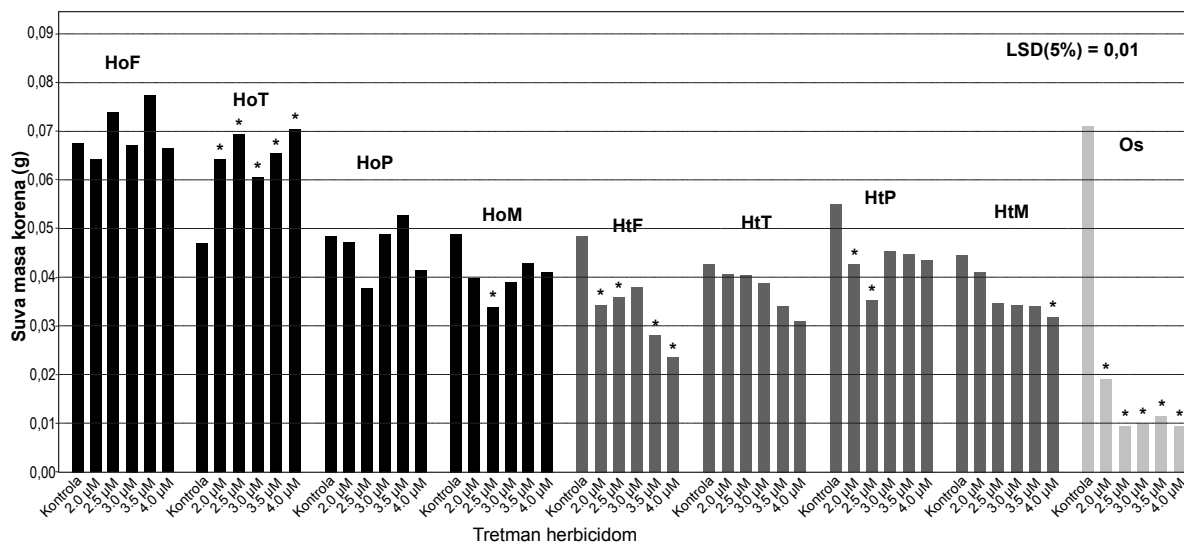


Grafikon 6. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na svežu masu (g) korena tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 8 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0,05}$

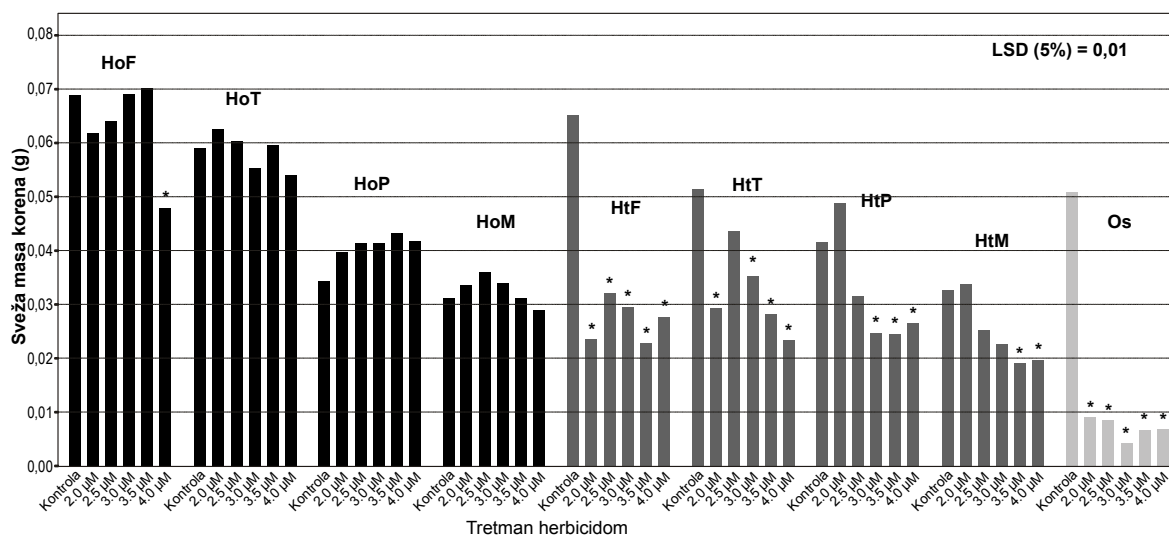
6.1.4. Analiza suve mase korena biljke

ANOVA analiza suve mase korena osetljivog genotipa pokazala je da je na obe pH došlo do značajnog smanjenja suve mase korena u svim tretmanima u odnosu na kontrolu (graf. 7, 8). Na pH 7, ANOVA je pokazala neregularnost prilikom analize uticaja tretmana herbicidom na suhu masu heterozigotnih genotipova. Kod genotipa HtF je uočeno značajno smanjenje suve mase u svim tretmanima, sem na 3,0 μM (kontrola - 0,05 g ; 3,0 μM - 0,04 g), dok kod HtP uočeno smanjenje u tretmanima sa 2,0 μM i 2,5 μM herbicida (kontrola - 0,06 g; 2,0 μM - 0,04 g; 2,5 μM - 0,04 g), a kod HtM sa 4,0 μM herbicida (kontrola - 0,04 g; 4,0 μM - 0,03 g). Tretman tribenuron-metilom ili nije imao uticaj ili je imao pozitivan uticaj na suhu masu homozigotnih genotipova. Jedini izuzetak je uočen kod genotipa HoM u tretmanu sa 2,5 μM herbicida, gde je došlo do značajanog smanjenja suve mase u odnosu na kontrolu (kontrola - 0,05 g; 2,5 μM - 0,03 g) (graf. 7). Na pH 8, uočeno je značajno smanjenje suve mase korena svih testiranih heterozigotno tolerantnih genotipova pri upotrebi viših koncentracija herbicida (tretmanini sa 3,5 μM (HtF - 0,02 g; HtT - 0,03 g; HtP - 0,02 g; HtM - 0,02 g) i 4,0 μM herbicida (HtF - 0,03 g; HtT - 0,02 g; HtP - 0,03 g; HtM - 0,02 g)) u odnosu na kontrolu (HtF - 0,07 g; HtT - 0,05 g; HtP - 0,04 g; HtM - 0,03 g). Tretmani herbicidom nisu uticali na suhu masu korena homozigotno tolerantnih genotipova, osim na HoF u tretmanu sa 4,0 μM herbicida gde je uočeno smanjenje suve mase (kontrola - 0,07 g; 4,0 μM - 0,05 g) (graf. 8).



Grafikon 7. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na suhu masu (g) korena tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 7 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0,05}$

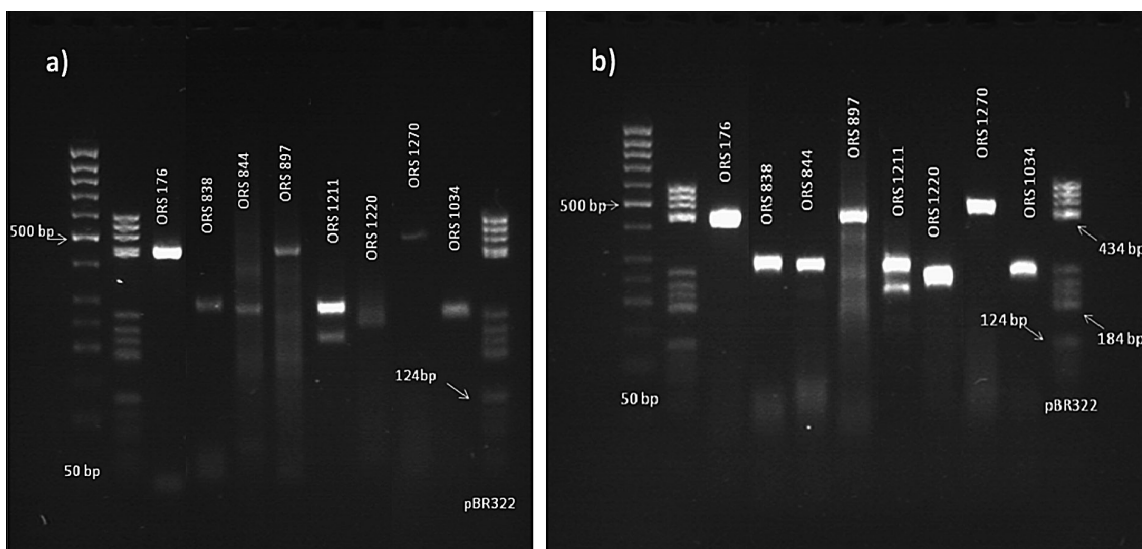


Grafikon 8. Uticaj različitih koncentracija tribenuron-metila na suhu masu (g) korena tolerantnih i osetljivog genotipa suncokreta na pH 8 (crni stubići - homozigotno tolerantni genotipovi, sivi stubići - heterozigotni genotipovi, beli stubići - osetljiv genotip).

* Kolone označene zvezdicom se značajno razlikuju na nivou značajnosti $\alpha_{0,05}$

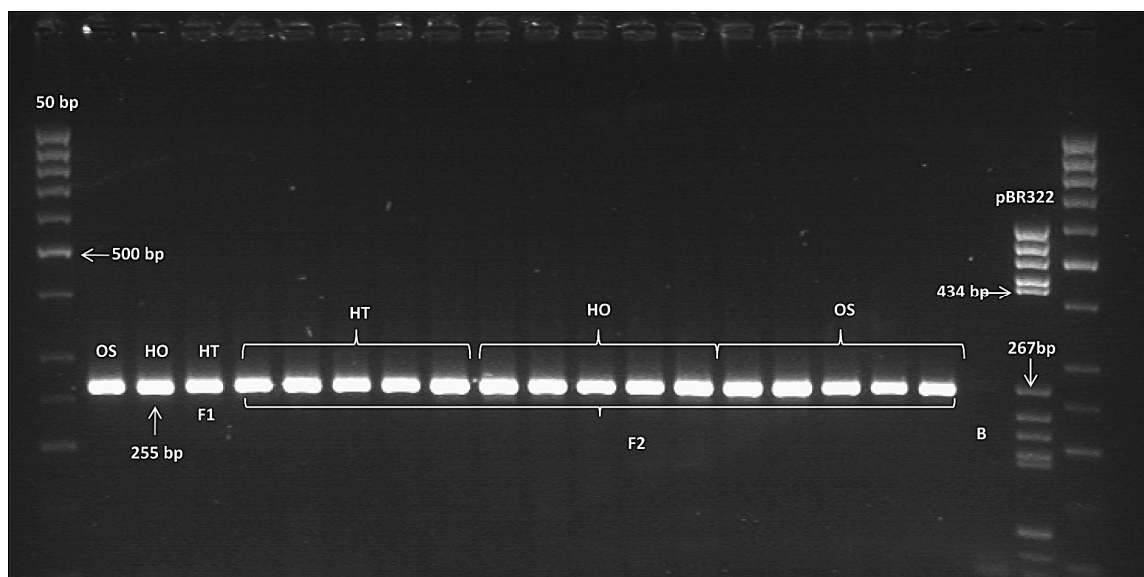
6.2. Upotreba SSR markera za analizu gena *Ahas1-2*

Šest od osam ispitivanih SSR markera sa LG9 je upotrebom SUMO TOUCH programa umnožilo nejasne fragmente, dok su svi fragmenti bili jasni upotrebom TOUCH DOWN 3 programa (sl. 10). Shodno rezultatima preliminarne analize PCR programa, za dalje umnožavanje DNK fragmenata korišćen je program TOUCH DOWN 3.



Slika 10. Umnožavanje fragmenata SSR markerima PCR programom a) SUMO TOUCH i b) TOUCH DOWN 3. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322.

Većina SSR markera sa LG9 su umnožili fragmente različite dužine kod homozigotno tolerantne i osetljive roditeljske linije, tj. pokazali su se kao polimorfni (tab. 3). Jedini monomorfni marker sa ove LG je bio ORS 1220 koji je umnožio fragment dužine 255 bp kod svih ispitivanih genotipova (sl. 11).

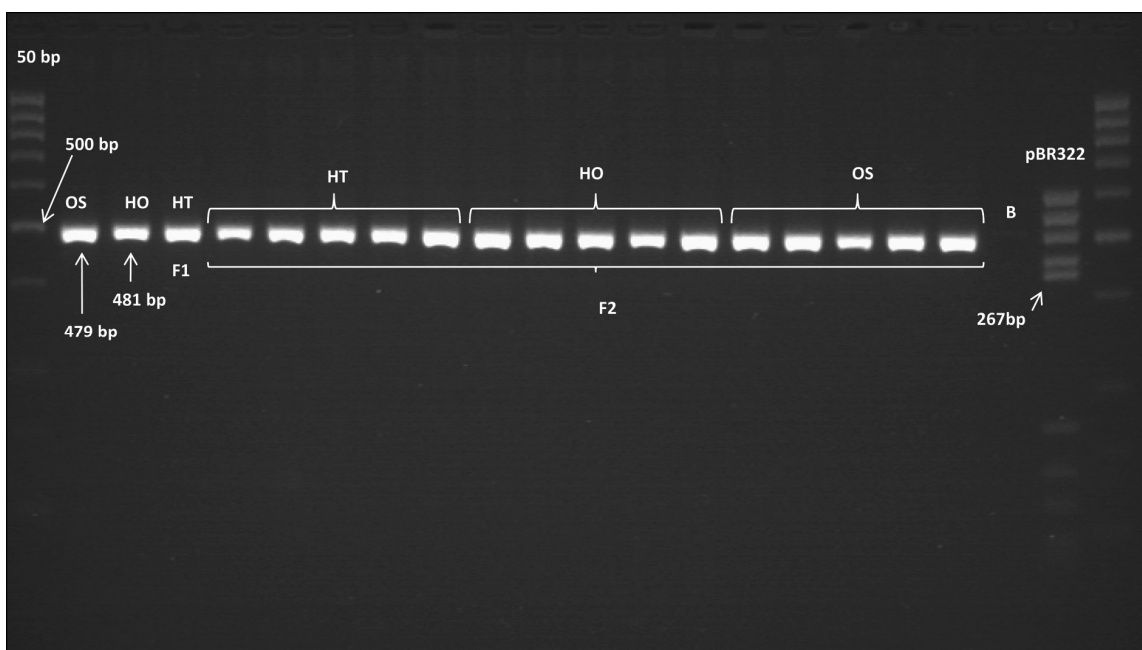


Slika 11. Molekularni profili dobijeni markerom ORS 1220. Uzorci: OS - osetljiv roditelj, HO - homozigotno tolerantan roditelj, HT - heterozigotno tolerantna F₁ generacija, F₂ generacija po 5 uzoraka HT, HO i OS, B - blank. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322 .

Tabela. 3. SSR markeri upotrebljeni za analizu gena *Ahas11-2*, dužina umnoženih fragmenata i položaj SSR markera na mapi vezanosti suncokreta

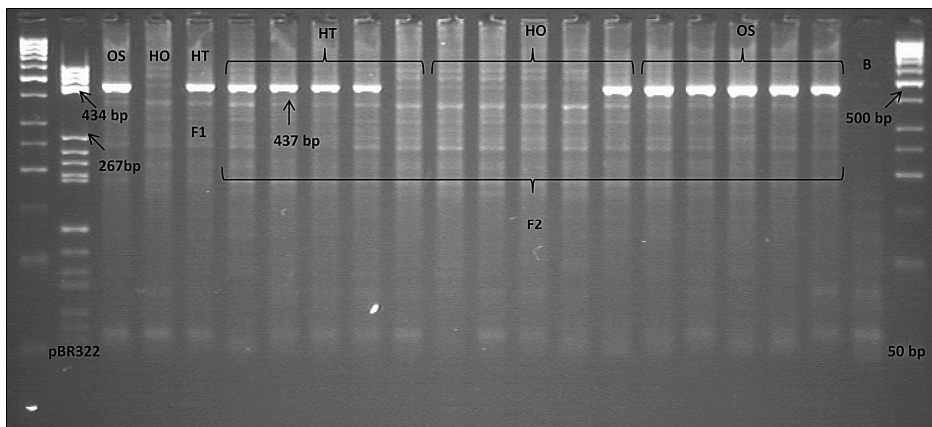
Marker	Dužina umnoženih fragmenata u bp		LG
	Homozigotno tolerantna roditeljska linija	Osetljiva roditeljska linija	
ORS 176	422	417	9
ORS 838	300	313/298	9
ORS 844	285	279	9
ORS 897	multi alel	437	9
ORS 1034	273	275	9
ORS 1211	284	287/233 bp	9,2
ORS 1220	255	255	9
ORS 1270	481	479	9

ORS 1270 je umnožio fragment dužine 479 bp kod osetljivog roditelja, dok je kod homozigotno tolerantnog roditelja uočen fragment dužine 481 bp. Zbog male razlike u dužini umnoženih fragmenata između roditeljskih linija, očitavanje fragmenata kod odabranih biljaka F₂ generacije je bila otežana, međutim i nakon duže migracije na Metaphor agaroznom gelu uočeni su profili koji ne odgovaraju oceni na polju (sl. 12).



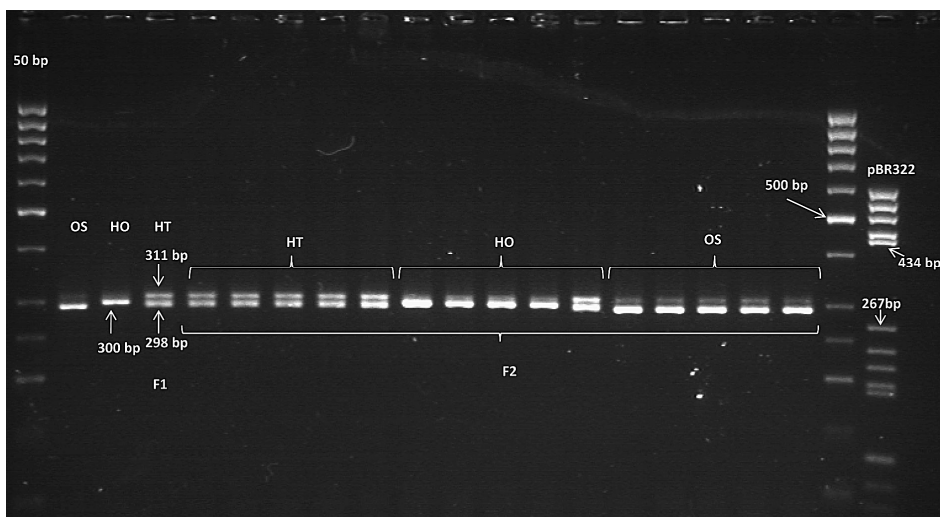
Slika 12. Molekularni profili dobijeni markerom ORS 1270. Uzorci: OS - osetljiv roditelj, HO - homozigotno tolerantan roditelj, HT - heterozigotno tolerantna F₁ generacija, F₂ generacija po 5 uzoraka HT, HO i OS, B - blank. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322 .

ORS 897 je umnožio fragment dužine 437 bp kod osetljivog roditelja i F₁, dok ovaj fragment nije umnožen kod homozigotno tolerantnog roditelja. Odsustvo ovog fragmenta kod tolerantne roditeljske linije je objašnjeno postojanjem nultog alela. Kod odabranih biljaka F₂ generacije uočena su oba profila, međutim nisu svi profili odgovarali oceni tolerantnosti na polju (sl. 13). Takođe, ovaj prajmer je umnožio veliki broj nespecifičnih fragmenata iste dužine kod svih analiziranih genotipova.



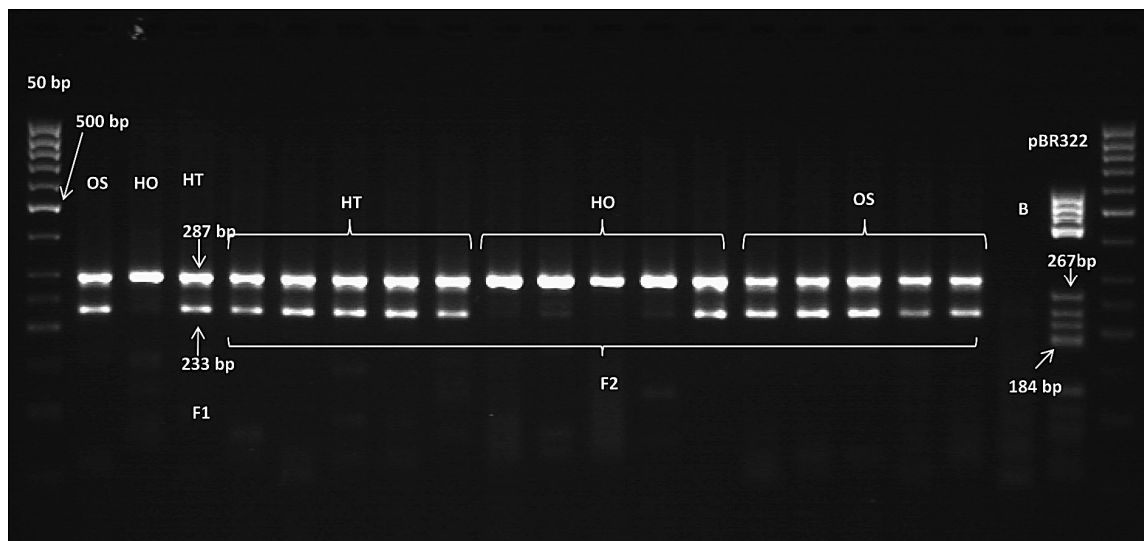
Slika 13. Molekularni profili dobijeni markerom ORS 897. Uzorci OS - osetljiv roditelj, HO - homozigotno tolerantan roditelj, HT - heterozigotno tolerantna F₁ generacija, F₂ generacija po 5 uzoraka HT, HO i OS. B - blank. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322 .

ORS 838 je umnožio fragmente različite dužine između homozigotno tolerantne i osetljive roditeljske linije. Kod osetljivog roditelja i F₁ potomstva umnožena su dva fragmenta dužine 298 bp i 311 bp, dok je kod homozigotno tolerantnog roditelja umnožen jedan dužine 300 bp. Kod odabranih biljaka F₂ generacije uočena su oba profila, međutim nisu svi profili odgovarali oceni tolerantnosti na polju (sl. 14).



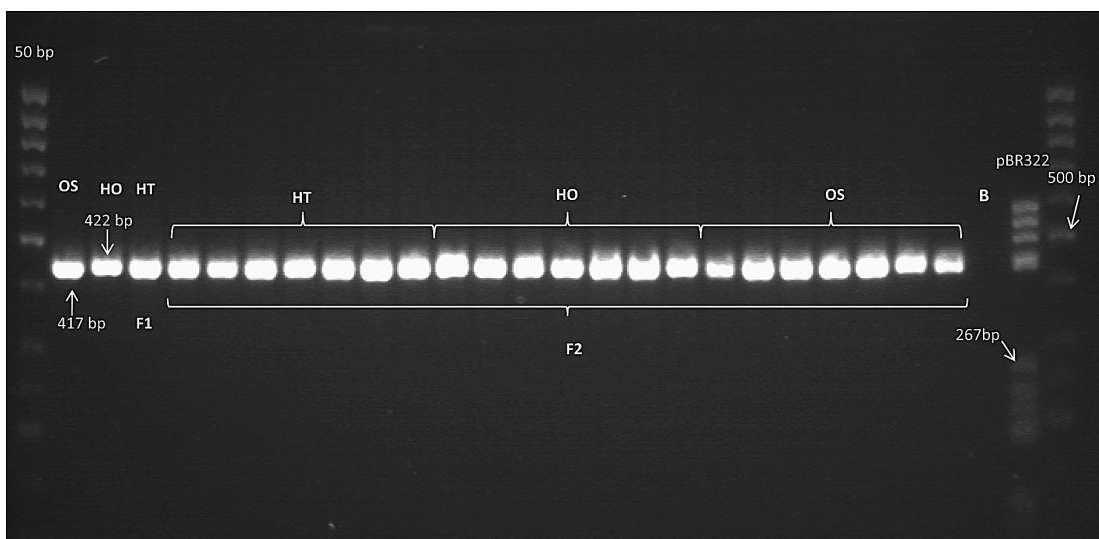
Slika 14. Molekularni profili dobijeni markerom ORS 838. Uzorci OS - osetljiv roditelj, HO - homozigotno tolerantan roditelj, HT - heterozigotno tolerantna F₁ generacija, F₂ generacija po 5 uzoraka HT, HO i OS, B- blank. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322 .

ORS 1211 je umnožio fragment dužine 287 bp kod svih ispitivanih genotipova, dok je kod osetljive roditeljske linije i F₁ potomstva umnožen, dodatno, i fragment dužine 233 bp. Kod odabranih biljaka F₂ generacije uočena su oba profila, međutim nisu svi profili odgovarali oceni tolerantnosti na polju (sl. 15).

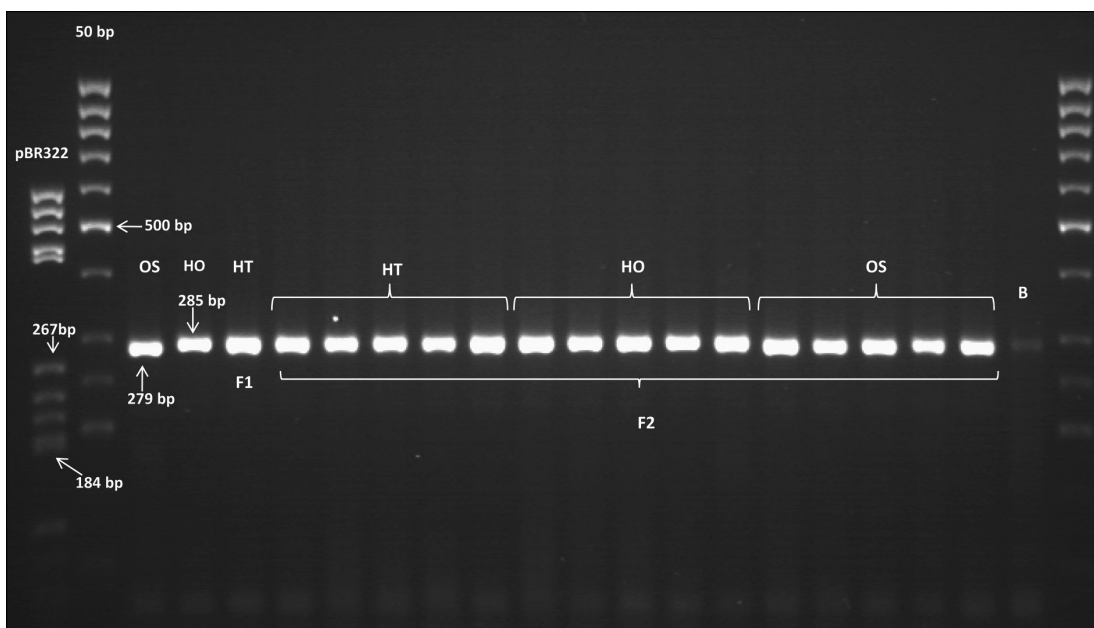


Slika 15. Molekularni profili dobijeni markerom ORS 1211. Uzorci OS - osetljiv roditelj, HO - homozigotno tolerantan roditelj, HT - heterozigotno tolerantna F₁ generacija, F₂ generacija po 5 uzoraka HT, HO i OS, B - blank. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322 .

ORS 176 i ORS 844 su umnožili fragmente različite dužine kod tolerantnog i osetljivog roditelja (sl. 16 i 17). Razlika u dužini fragmenta između tolerantnog i osetljivog roditelja je kod ORS 176 iznosila 5 bp, a kod ORS 844 6 bp. Fragment dužine 285 bp, koji je ORS 844 umnožio kod svih tolerantnih genotipova, omogućio je razlikovanje od osetljivog genotipa kod kog je umnožen fragment 279 bp (sl. 17). Ovo nije bio slučaj sa prajmerom ORS 176.



Slika 16. Molekularni profili dobijeni markerom ORS 176. Uzorci OS - osetljiv roditelj, HO - homozigotno tolerantan roditelj, HT - heterozigotno tolerantna F₁ generacija, F₂ generacija po 5 uzoraka HT, HO i OS, B - blank. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322 .



Slika 17. Molekularni profili dobijeni markerom ORS 844. Uzorci OS - osetljiv roditelj, HO - homozigotno tolerantni roditelj, HT - heterozigotno tolerantna F₁ generacija, F₂ generacija po 5 uzoraka HT, HO i OS, B - blank. Korišćene lestvice: 50 bp i pBr322 .

6.3. Molekularna analiza gena *Ahas11-2*

6.3.1. Umnožavanje *Ahas11-2* gena DNK-specifičnim prajmerima

Za umnožavanje delova gena *Ahas11-2* upotrebljene su različite kombinacije prajmera, početni (forward) i krajnji (reverse). Početne kombinacije prajmera su testirane na gradijentu temperature vezivanja prajmera (T_a) u cilju određivanja optimalne za umnožavanje DNK fragmenata. Sve kombinacije prajmera, sem ForBru-RevBru, umnožavaju deo sekvence oko mesta mutacije (sl. 18). Analizirane su sledeće kombinacije prajmera: ForBru-RevBru; For5-Rev4; For1-Rev8; For2-Rev3; For2-Rev1; ForBru-Rev3; For5-Rev1 i ForBru-Rev4 (sl. 19-22).

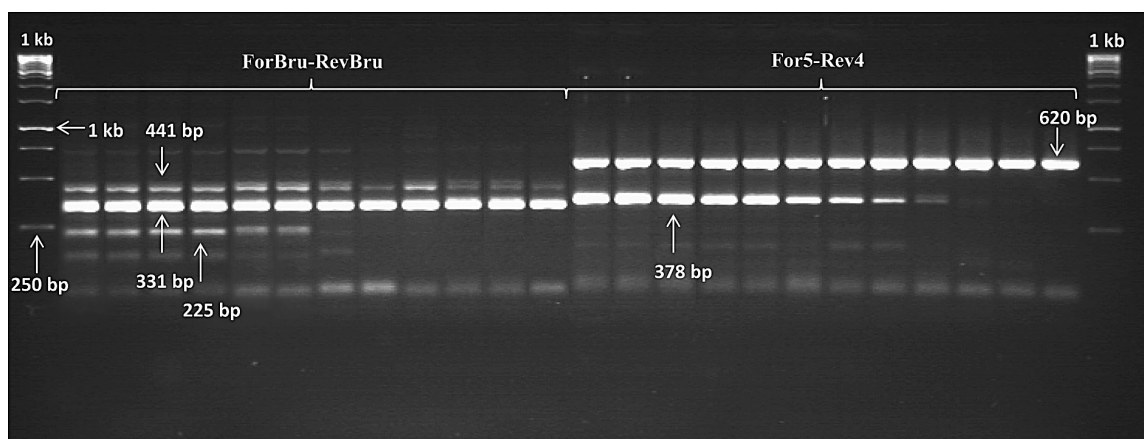
```

1 atggcggctc ctcccaacc tccatctcc tccaaccac cgtaaccgc gcgcgactg
61 ccaccacgct cgccttct cccccgttc gcattaccca tcattccac tacccaaaaa
121 cgacaccgct tccacatctc caatgttctc tcgactcca aatccaccac caccaccacc
181 accaccacca ccaccactca accaccgta caggcgcagc cttttgtctc cgttacgcg
241 cctgatcaac cgagaaaagg cgacagcgtg ttggtggaag ctctggaacg ggaagggtc
301 accgacgtct tcgcctacc cggcggcgcg tcaatggaga tccaccaagc tctcacgcg
361 tcaagcacta tccgeaatgt gctcccaat cacgaacagg gcggcgtgtt cggcccgaa
421 ggctacgcac gcgcctcgg tcttccggc gtgtgatcg ccacttcgg tctggagct
481 acgaacctag ttaggtct tctgacgcg ctgttagaca gtgtcccat ggtggcaatc
541 accggtcaag ttctcggag aatgatcga accgatgctt tcaagaaac cccaattgtt
601 gagtaaacac gttcgattac taaacataat tatcttgtt tggatgtga ggatattccc
661 agaattgtc gtgaggctt ttatcttgc agtccgggc gaccggccc ggtttgata
721 gatgtaccga aagatataca gcaacagta ggggcccga aatgggatga accgatgagg
781 ttaccgggtt atttgtctag aatgccgaag cctcaatatg atgggcattt ggaacagatt
841 gttagggttg tgggggaagc gaagaggccg gttttgatg tgggtggttg gttttgaa
901 tcggatgatg agttagggc gtttggagc cttaacggga tcccggtgc gagtactttg
961 atggggcttg gaggctacc ggcttcgagt gattgtcgc tccatgctg tgggatgcat
1021 ggtaccggtt atgcgaatta tgcggtgat aagatgatt tgttcttgc gttggggtg
1081 cggttgatg accgtgtgac ggggaagcct gaggcgttg ctagtgggc gaagattgtt
1141 catattgata ttgatcctgc tga aattggg aaaaataaac agcctcatgt gtcgattgt
1201 ggggatatta aggtcgcgtt acaggggtt aacaagatt tggaggaaa gaattcgggt
1261 actaatcttg attttcgaa ctggagaaag gaattggatg acaaaaaagt gaagtcccg
1321 ttgagcttta aaacgtttg cgaagcgatt cctccacagt atgctattca agttctgat
1381 gagtaacgg gcgggaatgc aattattagc accggggtcg ggcaacatca gatgtgggtc
1441 gctcagtttt acaaatataa caaacctaga caatggctga cgtcggcgg gctaggggca
1501 atgggttcg gcctgcccgc tctatcggg gcggcgttg caagacctga tgcgtagta
1561 gttgacatcg accgtgacgg aagctttatg atgaatgtc aagattgac cacaatccg
1621 gttgaaaatc tgcgggttaa gatittatta cttaacaatc agcatttggg tatggtggt
1681 cagtgggagg atcggttta caaggcgaat cgggctcata cctacttagg aaaccctca
1741 aaagatcgg aatattccc taacatggtg aagtttctg aagcctgta tatcccgct
1801 gctcgagtga cccaaaaggc ggatctacga gcagctatc agaagatgt ggatacccc
1861 gggccttact tgttgatgt gattgtccc catcaagaac acgtgttgc catgatcccg
1921 gctggcggag gtttctcga tfgatcacc gaggtgatg gcagaacgaa atattga

```

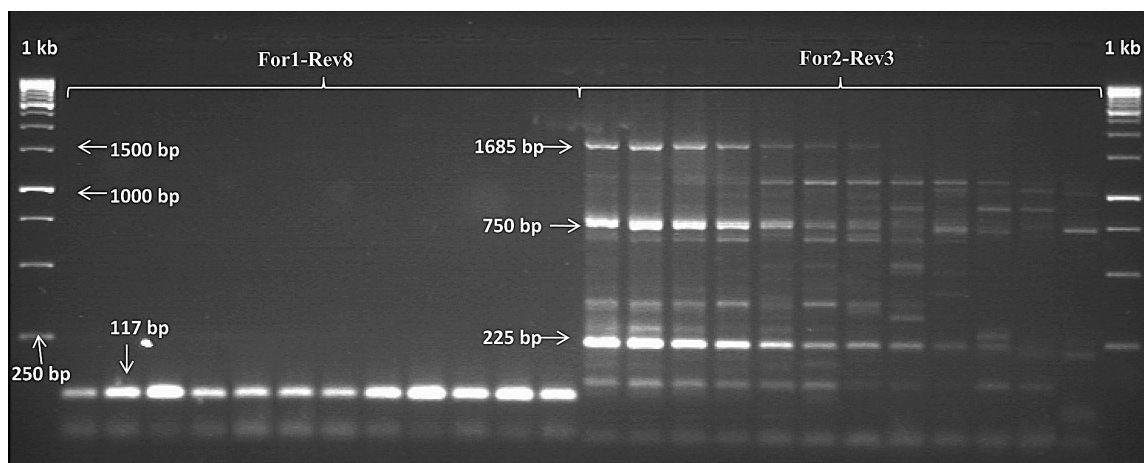
Slika 18. Mesta vezivanja prajmera na sekvenci gena *Ahas11-2*: žuto - ForBru-RevBru, zeleno - For5-Rev4, roza - For2-Rev3, sivo - For1-Rev8, plava - Rev1, crveno – mutiran kodon.

Parovi prajmera ForBru-RevBru, For5-Rev4, For2-Rev3 i For2-Rev1 su umnožili veći broj fragmenata, pogotovu na nižim T_a (Slike 19-21). Broj umnoženih fragmenata se smanjivao sa povišenjem T_a . Par prajmera For2-Rev3 je umnožio najveći broj nespecifičnih fragmenata u odnosu na ostale ispitivane parove prajmera. Bez obzira na veći broj umnoženih fragmenata, fragment očekivane dužine, 750 bp, je umnožen na svim T_a . Sa povišenjem T_a količina produkta se značajno smanjivala. Parovi prajmera ForBru-RevBru, For5-Rev4 i For2-Rev1 su na višim T_a umnožili jedan fragment. Par prajmera ForBru-RevBru je umnožio fragment dužine 331 bp, For5-Rev4 dužine 620 bp, a For2-Rev1 dužine 680 bp (sl. 19-21).

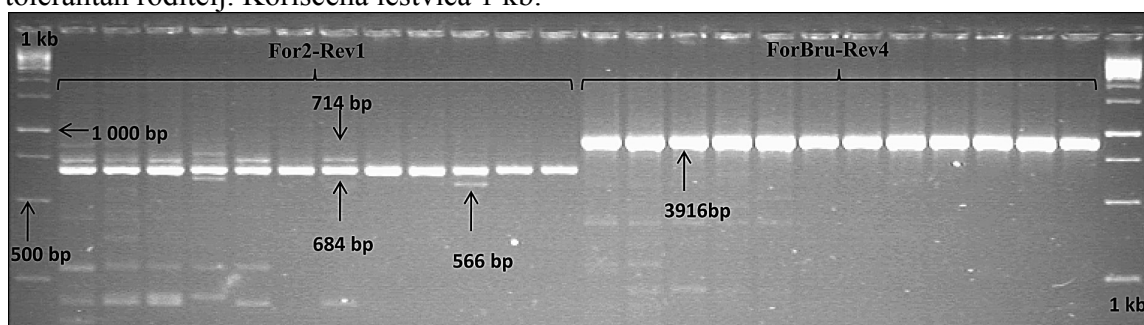


Slika 19. Umnožavanje DNK fragmenata parovima prajmera ForBru-RevBru i For5-Rev4 na gradijentu temperature vezivanja prajmera od 55°C do 65°C. Uzorak je homozigotno tolerantan roditelj. Korišćena lestvica 1 kb .

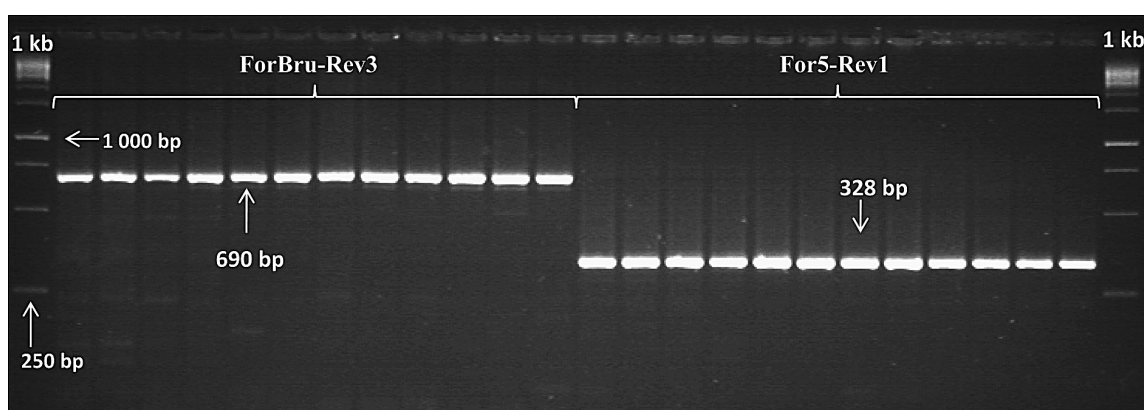
Parovi prajmera For1-Rev8, ForBru-Rev3, For5-Rev1 i ForBru-Rev4 su umnožili jedan fragment na svim T_a (sl. 20 - 22). Par prajmera For1-Rev8 je umnožio fragment dužine 117 bp, ForBru-Rev3 fragment dužine 690 bp, For5-Rev1 fragment dužine 328 bp, a ForBru-Rev4 fragment dužine 328 bp.



Slika 20. Umnožavanje DNK fragmenata parovima prajmera For1-Rev8 i For2-Rev3 na gradijentu temperature vezivanja prajmera od 55°C do 65°C. Uzorak je homozigotno tolerantan roditelj. Korišćena lestvica 1 kb.



Slika 21. Umnožavanje DNK fragmenata parovima prajmera For2-Rev1 i ForBru-Rev4 na gradijentu temperature vezivanja prajmera od 54°C do 66°C. Uzorak je homozigotno tolerantan roditelj. Korišćena lestvica 1 kb.



Slika 22. Umnožavanje DNK fragmenata parovima prajmera ForBru-Rev3 i For5-Rev1 na gradijentu temperature vezivanja prajmera od 54°C do 66°C. Uzorak je homozigotno tolerantan roditelj. Korišćena lestvica 1 kb.

Pošto je na višim T_a umnožen jedan fragment upotrebom svih kombinacija prajmera (sem jednog), dalje umnožavanje DNK-specifičnim prajmerima je vršeno na T_a od 65°C u cilju postizanja što specifičnijih uslova za umnožavanje delova gena *Ahas11-2*.

6.3.2. Razvoj CAPS markera

Nakon analize restrikcionih mesta na sekvencama gena *Ahas11-2* i *ahas11* odabrani su enzimi koji bi potencijalno omogućili razlikovanje ove dve sekvence na osnovu rasporeda restrikcionih mesta. To su enzimi: Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaJI) i BcnI (NciI) (tab. 4).

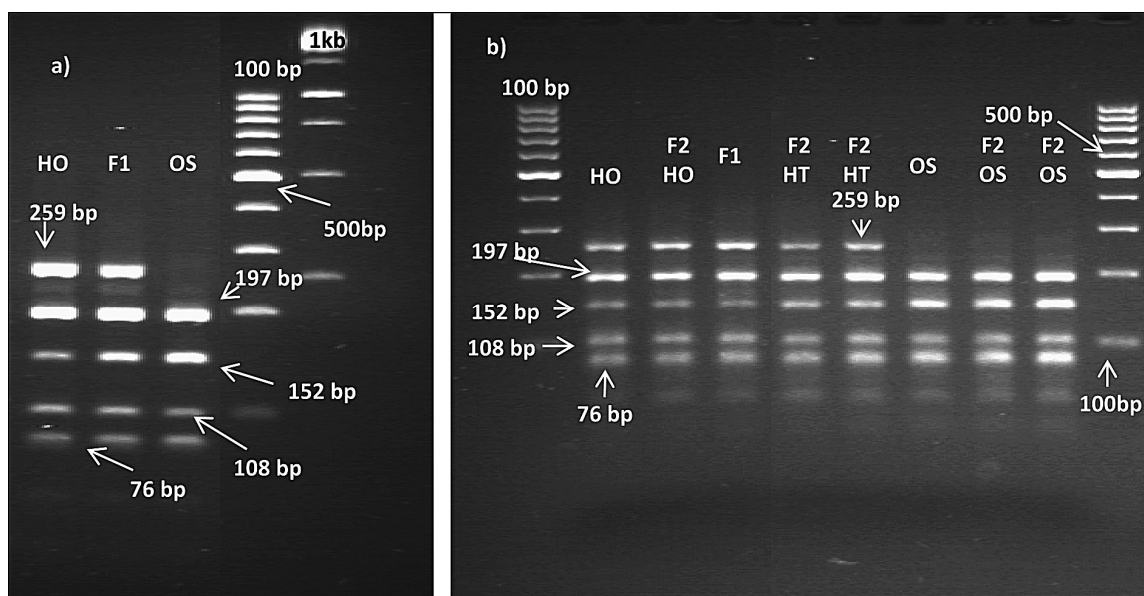
Tabela. 4. Mesta digestije upotrebljenih restrikcionih enzima

Enzim	Mesto digestije
Kpn2I (BspEI)	5'...T↓C C G G A...3'
	3'...A G G C C↑T...5'
BseDI (BsaJI)	5'...C↓C N N G G...3'
	3'...G G N N C↑C...5'
BcnI (NciI)	5'...C C↓S G G...3'
	3'...G G S↑C C...5'

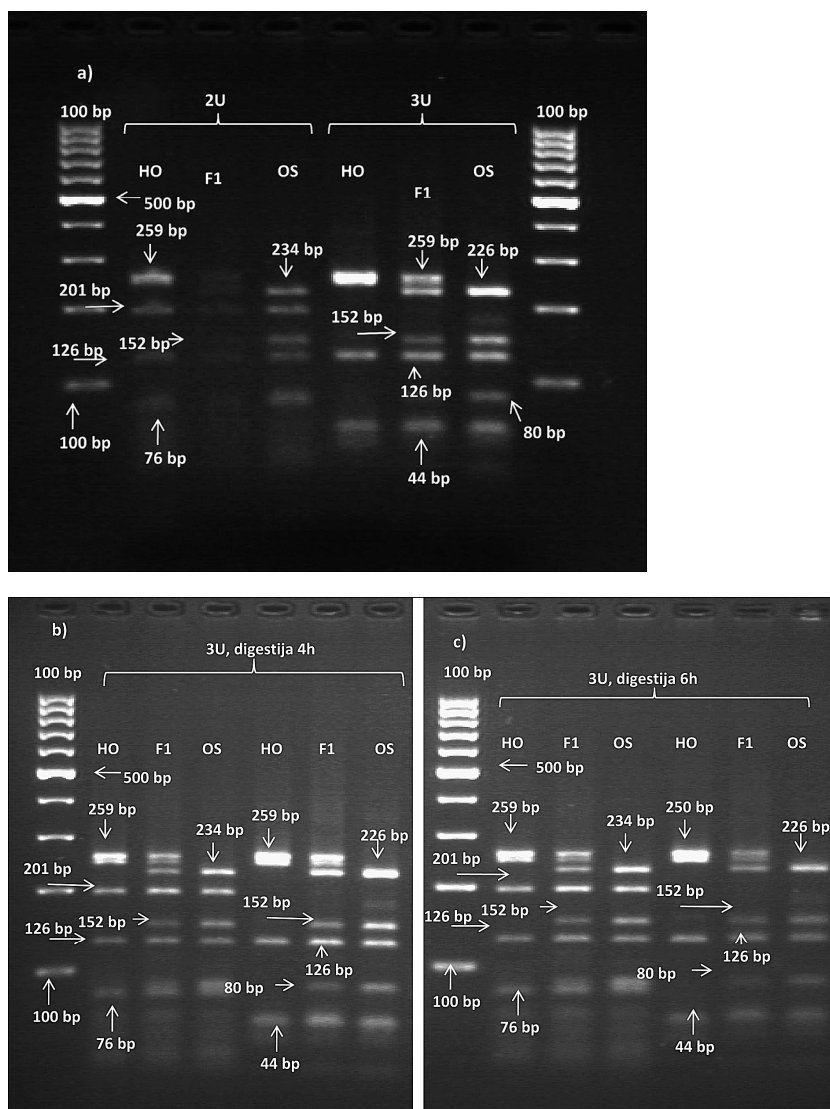
6.3.3. Optimizacija reakcije digestije enzimima

Produkti PCR reakcije dobijeni umnožavanjem različitim kombinacijama prajmera su podvrgnuti reakciji digestije restrikcionim enzimom BcnI. Analiziran je uticaj različitih koncentracija enzima i vremena digestije u cilju optimizacije reakcije. Profili dobijeni nakon digestije sa 5U i 10U enzima se nisu razlikovali (sl. 23). Međutim prilikom analize

profila dobijenih digestijom sa 2U i 3U restriktionog enzima BcnI, jasniji profili su dobijeni digestijom sa 3U enzima (sl. 24a). Ispitivanje vremena digestije je pokazalo da se profili dobijeni nakon 4h i 6h digestije nisu značajno razlikovali (sl. 24b i c). Na osnovu dobijenih profila, dalja digestija produkata PCR reakcija je vršena sa 3U enzima 4h u temperaturnim uslovima preporučenim od strane proizvođača za svaki enzim.



Slika 23. Profili dobijeni digestijom produkata umnožavanja kombinacijom prajmera For6-Rev5 tretiranih sa: a) 10U i b) 5U enzima BcnI, 6h na 37°C. Korišćene lestvice: 1 kb i 100 bp.

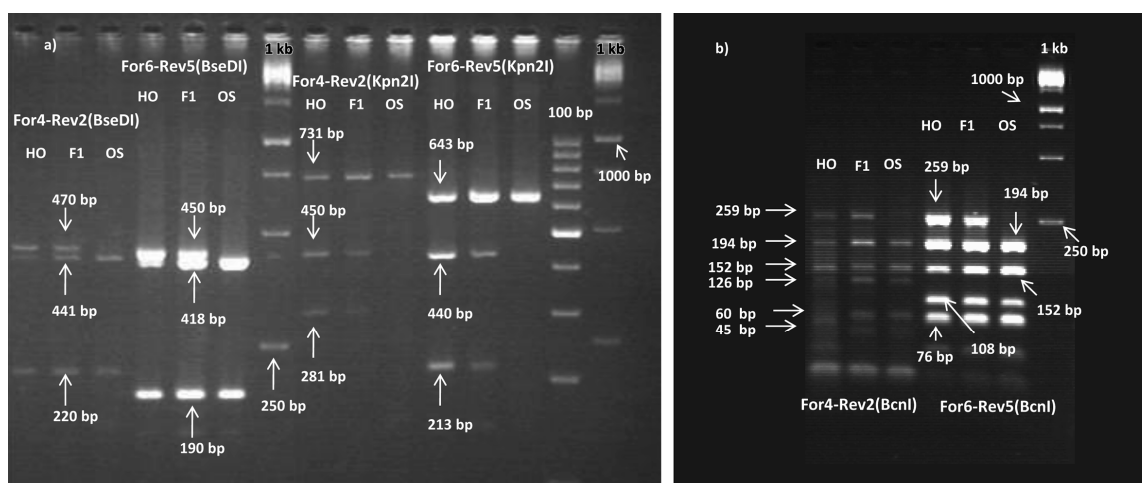


Slika 24. Profili dobijeni digestijom produkta umnožavanja kombinacijama prajmera ForBru-Rev4 i ForBru-Rev3 sa a) 2U i 3U enzima BcnI; b) 3U enzima BcnI 4h i c) 3U enzima BcnI 6h. Uzorci: HO - tolerantan roditelj, F₁ potomstvo i OS - osetljiv roditelj. Korišćena lestvica 100 bp.

6.3.4. Razvoj dominantnih markera za detekciju tolerantnosti prema tribenuron-metilu

Prilikom testiranja različitih kombinacija prajmera, pojedine kombinacije su nakon digestije restrikcionim enzimima omogućile razlikovanje tolerantnih (homozigotno

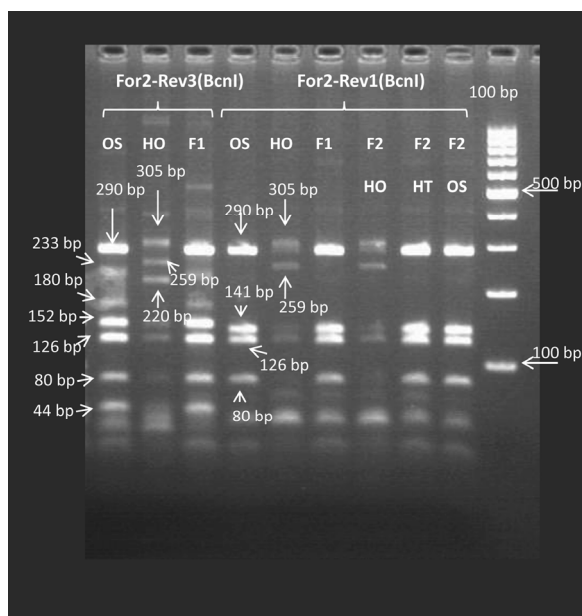
tolerantan roditelj i F₁ potomstvo) od osetljivog genotipa tj. pokazali su se kao dominantni markeri. To je bio slučaj sa kombinacijama prajmera For4-Rev2 i For6-Rev5 nakon digestije sa sva tri restrikciona enzima (u daljem tekstu CAPS_{For4-Rev2} i CAPS_{For6-Rev5}). CAPS_{For4-Rev2(BseDI)} je kod tolerantnih genotipova umnožio fragment dužine 470 bp, dok ovaj fragment nije uočen kod osetljivog genotipa. Profil tolerantnih genotipova je prilikom upotrebe CAPS_{For6-Rev5(BseDI)} sadržao fragment dužine 450 bp, koji se nije javio kod osetljivog genotipa. Marker CAPS_{For4-Rev2(Kpn2I)} je kod tolerantnih genotipova umnožio fragmente dužine 281 bp i 450 bp, dok je CAPS_{For6-Rev5(Kpn2I)} umnožio fragmente dužine 213 bp i 440 bp. Ovi fragmenti nisu uočeni kod osetljivog genotipa (sl. 25a). Fragment dužine 259 bp je umnožen samo kod tolerantnih genotipova markerima CAPS_{For4-Rev2(BcnI)} i CAPS_{For6-Rev5(BcnI)}, te je omogućio razlikovanje tolerantnih od osetljivog genotipa (sl. 25b).



Slika 25. Molekularni profili tolerantnog roditelja (HO), F₁ potomstva i osetljivog roditelja (OS) dobijeni upotrebom dominantnih markera: a) CAPS_{For4-Rev2(BseDI)}, CAPS_{For6-Rev5(BseDI)}, CAPS_{For4-Rev2(Kpn2I)} i CAPS_{For6-Rev5(Kpn2I)}; b) CAPS_{For4-Rev2(BcnI)} i CAPS_{For6-Rev5(BcnI)}. Korišćene lestvice 1 kp i 100 bp.

Upotrebom markera CAPS_{For2-Rev3(BcnI)} i CAPS_{For2-Rev1(BcnI)}, profil homozigotno tolerantnog genotipa je sadržao veći broj fragmenata u odnosu na profile heterozigotno tolerantnog i osetljivog genotipa (sl. 26). Fragmenti dužine 259 bp i 305 bp su uočeni samo kod homozigotno tolerantnog genotipa upotrebom CAPS_{For2-Rev1(BcnI)}. Osim ova dva fragmenta, marker CAPS_{For2-Rev3(BcnI)} je umnožio i fragment dužine 220 bp kod

homozigotno tolerantnog genotipa. Svi navedeni fragmenti nisu umnoženi kod heterozigotno tolerantnog i osetljivog genotipa.



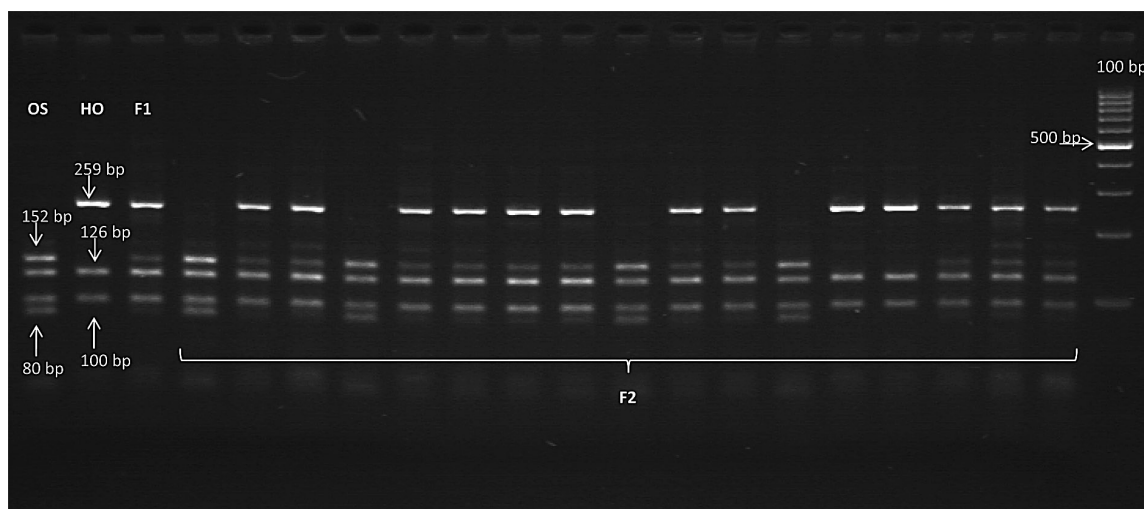
Slika 26. Molekularni profili tolerantnog roditelja (HO), F₁ potomstva, osetljivog roditelja (OS) i F₂ potomstva dobijeni upotrebom dominantnih markera: CAPS_{For2-Rev3(BcnI)} i CAPS_{For2-Rev1(BcnI)}. Korišćena lestvica 100 bp.

6.3.5. Razvoj kodominantnih markera za detekciju tolerantnosti prema tribenuronmetilu

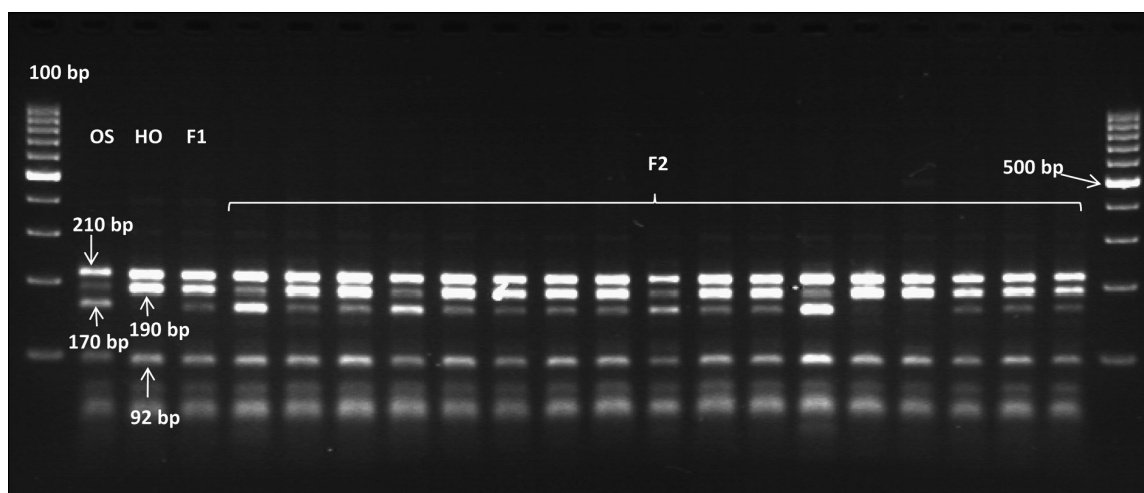
Većina ispitivanih markera je omogućila razlikovanje i homozigotno tolerantnog od heterozigotno tolerantnog genotipa, tj. pokazala se kao kodominantna. Tu spadaju markeri: CAPS_{ForBru-Rev4}, CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For3-Rev6}, CAPS_{For7-Rev7} i CAPS_{For8-Rev7} i CAPS_{For5-Rev4}.

Fragment dužine 259 bp je uočen kod tolerantne roditeljske linije upotrebom CAPS_{For3-Rev6(BcnI)}, dok su kod osetljivog roditelja umnoženi fragmenti dužine 80 bp i 152 bp (sl. 27). Profil F₁ potomstva je sardžao sve fragmente koji su umnoženi kod tolerantnog i osetljivog genotipa. Međutim, upotrebom CAPS_{For3-Rev6(Kpn2I)} i CAPS_{For3-Rev6(BseDI)} razlika između homozigotno i heterozigotno tolerantnog genotipa se sastojala u različitom intenzitetu umnoženih fragmenata. Kod tolerantnog roditelja, nakon digestije enzimom BseDI, uočeno je prisustvo fragmenata dužine 92 bp, 190 bp i 210 bp, a kod osetljivog roditelja dodatno i fragmenta dužine 170 bp (sl. 28). Fragmenti dužine 176 bp i 343 bp su

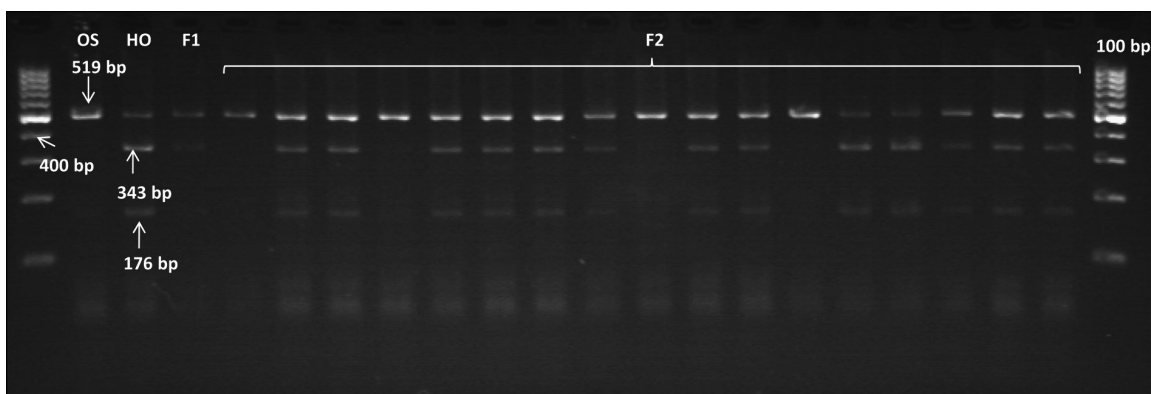
uočeni kod tolerantnih genotipova nakon digestije enzimom Kpn2I, dok ovi fragmenti nisu uočeni kod osetljivog roditelja (sl. 29).



Slika 27. Molekularni profili roditeljskih linija suncokreta (tolerantna - HO i osetljiva - OS), F₁ i odabranih biljaka F₂ generacije dobijeni upotrebom markera CAPS_{For3-Rev6(BclI)}. Korišćena lestvica 100 bp.

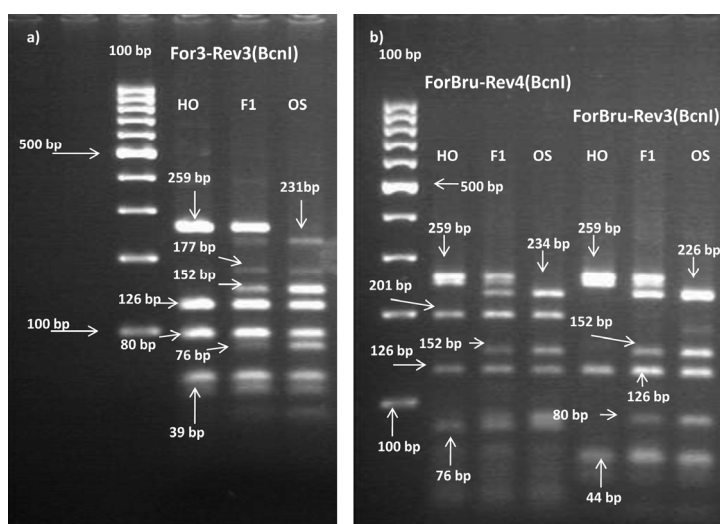


Slika 28. Molekularni profili roditeljskih linija suncokreta (tolerantna - HO i osetljiva - OS), F₁ i odabranih biljaka F₂ generacije dobijeni upotrebom markera CAPS_{For3-Rev6(BseDI)}. Korišćena lestvica 100 bp.



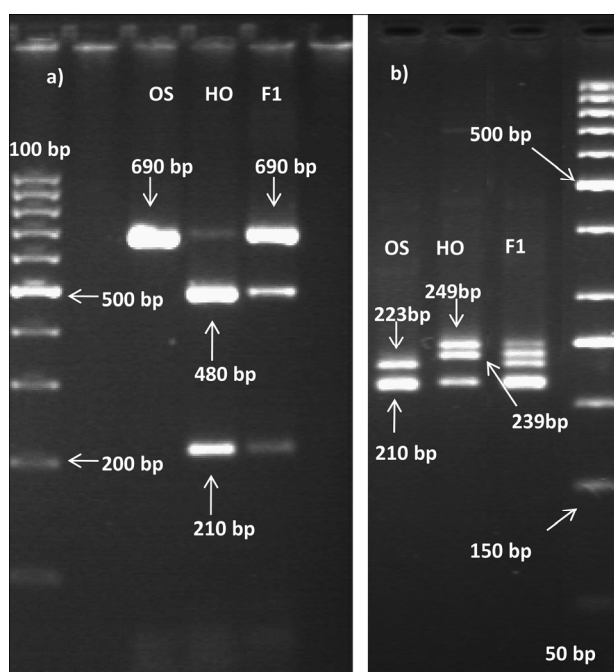
Slika 29. Molekularni profili roditeljskih linija suncokreta (tolerantna - HO i osetljiva - OS), F₁ i odabranih biljaka F₂ generacije dobijeni upotrebom markera CAPS_{For3-Rev3(Kpn21)}. Korišćena lestvica 100 bp.

Markeri CAPS_{For3-Rev3(BcnI)}, CAPS_{ForBru-Rev3(BcnI)} i CAPS_{ForBru-Rev4(BcnI)} su umnožili fragment dužine 259 bp kod tolerantne roditeljske linije, dok ovaj fragment nije uočen kod osetljive linije. CAPS_{For3-Rev3(BcnI)} je umnožio fragmente dužine 76 bp, 152 bp, 177 bp i 231 bp kod osetljivog genotipa, dok ovi fragmenti nisu umnoženi kod tolerantnog genotipa (sl. 30a). Kod osetljivog roditelja, marker CAPS_{ForBru-Rev4(BcnI)} je umnožio fragmente dužine 152 bp i 234 bp, odnosno markera CAPS_{ForBru-Rev4(BcnI)} je umnožio fragmente dužine 152 bp i 226 bp (sl. 30b). Ovi fragmenti nisu umnoženi kod homozigotno tolerantnog genotipa.



Slika 30. Profili dobijeni upotrebom a) CAPS_{For3-Rev3(BcnI)}; b) CAPS_{ForBru-Rev4(BcnI)} i CAPS_{ForBru-Rev3(BcnI)}. Uzorci: HO - tolerantan roditelj, F₁ potomstvo i OS - osetljiv roditelj. Korišćena lestvica 100 bp.

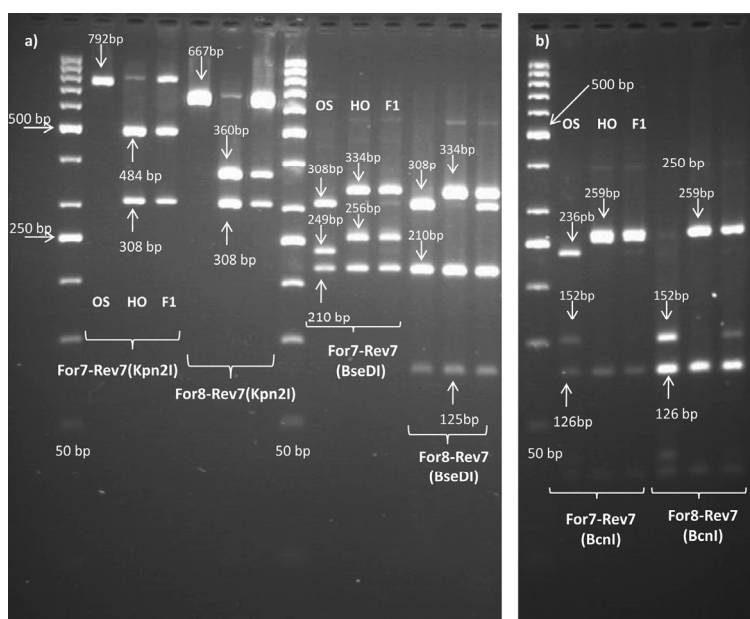
CAPS_{ForBru-Rev3(Kpn2I)} i CAPS_{ForBru-Rev3(BseDI)} su omogućili razlikovanje homozigotno tolerantnog, heterozigota i osetljivog genotipa. Marker CAPS_{ForBru-Rev3(Kpn2I)} je kod tolerantnog roditelja je umnožio dva fragmenta dužine 210 bp i 480 bp, dok je kod osetljivog roditelja umnožen jedan fragment dužine 690 bp (sl. 31a). Fragmenti dužine 239 bp i 249 bp su uočeni kod tolerantnog roditelja upotrebom marker CAPS_{ForBru-Rev3(BseDI)}, dok ovi fragmenti nisu uočeni kod osetljivog roditelja. Kod osetljivog roditelja je umnožen fragment dužine 223 bp, koji nije umnožen kod tolerantnog roditelja (sl. 31b). U oba slučaja svi fragmenti koji su umnoženi kod tolerantne i osetljive roditeljske linije su umnoženi i kod F₁ potomstva.



Slika 31. Profili dobijeni upotrebom markera: a) CAPS_{ForBru-Rev3(Kpn2I)} i b) CAPS_{ForBru-Rev3(BseDI)} (korišćena lestvica 100 bp). Uzorci: HO - tolerantan roditelj, F₁ potomstvo i OS - osetljiv roditelj.

Profili dobijeni markerima CAPS_{For7-Rev7} i CAPS_{For8-Rev7} omogućili su razlikovanje tolerantne od osetljive roditeljske linije, ali i razlikovanje tolerantnog roditelja od F₁ potomstva. CAPS_{For7-Rev7(Kpn2I)} je umnožio fragmente dužine 308 bp i 484 bp kod tolerantnog roditelja, dok je kod osetljivog roditelja uočen jedan fragment dužine 792 bp. Upotrebom CAPS_{For8-Rev7(Kpn2I)} kod tolerantnog roditelja su uočeni fragmenti dužine 308 bp

i 360 bp, a kod osetljivog roditelja fragment dužine 667 bp (sl. 32a). $CAPS_{For7-Rev7(BseDI)}$ je kod svih genotipova umnožio fragment dužine 210 bp. Kod homozigotno tolerantnog genotipa je uočeno prisustvo još dva fragmenta dužine 256 bp i 334 bp, a kod osetljivog genotipa fragmenti dužine 249 bp i 308 bp (sl. 32a). Upotrebom $CAPS_{For8-Rev7(BseDI)}$, je osim fragmenta dužine 210 bp (koji je uočen i upotrebom markera $CAPS_{For7-Rev7(BseDI)}$), kod svih genotipova uočen i fragment dužine 125 bp. Dodatno je uočen i fragment dužine 308 bp kod osetljivog roditelja, a fragment dužine 334 bp kod tolerantnog (sl.32a). $CAPS_{For7-Rev7(BcnI)}$ je kod svih ispitivanih genotipova umnožio fragment dužine 126 bp. Kod tolerantnog roditelja, dodatno, je umnožen fragment dužine 259 bp, a kod osetljivog roditelja 152 bp i 236 bp (sl. 32b). Markeri $CAPS_{For7-Rev7(BcnI)}$ i $CAPS_{For8-Rev7(BcnI)}$ su umnožili fragment dužine 259 bp kod tolerantnog roditelja, koji nije umnožen kod osetljivog roditelja, dok je kod osetljivog roditelja umnožen fragment dužine 152 bp koji se nije javio u profilu tolerantnog roditelja (sl. 32b). U svim slučajevima svi fragmenti koji su umnoženi kod tolerantne i osetljive roditeljske linije su umnoženi i kod F_1 potomstva.



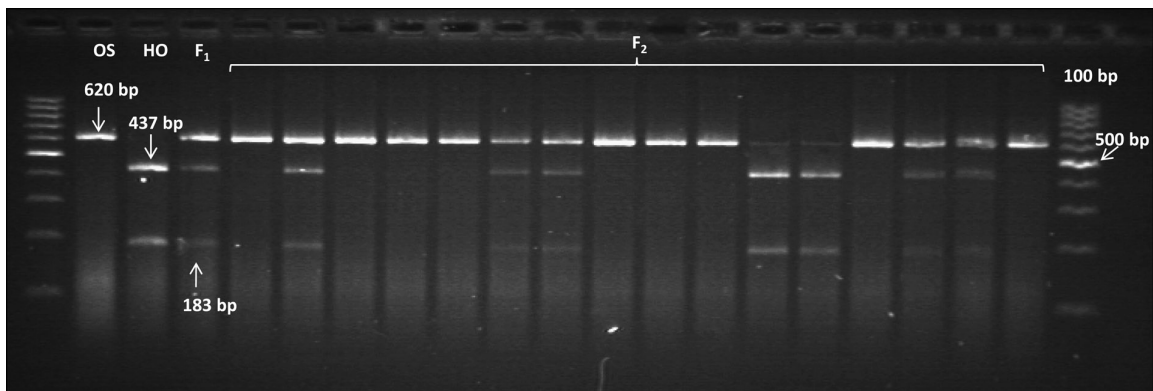
Slika 32. Molekularni profili tolerantnog roditelja (HO), F_1 potomstva, osetljivog roditelja (OS) upotrebom kodominantnih markera: a) $CAPS_{For7-Rev7(Kpn2I)}$, $CAPS_{For8-Rev7(Kpn2I)}$, $CAPS_{For7-Rev7(BseDI)}$ i $CAPS_{For8-Rev7(BseDI)}$. b) $CAPS_{For7-Rev7(BcnI)}$ i $CAPS_{For8-Rev7(BcnI)}$. Korišćena lestvica 50 bp.

CAPS_{For5-Rev4(Kpn2I)} je umnožio fragmente dužine 183 bp i 437 bp kod tolerantnog roditelja, dok je kod osetljivog roditelja uočen jedan fragment dužine 620 bp (sl. 33). CAPS_{For5-Rev4(BcnI)} je umnožio fragment dužine 259 bp kod tolerantne linije, dok kod osetljive nije, a takođe je umnožio i fragment dužine 152 bp kod osetljive linije koji nije umnožen kod tolerantne linije (sl. 34). CAPS_{For5-Rev4(BseDI)} je kod tolerantnih genotipova umnožio fragment dužine 465 bp, koji nije uočen kod osetljivog genotipa, dok je kod osetljivog i heterozigotno tolerantnog genotipa uočen fragment dužine 437 bp, koji nije uočen kod tolerantnog roditelja (sl. 35).

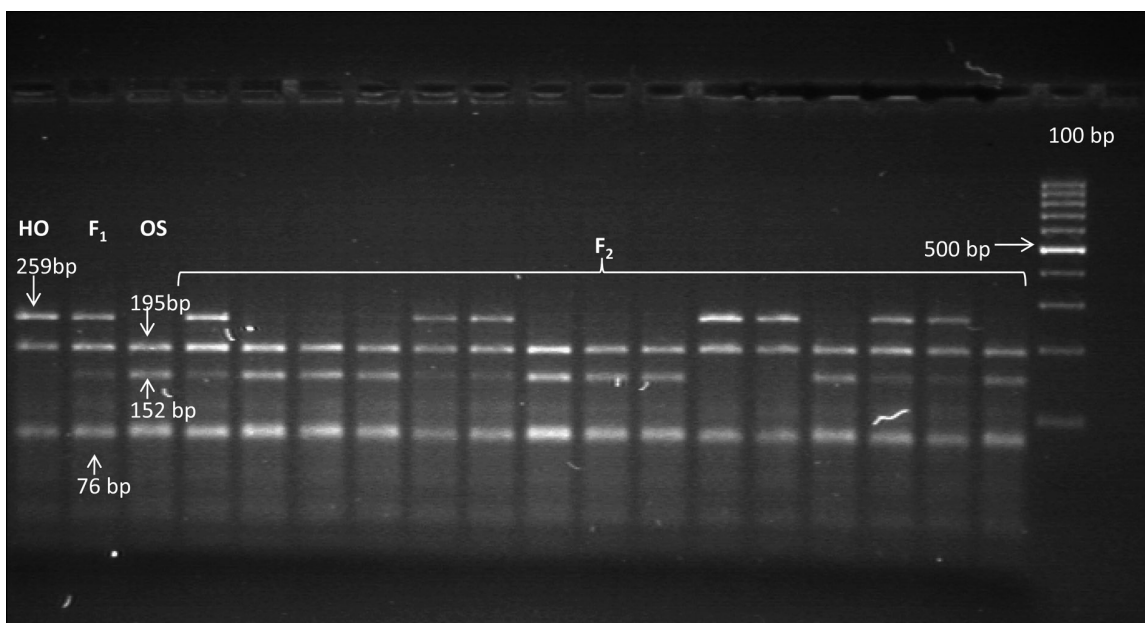
Marker CAPS_{For5-Rev4} je upotrebljen za analizu F₂ generacije. U okviru F₂ generacije, analizirano je 120 biljaka od kojih je 29 bilo homozigotno tolerantno, 56 heterozigotno tolerantno i 35 osetljivo prema tribenuron-metil, što je χ^2 testom ocenjeno kao genotipski odnos razdvajanja 1:2:1. Profili dobijeni upotrebom sva tri markera: CAPS_{For5-Rev4(BcnI)}, CAPS_{For5-Rev4(Kpn2I)} i CAPS_{For5-Rev4(BseDI)} su se poklopili sa ocenom u polju. Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih u polju, pretpostavljen je fenotipski odnos razdvajanja 3:1, karakterističan za dominantno-recesivno monogeno nasleđivanje. Rezultati χ^2 testa su ukazali da između eksperimentalne i teorijske distribucije nije bilo statistički značajnih razlika, čime je prihvaćena hipoteza da je tolerantnost suncokreta prema tribenuron-metil određena jednim genom, koji ima dominantnu i recesivnu formu (tab. 5).

Tabela 5. Odnosi razdvajanja za razvijene kodominantne markere za detekciju gena tolerantnosti prema tribenuron-metil kod suncokreta i ocene u polju, gde H₀ predstavlja očekivani odnos razdvajanja, χ^2 predstavlja izračunatu vrednost χ^2 , a P_(n) vrednost verovatnoće prihvatanja nulte hipoteze (H₀) dobijene iz χ^2 tabele za n stepena slobode.

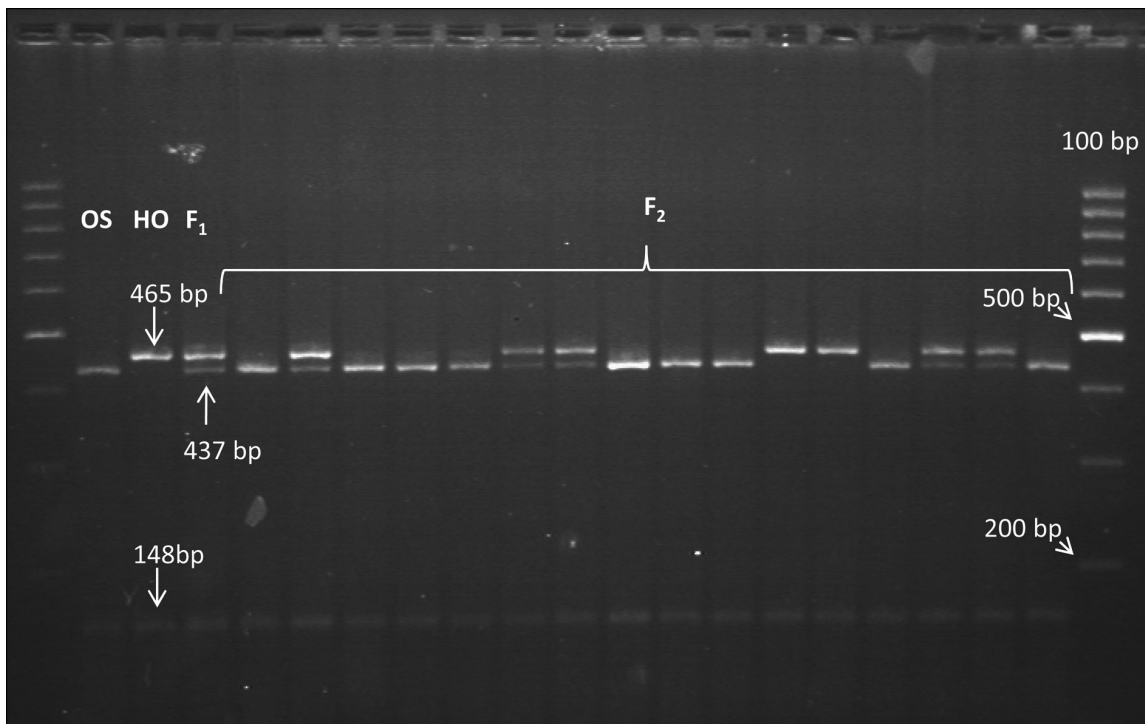
Marker	Eksperimentalne vrednosti ocene tolerantnosti F ₂ potomstva			H ₀	χ^2	P _(n)
	Genotipski odnos razdvajanja					
	AA	Aa	aa			P ₍₂₎
CAPS _{For5-Rev4(Kpn2I)}	29	: 56	: 35	1:2:1	1.13	0.5
CAPS _{For5-Rev4(BseDI)}	29	: 56	: 35	1:2:1	1.13	0.5
CAPS _{For5-Rev4(BcnI)}	29	: 56	: 35	1:2:1	1.13	0.5
	Fenotipski odnos razdvajanja					
	Tolerantnost		Osetljivost			P ₍₁₎
Ocena tolerantnosti u polju	85	:	35	3:1	1.11	0.25



Slika 33. Molekularni profili roditeljskih linija (tolerantna - HO i osetljiva - OS), F₁ i biljaka F₂ generacije dobijeni markerom CAPS_{For5-Rev4(Kpn21)}. Korišćena lestvica 100 bp.



Slika 34. Molekularni profili roditeljskih linija (tolerantna - HO i osetljiva - OS), F₁ i biljaka F₂ generacije dobijeni markerom CAPS_{For5-Rev4(Bcn1)}. Korišćena lestvica 100 bp.



Slika 35. Molekularni profili roditeljskih linija (tolerantna - HO i osetljiva - OS), F₁ i biljaka F₂ generacije dobijeni markerom CAPS_{For5-Rev4(BseDI)}. Korišćena lestvica 100 bp.

7. DISKUSIJA

7.1. *In vitro* test za detekciju tolerantnih genotipova

U okviru *in vitro* testa praćen je razvoj homozigotno i heterozigotno tolerantnih genotipova suncokreta prema tribenuron-metilu, kao i razvoj osetljivog genotipa na MS podlogama u kojima je dodata različita količina tribenuron-metila. Za analizu tolerantnosti korišćene su četiri morfološke osobine: sveža i suva masa korena i nadzemnog dela biljke. Analiza sveže i suve mase je pokazala da su sve četiri osobine omogućile razlikovanje tolerantnih od osetljivog genotipa. Osim upotrebom kvantitativnih osobina za detekciju tolerantnosti, razlika između tolerantnih i osetljivog genotipa je bila i vizuelna, jer je rast biljaka osetljivog genotipa bio zaustavljen 3 dana nakon postavljanja klijanaca na podlogu u kojoj je dodat herbicid, odnosno dok su biljke bile u fazi kotiledona. Kao i u našem radu, tretman tribenuron-metilom je zaustavio rast osetljivih populacija *P. rhoeas* L. u fazi kotiledona (Cirujeda i sar., 2001). Slično ponašanje biljaka osetljivog genotipa duvana je uočeno i upotrebom različitih AHAS inhibitora (Odell i sar., 1990; Kochevenko i Willmitzer, 2003).

Za testiranje tolerantnosti suncokreta u našem *in vitro* testu je korišćena čvrsta, sterilna MS podloga. Čvrste podloge omogućavaju da molekuli herbicida budu u određenoj meri zaštićeni od degradacije hidrolizom zbog želatinozne sposobnosti agara (Olofsson i sar., 1994). Osim toga, korišćenjem sterilisane MS podloge dolazi do sporije hidrolize molekula herbicida nego u nesterilnim uslovima usled odsustva mikroorganizama (Sarmah i sar., 1999). S obzirom na to da se na nižim pH (u opsegu pH: pH 4 - neutralne pH) tribenuron-metil razgrađuje brže u odnosu na sve do sada sintetisane sulfoniluree (Berger i sar., 2002), pH MS podloge je podešena na pH 7 i pH 8, što je viša vrednost u odnosu na pH koja se koristi za mikropropagaciju suncokreta (Vasić i sar., 2001a) i somatsku embriogenezu (Gurel i Kazan, 1998; Vasić i sar., 2001b), a koja iznosi pH 5,7.

Kod osetljivog genotipa, uočeno je značajno smanjenje mase nadzemnog dela biljke u svim tretmanima. Slične rezultate su dobili Vega i sar. (2009), koji su uočili da je došlo

do smanjenja mase nadzemnog dela biljaka osetljivog genotipa suncokreta tretiranog imazapirom. Nakon tretmana herbicidom, niži rast netolerantnih genotipova je posledica lošeg rasta korena što dovodi do smanjenja sposobnosti biljke da apsorbuje hranljive sastojake (Soltani i sar., 2008).

Vrednosti sveže mase su se pokazali korisni za razlikovanje homozigotno od heterozigotno tolerantnih genotipova suncokreta. Na pH 7, sveža masa nadzemnog dela je omogućila razlikovanje homozigotno tolerantnih genotipova od heterozigota upotrebom viših koncentracija herbicida - 3,5 μM i 4,0 μM . Na pH 8, je primećen isti efekat upotrebom još niže koncentracije herbicida (3,0 μM). To se može objasniti višim stepenom stabilnosti molekula herbicida na višim pH vrednostima (FAO, 2011). Castro i sar. (2004) su utvrdili da više pH vrednosti podloge ne utiču na biomasu suncokreta, što je bio slučaj sa biomasom homozigotno tolerantnih genotipova tokom *in vitro* testiranja suncokreta prema tribenuron-metilu. Stoga je svo smanjenje biomase na pH 8 bilo uzrokovano tretmanom herbicida. Na najvišoj testiranoj koncentraciji došlo je i do smanjenja sveže mase nadzemnog dela kod jednog homozigotno tolerantnog genotipa, HoT. Jače dejstvo sulfonilurea na višoj pH vrednosti je potvrđeno i kod prosa (Uludag i sar., 1997).

Generalno, herbicid je imao najjači uticaj na korenovog sistem tretiranih biljaka, jer je koren bio u direktnom kontaktu sa herbicidom. Tokom *in vitro* testiranja tolerantnosti suncokreta prema tribenuron-metilu, u većini slučajeva se morfologija korena razlikovala između homozigotno i heterozigotno tolerantnih genotipova, pri čemu je koren tretiranih biljaka homozigotnih genotipova bio dobro razvijen, dok je koren biljaka heterozigotnih genotipova imao dobro razvijen osnovni koren, a slabo razvijene bočne korenove. Sličan efekat AHAS inhibitora na razvoj korena suncokreta je primećen tokom tretmana imazapirom, gde je razvoj bočnih korena smanjen kod intermedijernog genotipa (*Imr₁Imr₁imr₂imr₂*) na višim koncentracijama herbicida (10 μM) (Vega i sar., 2009). Uopšte, sulfoniluree su se pokazale kao dobri inhibitori rasta korena jer dovode do zadebljanja ćelijskog zida i strukturnih promena u korenovoj kapi (Fayez i Kristen, 1996). Tokom *in vitro* testiranja, tretman tribenuron-metilom je uticao na razvoj korena, kako kod heterozigotno tolerantnih genotipova, tako i kod biljaka osetljivog genotipa. Kod biljaka osetljivog genotipa je na pH 8 uočena nekroza vrha korena, slično kao i kod osetljivih

genotipova suncokreta prema imazapiru (Breccia i sar., 2011). Najniža koncentracija herbicida koja je dovela do značajnog smanjenja sveže mase korena heterozigotno tolerantnih genotipova na pH 7 je 3,0 μM , a na pH 8 je 2,5 μM , dok je kod osetljivog genotipa to bio slučaj sa koncentracijom od 2,0 μM na obe pH. Takođe, na pH 8 upotrebom najviše testirane koncentracije herbicida je došlo do smanjenja mase jednog homozigotno tolerantnog genotipa, HoF. Stoga se kao najpovoljnija kombinacija za testiranje pokazala 3,0 μM herbicida na pH 7 jer je dovela do smanjenja mase svih heterozigotnih genotipova, dok nije imala uticaja na svežu masu korena homozigotno tolerantnih genotipova. Upotrebom 3,0 μM i viših koncentracija herbicida na pH 7 uočene su iste reakcije, ne samo homozigotnih, već i heterozigotnih genotipova na tretman herbicidom bez obzira na uticaj ostalih gena genoma suncokreta ("genetic background"). Kao i u našem radu, sveža masa korena je identifikovana kao dobara osobina za detekciju tolerantnih genotipova i od strane drugih autora, te je stoga korišćena u testovima tolerantnosti prema herbicidima (Yim i Bayer, 1996; Torres i sar., 2003).

Za razliku od sveže mase, na pH 7, suva masa se nije pokazala korisna za razlikovanje homozigotno od heterozigotno tolerantnih genotipova. Slično su uočili i Vega i sar. (2009), koji su utvrdili da suva masa korena može da omogući razlikovanje homozigotno tolerantnog od osetljivog genotipa suncokreta prema imazapiru, ali ne i razliku između intermedijernog (*Imr1Imr1imr2imr2*) i homozigotno tolerantnog genotipa. Nasuprot pH 7, povišenjem pH na pH 8 u *in vitro* testu tolerantnosti suncokreta prema tribenuron-metilu bilo je omogućeno razlikovanje homozigotno tolerantnih od heterozigotnih genotipova na osnovu vrednosti suve mase. Tako je razlikovanje omogućeno upotrebom 3,5 μM herbicida na osnovu analize suve mase korena, dok je za suhu masu nadzemnog dela to bio slučaj sa koncentracijom 4,0 μM . Na pH 8, herbicid je imao jači uticaj na rast korena u odnosu na rast nadzemnog dela na osnovu ne samo vrednosti sveže, već i suve mase što je u skladu sa rezultatima (Zhou i sar., 2009).

7.2. Upotreba SSR markera u marker asistiranoj selekciji

Od osam ispitivanih markera sa LG9 koji se nalaze u blizini gena *Ahas11-2*, sedam je bilo polimorfno, a jedan monomorfan. Od svih ispitivanih polimorfni markera, ORS 844 se pokazao kao najpovoljniji za detekciju tolerantnih genotipova prema tribenuron-metilu. Međutim, ovaj marker se pokazao kao dominantan. Na LG9, istoj poziciji kao i ORS 844, mapiran je i marker ORS 176 (Yu i sar., 2003; Tang i sar., 2003; Kolkman i sar., 2004), čijom je upotrebom zbog male razlike u dužini fragmenata između tolerantnog i osetljivog roditelja bilo otežano očitavanje tolerantnosti biljaka F₂ generacije. Prilikom ispitivanja ostalih polimorfni markera kod biljaka F₂ generacije uočeni su profili koji se nisu podudarali sa ocenom na polju. Shodno rezultatima, ispitivani SSR markeri u okolini gena *Ahas1-2* se nisu pokazali korisni za upotrebu u MAS.

7.3. Učestalost pojave nultih alela usled nehomologije sekvenci gajenog suncokreta i divljih srodnika suncokreta

Dva testirana SSR markera nisu umnožili fragment kod tolerantnog roditelja. To su markeri ORS 897 i ORS 1211. Marker ORS 1211 je lociran na dve LG: LG2 i LG9 (Tang i sar., 2003; Hu, 2006), tako da je očekivano da svaki profil sadrži dva umnožena fragmenta. Kod osetljivog roditelja i F₁ umnožena su dva fragmenta, međutim, profil tolerantnog roditelja je sadržao jedan fragment. Slično se pokazao i marker ORS 897 koji je umnožio fragment dužine 437 bp kod osetljivog roditelja i F₁, dok ovaj fragment nije bio umnožen kod tolerantnog roditelja. Pojava nultih alela se može javiti kao posledica unošenja gena *Ahas11-2* iz divljeg srodnika u gajeni suncokret (Miller i Al-Khatib, 2004). Tokom procesa povratnog ukrštanja se nije preneo samo gen *Ahas11-2* u genom gajenog suncokreta, već i dodatni delovi genoma donora gena tolerantnosti najverovatnije usled odsustva homologije između ove dve vrste (Wieckhorst i sar., 2010). Tako su Heesacker i sar. (2008) utvrdili da je učestalost pojave nultih alela i više od dva puta veća kod divljih srodnika suncokreta u odnosu na gajeni. Grandon i sar. (2012) su analizom inbred linija suncokreta uočili

prisustvo 7,5 % nultih alela. Slična pojava je uočena i tokom unošenja gena *Pl_{Arg}* iz divljeg *H. argophyllus* u genom gajeni suncokret (Imerovski, neobjavljeni rezultati).

7.3. CAPS markeri

Usled nemogućnosti korišćenja SSR markera u MAS za detekciju tolerantnosti prema tribenuron-metilu, razvijeni su specifičniji, CAPS markeri. Od deset razvijenih CAPS markera četiri markera su bila dominantna, a šest kodominantna. Dominantni markeri su se javili usled umnožavanja i dela sekvenci gena *ahas2* i/ili *ahas3* koji su homologni sa sekvencom gena *Ahas11-2*, dok su pajmeri korišćeni za razvoj kodominantnih markera omogućili izolaciju sekvence gena *Ahas11-2*. Prilikom umnožavanja različitim kombinacijama prajmera na nižim T_a se uočava prisustvo nespecifičnih fragmenata, dok se sa povećanjem T_a broj nespecifičnih fragmenata smanjuje, što je u skladu sa rezultatima (Sipos i sar., 2007). Sa povišenjem T_a količina produkta se nije menjala. Jedini izuzetak se desio pri upotrebi para prajmera For2-Rev3, gde je sa povišenjem T_a došlo do smanjivanja količine umnoženog produkta, što je u skladu sa rezultatima (Hecker i Roux, 1996).

Zbog dominantne prirode markera CAPS_{For4-Rev2} i CAPS_{For6-Rev5}, ove kombinacije su odbačene u daljem ispitivanju. Prilikom upotrebe CAPS_{For2-Rev1} i CAPS_{For2-Rev3} profili tolerantnog i osetljivog roditelja su se razlikovali, međutim profil heterozigota je oslikavao profil osetljivog roditelja. Ovakvi markeri su pogodni za upotrebu u MAS prilikom unošenja gena tolerantnosti u linije i hibride u procesu povratnog ukrštanja. Takođe bi potencijalno mogli da se koriste za detekciju tolerantnosti u grupnom uzorku u procesu proizvodnje hibrida u semenarstvu u cilju identifikacije kontaminacije, koja bi mogla da potiče od polena sa susednih polja suncokreta ili od samoniklog suncokreta (Miklić i sar., 2011).

Markeri CAPS_{ForBru-Rev4}, CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For3-Rev6}, CAPS_{For7-Rev7} i CAPS_{For8-Rev7} i CAPS_{For5-Rev4} su se pokazali kao kodominantni markeri za detekciju tolerantnosti suncokreta prema tribenuron-metilu. Ovi markeri imaju prednost nad dominantnim markerima, jer se njihovom upotrebom znatno skraćuje dug proces oplemenjivanja tokom konverzije linija i hibrida suncokreta u tolerantne forme u MAS-u. Par prajmera For3-Rev6

se pokazao kao povoljan za razvoj kodominantnog markera, ali isključivo u kombinaciji sa enzimom BcnI. Upotrebom enzima Kpn2I i BseDI razlika između dominantno tolerantnog genotipa i heterozigota se sastojala u različitoj količini umnoženih fragmenata. Iz navedenog razloga ovaj CAPS nije povoljan za upotrebu u MAS. Zbog jasnih profila koje su umnožili kao najbolji CAPS markeri su se pokazali CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For7-Rev7}, CAPS_{For8-Rev7} i CAPS_{For5-Rev4}. Ovi markeri su ujedno i najpogodniji za upotrebu u MAS.

Sva tri upotrebljena restrikciona enzima (Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaJI) i BcnI (NciI)) su se pokazala kao pogodna za detekciju SNP-a u kombinaciji sa bilo kojim od upotrebljenih kombinacija prajmera. Dok enzimi Kpn2I (BspEI) i BseDI (BsaJI) seku umnoženu sekvencu na mestu mutacije, odnosno mesto divljeg tipa, enzim BcnI (NciI) seče sekvencu na više mesta koji se međusobno razlikuju između homozigotno tolerantnog i osetljivog genotipa. Svi profili tolerantnih genotipova nakon digestije enzimom BcnI su sadržali fragment dužine 259 bp, dok su profili osetljivog genotipa sadržali fragment dužine 152 bp. Ovi fragmenti su univerzalno omogućili razlikovanje tolerantnog od osetljivog genotipa kod razvijenih markera.

Različiti restrikcioni enzimi su do sada korišćeni za detekciju C-T mutacije koja je nosilac tolerantnosti prema sulfonilureama (Guttieri i sar., 1992; Tan i Medd, 2002; Delye i Boucansaud, 2008; Delye i sar., 2009). Prema našim saznanjima, enzimi koji su korišćeni sa detekciju SNP-a u ovom radu do sada nisu korišćeni za razvijanje CAPS markera za detekciju gena tolerantnosti prema sulfonilureama.

Prednost upotrebe dizajniranih CAPS markera je što, većinom, spadaju u grupu funkcionalnih markera, pa ne postoji fizička udaljenost između gena i markera čime se rešava problem koji može da nastane rekombinacijom (Andersen i Lubberstedt, 2003). Iz svih navedenih razloga funkcionalni markeri su našli široku primenu u MAS kod svih biljnih vrsta i to ne samo za detekciju gena tolerantnosti prema herbicidima, već i za gene nosioce tolerantnosti prema patogenima (Perumalsamy i sar., 2010; Wang i sar., 2011; Pavan i sar., 2013). Kod suncokreta je razvoj funkcionalnih markera tek u povoju te je do sad kreiran marker za kvalitet ulja (Tang i sar., 2006) i tolerantnost prema imidazolinonima (Kolkman i sar., 2004). Jedan od razloga malog broja razvijenih funkcionalnih markera kod suncokreta je do sada još neobjavljena mapa genoma. Sa razvojem novih metoda

sekvenciranja (Next Generation Sequencing) i otkrivanjem velikog broja SNP-ova u genomu suncokreta u budućnosti će biti omogućeno razvijanje većeg broja funkcionalnih markera, pogotovo zato što je frekvencija SNP-a kod suncokreta 1SNP/38.8bp (Liu i Burke, 2006). Ovakve metode će značajno skratiti vreme povratnih ukrštanja prilikom unošenja poželjnih gena u linije suncokreta, kao i praćenje stepena čistoće potomstva prilikom povratnih ukrštanja, koje je do sada rađeno SSR markerima (Dimitrijević i sar., 2010b).

Generalno, prednosti upotrebe CAPS markera su jednostavni protokoli i jeftina laboratorijska oprema, dok je mana upotrebe ovih markera upravo duže vreme za dobijanje rezultata, jer CAPS markeri podrazumevaju prvo umnožavanje DNK sekvence u PCR aparatu, zatim digestiju enzimima i razdvajanje produkata elektroforezom. Nasuprot ovakvim markerima, detekcija SNP-a upotrebom RT-PCR ili markera HRM (High Resolution Melting) skraćuje vreme za dobijanje rezultata, međutim zahteva upotrebu skupe laboratorijske opreme i obeleženih proba. Tako npr. HRM markeri omogućavaju očitavanje rezultata za manje od 90 min (Pavan i sar., 2013). Upravo opremljenost laboratorije diktira odabir vrste markera koji će se kreirati i, potom, koristiti u MAS.

8. ZAKLJUČAK

In vitro test je omogućio razlikovanje ne samo tolerantnih od osetljivog (Os) genotipa suncokreta, već i homozigotno tolerantnih (HoF, HoT, HoP, HoM) od heterozigotno tolerantnih genotipova (HtF, HtT, HtP, HtM) na tribenuron-metil.

Razvoj biljaka osetljivog genotipa suncokreta (Os) je zaustavljen u svim tretmanima tribenuron-metilom tri dana nakon postavljanja klijanaca suncokreta na MS podlogu.

Sveža masa (g) se pokazala korisna za razlikovanje homozigotno od heterozigotno tolerantnih genotipova, za razliku od suve mase (g).

Tribenuron-metil je imao najjači uticaj na korenov sistem tretiranih biljaka suncokreta, jer je koren bio u direktnom kontaktu sa herbicidom.

Uzimajući u obzir osobinu sveže mase korena, optimalna kombinacija koncentracije herbicida i pH je 3,0 μ M na pH 7, jer je na ovom tretmanu omogućeno razlikovanje homozigotno tolerantnih od heterozigotnih genotipova suncokreta (kontrola: HoF - 1,1 g; HoT - 1,1 g; HoP - 0,9 g; HoM - 0,9 g; 3,0 μ M : HoF - 1,0 g; HoT - 1,1 g; HoP - 1,1 g; HoM - 0,8 g; kontrola: HtF - 0,8 g; HtT - 2,0 g; HtP - 1,3 g; HtM - 0,8 g; 3,0 μ M : HtF - 0,4 g; HtT - 0,6 g; HtP - 1,1 g; HtM - 0,6 g).

Međutim, ukoliko se posmatra i osobina sveže mase nadzemnog dela onda se kao najbolji tretman pokazao 3,5 μ M herbicida na pH 7 (kontrola: HoF - 1,2 g; HoT - 1,5 g; HoP - 1,3 g; HoM - 1,4 g; 3,5 μ M : HoF - 1,3 g; HoT - 1,7 g; HoP - 1,2 g; HoM - 0,5 g; kontrola: HtF - 1,6 g; HtT - 1,9 g; HtP - 1,3 g; HtM - 1,9 g; 3,5 μ M : HtF - 0,7 g; HtT - 1,6 g; HtP - 0,9 g; HtM - 1,5 g).

Upotrebom viših koncentracija herbicida na pH 7 uočen je dobar razvoj biljaka homozigotno tolerantnih genotipova, dok su biljke heterozigotnih genotipova bile slabije razvijene bez obzira na uticaj ostalih gena genoma suncokreta („genetic background“).

Na pH 8 došlo je do smanjenja vrednosti sveže mase pojedinih genotipova pri upotrebi koncentracije herbicida od 4,0 μ M, što ukazuje na jače dejstvo herbicida u uslovima više pH vrednosti (masa korena genotipa HoF - kontrola - 1,2 g; 4,0 μ M - 0,7 g; masa nadzemnog dela genotipa HoT - kontrola - 1,5 g; 4,0 μ M - 1,2 g).

Razlikovanje osetljivog genotipa suncokreta od tolerantnih je omogućeno petog dana tretmana, dok je razlikovanje homozigotno tolerantnih genotipova od heterozigotnih omogućeno dvanaestog dana tretmana tribenuron-metilom.

SSR markeri se nisu pokazali kao povoljni za detekciju tolerantnosti suncokreta prema tribenuron-metilu zbog njihove udaljenosti od gena *Ahas11-2* i male razlike u dužini umnoženih fragmenata između tolerantne i osetljive roditeljske linije suncokreta.

U zavisnosti od mesta vezivanja dizajniranih DNK-specifičnih prajmera (For1-For8, ForBru, Rev1-Rev8, RevBru) omogućen je razvoj dominantnih ili kodominantnih markera.

Sva tri restikciona enzima (Kpn2I (BspEI), BseDI (BsaJI) i BcnI (NciI)) su omogućila razvoj kodominantnih markera zbog razlike u poziciji restikcionih mesta između gena *Ahas11-2* i *ahas11*.

Kao najpovoljniji markeri za upotrebu u marker asistiranoj selekciji su se pokazali kodominantni markeri: CAPS_{ForBru-Rev4}, CAPS_{ForBru-Rev3}, CAPS_{For3-Rev6}, CAPS_{For7-Rev7}, CAPS_{For8-Rev7} i CAPS_{For5-Rev4}. Većina dizajniranih CAPS markera pripada grupi funkcionalnih markera koji rešavaju problem u slučaju pojave rekombinacije, jer ne postoji fizička udaljenost između gena i markera.

Pretpostavke o načinu nasleđivanja tolerantnosti suncokreta prema tribenuron-metilu su postavljene na osnovu uporedne analize tolerantnosti biljaka suncokreta F₂ generacije u polju i analizom genotipa markerom CAPS_{For5-Rev4}. Hipoteze zasnovane na eksperimentalnim rezultatima su potvrđene pomoću χ^2 testa. Prema ovim rezultatima, tolerantnost suncokreta prema tribenuron-metilu je kontrolisana monogeno, odnosno jednim major genom, koji ima dominantan i recesivan alel. Ovim su zaključci o načinu nasleđivanja ove osobine koji su dobijeni fenotipskom analizom rezultata u polju, potvrđeni analizom molekularnim markerima direktno na nivou genetičke konstitucije, odnosno genotipa.

Svi razvijeni kodominantni markeri će se koristiti u marker asistiranoj selekciji u cilju skraćivanja dugog procesa povratnih ukrštanja tokom konverzije različitih linija i hibrida suncokreta u tolerantnu formu.

9. LITERATURA

- Aksyonov, I. 2007. Effect of cultivation measures on index of photosynthesis and yield of sunflower. *Helia* 47: 79-86.
- Al-Allaf, S., Godward, M.B.E. 1977. Karyotype analysis of four varieties of *Helianthus annuus* L. *Cytologia* 44: 319-323.
- Al-Khatib, K., Baumgartner, J.R., Peterson, D.E., Currie, R.S. 1998. Imazethapyr resistance in common sunflower - *Helianthus annuus* L. *Weed Science* 46: 403-407.
- Al-Khatib, K., Baumgartner, J.R., Currie, R.S. 1999. Survey of common sunflower (*Helianthus annuus*) resistance to ALS inhibiting herbicides in northeast Kansas. *Proceedings of 21th Sunflower Research Workshop*. National Sunflower Association. Bismark, North Dakota, USA: 210-215.
- Andersen, J.R., Lubberstedt, T. 2003. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8: 554-560.
- Ashigh, J., Corbett, C.A.L., Smith, P.J., Laplante, J., Tardif, F.J. 2009. Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp376Glu substitution in *Amaranthus powellii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 38-46.
- Baumgartner, J.R., Al-Khatib, K., Currie, R.S. 1999. Cross-Resistance of Imazethapyr-Resistant Common Sunflower (*Helianthus annuus*) to Selected Imidazolinone, Sulfonylurea, and Triazolopyrimidine Herbicide. *Weed Technology* 13: 489-493.
- Beckie, H.J., Heap, I.M., Smeda, R.J., Hall, L.M. 2000. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology* 14: 428-445.
- Beres, I., Szente, D., Gyenes, V., Somlyay, I. 2005. Weed control in sunflower (*Helianthus annuus* L.) with post-emergent herbicides. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 70: 475-479.
- Berger, B.M., Muller, M., Eing, A. 2002. Quantitative structure–transformation relationships of sulfonylurea herbicides. *Pest Management Science* 58: 724-735.

- Berry, S.T., Leon, A.J., Hanfrey, C.C., Challis, P., Burkholz, A., Barnes, S.R., Rufener, G.K., Lee, M., Caligari, P.D.S. 1995. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 195-199.
- Berry, S.T., Leon, A.J., Challis, P., Livini, C., Jones, R., Hanfrey, C.C., Griffiths, S., Roberts, A. 1996. Construction of a high density, composite RFLP linkage map for cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proceedings of 14th International Sunflower Conference*. Toulouse, France Vol. 2: 1155-1160.
- Berry, S.T., Leon, A.J., Peerbolte, R., Challis, C., Livini, C., Jones, R., and Feingold, S. 1997. Presentation of the Advanta sunflower RFLP linkage map for public research. *Proceedings of 19th Sunflower Research Workshop*. Fargo, North Dakota: 113-118.
- Beyer, E.M., Brown, H.M., Duffy, K.J. 1987. Sulfonylurea herbicide soil relations. *Proceedings of British Crop Protection Conference - Weeds*. Brighton, United Kingdom: 531-540.
- Blackman, B.K., Scascitelli, M., Kane, N.C., Luton, H.H., Rasmussen, D.A., Bye, R.A., Lentz, D.L., Rieseberg, L.H. 2011. Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 14360-14365.
- Blamey, F.P., Zollinger, R.K. 1997. Sunflower production and culture. In: *Sunflower Technology and Production*, (ed. Schneiter, A.A.), American Society of Agronomy Inc., Crop Science Society of America Inc., Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, USA: 596-670.
- Bloch, K.D., Grossmann, B. 1995. Restriction endonucleases: digestion of DNA with restriction endonucleases. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, (eds. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A.), Wiley, Chichester: 3.1.1–3.1.21.
- Boutsalis, P., Karotam, J., Powles, S.B. 1999. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pesticide Science* 55: 507-516.

- Božić, D., Sarić, M., Malidža, G., Ritz, C., Vrbničanin, S. 2012. Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. *Crop Protection* 39: 1-10.
- Breccia, G., Vega, T., Nestares, G., Mayor, M.L., Zorzoli, R., Picardi, L. 2011. Rapid test for detection of imidazolinone resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* 130: 109-113.
- Brunel, D. 1994. A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology* 24: 397-400.
- Bruniard, J.M., Miller, J.F. 2001. Inheritance of imidazolinone herbicide resistance in sunflower. *Helia* 24: 11-16.
- Burke, J.M., Mandel, J.R., Bowers, J.E., Bachlava, E., Marek, L., Nambeesan, S., Taylor, C.A., Tang, S., Rieseberg, L.H., Knapp, S.J. 2012. SNP Diversity, Genome Mapping, and Association Genetics in Sunflower. Program and Abstracts of 18th International Sunflower Conference. Mar del Plata and Balcarce, Argentina: 21.
- Burnet, M.W.M., Christopher, J.T., Holtum, J.A.M., Powles, S.B. 1994. Identification of two mechanisms of sulfonylurea resistance within one population of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) using a selective germination medium. *Weed Science* 42: 468-473.
- Castro, S., Davis, L.C., Erickson, L.E. 2004. Temperature and pH effects on plant uptake of benzotriazoles by sunflowers in hydroponic culture. *International Journal of Phytoremediation* 6: 209-225.
- Cavallini, A., Natali, L., Zuccolo, A., Giordani, T., Jurman, I., Ferrillo, V., Vitacolonna, N., Sarri, V., Cattonaro, F., Ceccarelli, M., Cionini, P.G., Morgante, M. 2009. Analysis of transposons and repeat composition of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 120: 491-508.
- Chipman, D., Barak, Z., Schloss, J.V. 1998. Biosynthesis of 2-aceto-2 hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1385: 401-419.
- Cirujeda, A., Recasens, J., Taberner, A. 2001. A qualitative quick-test for detection of herbicide resistance to tribenuron-methyl in *Papaver rhoeas*. *Weed Research* 41: 523-534.

- Corbett, C.A.L., Tardif, F.J. 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. *Pest Management Science* 62: 584-597.
- Corbett, C.A., Tardif, F.J. 2008. Detection of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors in *Amaranthus* sp. using DNA polymorphisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 92: 48-55.
- Delye, C., Boucansaud, K. 2008. A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Research* 48: 97-101.
- Delye, C., Boucansaud, K., Pernin, F., Le Corre, V. 2009. Variation in the gene encoding acetolactate-synthase in *Lolium* species and proactive detection of mutant, herbicide-resistant alleles. *Weed Research* 49: 326-336.
- Dicu, G., Dumitrescu, N., Radu, M., State, D., Fuia, S., Diaconescu, O. 2009. Improving sunflower for resistance to *Orobanche* and tribenuron methyl herbicides - sunflower hybrid pf100. *Helia* 51: 119-126.
- Dimitrijević, A., Imerovski, I., Miladinović, D., Marjanović-Jeromela, A., Jocić, S., Miklič, V. 2010a. Tolerantnost suncokreta prema tribenuron-metilu. *Zbornik radova 51. Savetovanja industrije ulja. Herceg Novi*: 61-67.
- Dimitrijević, A., Imerovski, I., Miladinović, D., Tančić, S., Dušanić, N., Jocić, S., Miklič, V., 2010b. Use of SSR markers in identification of sunflower isogenic lines in late generations of backcrossing. *Helia* 53: 191-198.
- Dimitrijević, A., Imerovski, I., Miladinović, D., Jocić, S., Malidža, G., Šurlan-Momirović, G., Miklič, V. 2012. Laboratory method for detection of tribenuron-methyl resistant sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proceedings of 18th International Sunflower Conference. Mar del Plata and Balcarce, Argentina*: 519-523.
- Edwards, M.C., Gibbs, R.A. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research* 3: S65-S75.
- Fayez, K.A., Kristen, U. 1996. The influence of herbicides on the growth and proline content of primary roots and on the ultrastructure of root caps. *Environmental and Experimental Botany* 36: 71-81.

- Ferguson, D.T., Schehl, S.E., Hageman, L.H., Lepone, G.E., Carraro, G.A. 1985. DPX-L5300: A new cereal herbicide. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference - Weeds 1: 43-48.
- Foes, M.J., Liu, L., Vigue, G., Stoller, E.W., Wax, L.M., Tranel, P.J. 1999. A kochia (*Kochia scoparia*) biotype resistant to triazine and ALS-inhibiting herbicides. Weed Science 47: 20-27.
- Funk, V.A., Bayer, R.J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., Garcia-Jagas, N., Susanna, A., Jansen, R.K. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the *Compositae*. Biologiske Skrifter 55: 343-374.
- Gentzbittel, L., Vear, F., Zhang, Y.X., Berville, A., Nicolas, P. 1995. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics 90: 1079-1086.
- Gentzbittel, L., Mestries, E., Mouzeyar, S., Mazeyrat, F., Badaoul, S., Vear, F., Tourvieille de Labrouhe, D., and Nicolas, P. 1999. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. Theoretical and Applied Genetics 99: 218-234.
- Gibson, G., Muse, S. 2002. A Primer of Genome Science, 1st edition. Sunderland Associated, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Grandon, N.G., Moreno, V., Scorcione, C., Gioco, J.O., Alvarez, D., Paniego, N., Heinz, R. 2012. Characterization of sunflower inbred lines (*Helianthus annuus* L.) for high oleic acid content using SSR markers. Program and Abstracts of 18th International Sunflower Conference. Mar del Plata and Balcarce, Argentina: 217.
- Gurel, E., Kazan, K. 1998. Development of an efficient plant regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Turkish Journal of Botany 22: 381-387.
- Guttieri, M.J., Eberlein, C.V., Mallory-Smith, C.A., Thill, D.C., Hoffman, D.L. 1992. DNA Sequence variation in domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide resistant and -susceptible weed biotypes. Weed Science 40: 670-677.
- Hadživuković, S. 1973. Statistički metodi s primenom u poljoprivredi i biološkim istraživanjima. Radnički univerzitet „Radivoj Ćirpanov”. Novi Sad.

- Hall, L.M., Stromme, K.M., Horsman, G.P., Devine, M.D. 1998. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false cleavers (*Galium spurium*). *Weed Science* 46: 390-396.
- Hecker, K.H., Roux, K.H. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques* 20: 478-485.
- Heesacker, A., Kishore, V.K., Gao, W., Tang, S., Kolkman, J.M., Gingle, A., Matvienko, M., Kozik, A., Michelmore, R.M., Lai, Z., Rieseberg, L.H., Knapp, S.J. 2008. SSRs and INDELs mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 1021-1029.
- Heiser, C.B. 1978. Taxonomy of *Helianthus* and origin of domesticated sunflower. In: *Sunflower Science and Technology*, (ed. Carter JF), Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America: 31-53.
- Hinz, J.R.R., Owen, M.D.K. 1997. Acetolactate synthase resistance in a common waterhemp (*Amaranthus rudis*) population. *Weed Technology* 11: 13-18.
- Hu, J. 2006. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the *Arabidopsis*-type telomere sequence repeat-derived markers. *Chromosome Research* 14: 535-548.
- Hu, J. 2010. Genetic linkage maps: strategies, resources and achievements. In: *Genetics, genomics and breeding of sunflower*, (eds. Hu, J., Seiler, G., Kole, C.), Science Publishers. Enfield, New Hampshire: 79-109.
- Jan, C.C., Vick, B.A., Miller, J.F., Kahler, A.L., Butler, E.T. 1998. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 15-22.
- Jan, C.C., Seiler, G.J. 2006. Sunflower. In: *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Oilseed crops. Vol. 4*, (ed. Singh, R.J.), CRC Press. Boca Raton, Florida, USA: 104-165.
- Janjić, V. 2002. Sulfoniluree. Monografija. Grafika Jureš. Čačak.
- Janjić, V. 2009. Mehanizam delovanja pesticida. Monografija. Vizartis. Beograd.

- Jocić, S., Škorić, D., Malidža, G. 2001. Oplemenjivanje suncokreta na tolerantnost prema herbicidima. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo 35: 223-233.
- Jocić, S., Malidža, G., Škorić, D. 2004. Suncokret tolerantan na herbicide iz grupe imidazolinona. Journal of Scientific Agricultural Research 229: 81-89.
- Jocić, S., Miklič, V., Malidža, G., Hladni, N., Gvozdenović, S. 2008. New sunflower hybrids tolerant of tribenuron-methyl. Proceedings of 17th International Sunflower Conference. Cordoba, Spain Vol 2: 505-508.
- Jocić, S., Malidža, G., Cvejić, S., Hladni, N., Miklič, V., Škorić, D. 2011. Development of sunflower hybrids tolerant to tribenuron-methyl. Genetika 43: 175-182.
- Kane, N.C., Gill, N., King, M.G., Bowers, J.E., Berges, H., Gouzy, J., Bachlava, E., Langlade, N.B., Lai, Z., Stewart, M., Burke, J.M., Vincourt, P., Knapp, S.J., Rieseberg L.H. 2011. Progress towards a reference genome for sunflower. Botany 89: 429-437.
- Kinman, M.L. 1970. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. Proceedings of 4th International Sunflower Conference. Memphis, Tennessee, USA: 181-183.
- Kochevenko A., Willmitzer, L. 2003. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. Plant Physiology 132: 174-184.
- Kolkman, J.M., Slabaugh, M.B., Bruniard, J.M., Berry, S., Bushman, B.S., Olungu, C., Maes, N., Abratti, G., Zambelli, A., Miller, J.F., Leon, A., Knapp, S.J. 2004. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. Theoretical and Applied Genetics 109: 1147-1159.
- Kolkman, J.M., Berry, S.T., Leon, A.J., Slabaugh, M.B., Tang, S., Gao, W., Shintani, D.K., Burke, J.M., Knapp, S.J. 2007. Single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium in sunflower. Genetics 177: 457-468.

- Kondić-Špika, A., Jevtić, R. 2002. Tolerantnost jarih i ozimih sorti pšenice prema herbicidima u kulturi *in vitro*. Pesticidi 17: 125-129.
- Kondić-Špika, A., Petrović, K., Jevtić, R., Kobiljski, B., Pucarević, M. 2009. Sulfonylurea tolerance of wheat genotypes in zygotic embryo culture. Archives of Biological Science Belgrade 61: 453-458.
- Koog, H.J. 1966. Deutsche gold and silver-scheidean-stalt vormals. Netherlands Patent 121788.
- Kuk, Y.I., Jung, H.I., Kwon, O.D., Lee, D.J., Burgos, N.R., Guh, J.O. 2003. Sulfonylurea herbicide-resistant *Monochoria vaginalis* in Korean rice culture. Pest Management Science 59: 949-961.
- Kulshreshtha, V.B., Gupta, P.K. 1981. Cytogenetic studies in the genus *Helianthus* L. II. Karyological studies in twelve species. Cytologia 46: 279-289.
- Kwon, C.S., Penner, D. 1995. Response of a chlorsulfuron-resistant biotype of *Kochia scoparia* to ALS inhibiting herbicides and piperonyl butoxide. Weed Science 43: 561-565.
- Langar, K., Lorieux, M., Desmarais, E., Griveau, Y., Gentzbittel, L., Berville, A. 2003. Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines. Theoretical and Applied Genetics 106: 1068-74.
- LaRossa, R.A., Schloss, J.V. 1984. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. The Journal of Biological Chemistry 259: 8753-8757.
- Leclercq, P. 1969. Une sterilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. Ann Ame. Plantes 19: 99-106.
- Legere, A. 2005. Risks and consequences of gene flow from herbicide resistant crops: canola (*Brassica napus* L.) as a case study. Pest Management Science 61: 292-300.
- Lentz, D.L., Pohl, M.E.D., Pope, K.O. 2001. Prehistoric sunflower (*Helianthus annuus* L.) domestication in Mexico. Economic Botany 55: 370-376.
- Levan, A., Fregda, K., Sandberg, L. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
- Levitt, G. 1977. Belgian Patent 853.374.

- Liu, A., Burke, J.M. 2006. Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. *Genetics* 173: 321-330.
- Malidža, G., Ivanović, D., Bekavac, G., Jasnić, S. 1999. Značaj genetički modifikovanih biljaka u suzbijanju štetnih organizama. *Pesticidi* 14: 125-152.
- Malidža, G., Jocić, S., Škorić, D., Orbović, B. 2004. Clearfield sistem proizvodnje suncokreta. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 40: 279-290.
- Malidža, G., Jocić, S., Škorić, D., Orbović, B. 2006. Suzbijanje korova u suncokretu tolerantnom prema tribenuron-metilu. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 42: 323-332.
- Marinković, R., Dozet, B., Vasić, D. 2003. Oplemenjivanje suncokreta. Školska knjiga, Novi Sad.
- Menne, H., Kocher, H. 2007. HRAC classification of herbicides and resistance development. In: *Modern crops protection compounds*. Vol. 3, (eds. Kramer, W., Schirmer, U.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 5-26.
- Miklić, V., Dušanić, N., Jocić, S. 2011. Sunflower seed production. In: *Seed production*, (eds. Milošević, M., Kobiljski, B.), Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad Vol 2.: 196-264.
- Miller, F.J., Al-Khatib, K. 2000. Development of herbicide resistant germplasm in sunflower. *Proceedings of 15th International Sunflower Conference*. Toulouse, France Vol 2.: 12-15.
- Miller, J.F., Al-Khatib, K. 2004. Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2, resistant to tribenuron herbicide. *Crop Science* 44: 1037-1038.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Odell, J.T., Caimi, P.G., Yadav, N.S., Mauvais, C.J. 1990. Comparison of increased expression of wild-type and herbicide-resistant acetolactate synthase genes in transgenic plants, and indication of posttranscriptional limitation on enzyme activity. *Plant Physiology* 94: 1647-1654.

- Olofsdotter, M., Olesen, A., Andersen, S.B., Streibig, J.C. 1994. A comparison of herbicide bioassays in cell cultures and whole plants. *Weed Research* 34: 387-394.
- Paniego, N., Echaide, M., Munoz, M., Fernandez, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Carrera, M., Zandomeni, R., Suarez, E.Y., Hopp, H.E. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34-43.
- Patzoldt, W.L., Tranel, P.J. 2002. Molecular analysis of cloransulam resistance in a population of giant ragweed. *Weed Science* 50: 299-305.
- Patzoldt, W.L., Tranel, P.J. 2007. Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Science* 55: 421-428.
- Pavan, S., Schiavulli, A., Appiano, M., Miacola, C., Visser, R.G.F., Bai, Y., Lotti, C., Ricciardi, L. 2013. Identification of a complete set of functional markers for the selection of *erl* powdery mildew resistance in *Pisum sativum* L. *Molecular Breeding* 31: 247-253.
- Peerbolte, R.P., Peleman, J. 1996. The CARTISOL sunflower RFLP map (146 loci) extended with 291 AFLP markers. *Proceedings of 18th Sunflower Research Forum*. Fargo, North Dakota, USA: 11-12.
- Permingeat, H.R., Romagnoli, M.V., Vallejos, R.H. 1998. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 1-6.
- Perumalsamy, S., Bharani, M., Sudha, M., Nagarajan, P., Arul, L., Saraswathi, R., Balasubramanian, P., Ramalingam, J. 2010. Functional marker-assisted selection for bacterial leaf blight resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding* 129: 400-406.
- Preston, C., Mallory-Smith, C.A. 2001. Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. In: *Herbicide resistance and world grains*, (ed. Powles, S.B., Shaner, D.L.), CRC Press. Boca Raton, Florida, USA: 23-60.
- Putnam, D.H., Oplinger, E.S., Hicks, D.R., Durgan, B.R., Noetzel, D.M., Meronuck, R.A., Doll, J.D., Schulte, E.E. 1990. Sunflower. *Alternative Field Crops Manual*, <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/sunflower.html>

- Putt, E.D. 1997. Early history of sunflower. In: Sunflower technology and production, (ed. Schneiter, A.), ASA, CSSA, and SSSA, Madison, Wisconsin, USA: 1-20.
- Raicu, P., Vranceanu, V., Mihailescu, A., Popescu, C., Kirillova, M. 1976. Research of the chromosome complement in *Helianthus* L. genus. *Caryologia* 29: 307-316.
- Richter, J., Powles, S.B. 1993. Pollen expression of herbicide target resistance genes in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Plant Physiology* 102: 1037-1041.
- Rieseberg, L.H., Choi, H.C., Chan, R. 1993. Genomic map of a diploid hybrid species. *Heredity* 70: 285-293.
- Rieseberg, L.H. 1998. Genetic mapping as a tool for studying speciation. In: Molecular systematics of plants, (eds. Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J.), New York: Chapman and Hall: 459-487.
- Sala, C.A., Bulos, M., Echarte, A.M. 2008a. Genetic analysis of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Crop Science* 48: 1817-1822.
- Sala, C.A., Bulos, M., Echarte, A.M., Whitt, S.R., Ascenzi, R. 2008b. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 105-112.
- Sala, C.A., Bulos, M. 2011. Inheritance and molecular characterization of broad range tolerance to herbicides targeting acetohydroxyacid synthase in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 355-364.
- Sarmah, A.K., Kookana, R.S., Alston, A.M. 1999. Degradation of chlorsulfuron and triasulfuron in alkaline soils under laboratory conditions. *Weed Research* 39: 83-94.
- Sarmah, A.K., Kookana, R.S., Duffy, M.J., Alston, A.M., Harch, B.D. 2000. Hydrolysis of triasulfuron, metsulfuron-methyl and chlorsulfuron in alkaline soil and aqueous solutions. *Pest Management Science* 56: 463-471.
- Sarmah, A.K., Sabadie, J. 2002. Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6253-6265.
- Sarpe, N., Poienaru, S., Maschio, M. 2007. No-tillage system applied to the sunflower (hybrid pioneer PR64E83) resistant to the tribenuron-methyl in the conditions from Romania. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 72: 271-277.

- Saunders, J.W., Acquaah, G., Renner, K.A., Doley, W.P. 1992. Monogenic dominant sulfonylurea resistance in sugarbeet from somatic cell selection. *Crop Science* 32: 1357-1360.
- Siminszky, B., Coleman, N.P., Naveed, M. 2005. Denaturing high performance liquid chromatography efficiently detects mutations of the acetolactate synthase gene. *Weed Science* 53: 146-152.
- Sipos, R., Szekely, A.J., Palatinszky, M., Revesz, S., Marialigeti, K., Nikolausz, M. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 341-350.
- Škorić, D., Jocić, S., Hladni, N., Vannozzi, G.P. 2007. An analysis of heterotic potential for agronomically important traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 46: 55-74.
- Soltani, N., Gillard, C.L., Swanton, C.J., Shropshire, C., Sikkema, P.H. 2008. Response of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to imazethapyr. *Crop Protection* 27: 672-677.
- Stanković, J., Ralević, N., Ljubanović-Ralević, I. 2002. Statistika sa primenom u poljoprivredi. Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje. Mladost biro. Beograd.
- Tan, M.K., Medd, R.W. 2002. Characterisation of the acetolactate synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance. *Plant Science* 163:195-205.
- Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M.B., Shintani, D.K., Knapp, S.J. 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1124-1136.
- Tang, S., Kishore, V.K., Knapp, S.J., 2003. PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 6-19.
- Tang, S., Hass, C.G., Knapp, S.J. 2006. *Ty3/gypsy*-like retrotransposon knockout of a 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase is non-lethal, uncovers a cryptic paralogous mutation, and produces novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 783-799.

- Taški-Ajduković, K.J., Vasić, D.M. 2005. Different sterilization methods for overcoming internal bacterial infection in sunflower seeds. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 109: 59-64.
- Thompson, M.E. 2007. Acetohydroxyacid Synthase Inhibitors (AHAS/ALS). In: *Modern Crop Protection Compounds*. (eds. Kramer, W., Schirmer, U.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 27-45.
- Torres, A.C., Nascimento, W.M., Paiva, S.A.V., de Aragao, F.A.S. 2003. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38: 1053-1057.
- Tranel, P.J., Wright, T.R. 2002. Resistance of weeds to AHAS inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50: 700-712.
- Uludag, A., Lyon, D.J., Nissen, S.J., Kachman, S.D. 1997. Proso millet (*Panicum miliaceum*) response to CGA-152005, metasulfuron, and triasulfuron. *Weed Technology* 11: 138-143.
- Umbarger, H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry* 47: 533-606.
- Vasić, D., Škorić, D., Alibert, G., Miklič, V. 2001a. Micropropagation of *Helianthus maximiliani* (Schrader) by shoot apex culture. *Helia* 34: 63-68.
- Vasić, D., Alibert G., Škorić, D. 2001b. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). *Plant Cell Reports* 20: 121-125.
- Vega, T., Breccia, G., Nestares, G., Mayor, M.L., Zorzolia, R., Picardia, L. 2009. Soil-less bioassays for early screening for resistance to imazapyr in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pest Management Science* 65: 991-995.
- Venkatramana, P., Hulke, B., Qi, L., Schultz, Q. 2012. SNP Assisted Breeding for Sunflower Improvement. Program and Abstracts of 18th International Sunflower Conference. Mar del Plata and Balcarce, Argentina: 237.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J., 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31: 3688-3691.

- Vrbničanin, S., Božić, D., Malidža, G., Dušanić, N., Pavlović, D., Barac, M. 2008. Tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to imazethapyr. *Helia* 48: 85-94.
- Wagner, J., Haas, H.U., Hurle, K. 2002. Identification of ALS inhibitor-resistant *Amaranthus* biotypes using polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Weed Research* 42: 280-286.
- Wang, C., Chen, S., Yu, S. 2011. Functional markers developed from multiple loci in *GS3* for fine marker-assisted selection of grain length in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 905-913.
- Whaley, C.M., Wilson, H.P., Westwood, J.H. 2007. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science* 55: 83-90.
- White, A.D., Owen, M.D., Hartzler, R.G., Cardina, J. 2002. Common sunflower resistance to acetolactate-inhibiting herbicides. *Weed Science* 50: 432-437.
- White, A.D., Graham, M.A., Owen, M.D.K. 2003. Isolation of acetolactate synthase homologs in common sunflower. *Weed Science* 51: 845-853.
- Wieckhorst, S., Bachlava, E., Dušle, C.M., Tang, S., Gao, W., Sasaki, C., Knapp, S.J., Schon, C.C., Hahn, V., Bauer, E. 2010. Fine mapping of the sunflower resistance locus *Pl_{ARG}* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus*. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 1633-1644.
- Yim, K., Bayer, D.E. 1996. Root growth inhibition of rice by bensulfuron. *Weed Research* 35: 49-54.
- Yu, J.K., Tang, S., Slabaugh, M.B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W.C., Webb, D.M., Thompson, L., Edwards, K.J., Berry, S., Leon, A.J., Grondona, M., Olongu, C., Maes, N., Knapp, S.J. 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Science* 43: 367-387.
- Yu, Q., Han, H., Powles, S.B. 2008. Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. *Pest Management Science* 64: 1229-1236.
- Zelaya, I.A., Owen, M.D.K. 2004. Evolved Resistance to Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicides in Common Sunflower (*Helianthus annuus*), Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*), and Shattercane (*Sorghum bicolor*) in Iowa. *Weed Science* 52: 538-548.

Zhou, Q., Xu, C., Zhang, Y., Liu, W. 2009. Enantioselectivity in the phytotoxicity of herbicide imazethapyr. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1624-1631.

PRILOG 1 – Sastav MS* podloge

MS podloga - II

- Makroelementi[#] (x10) - 100 ml
- Mikroelementi[#] (x1000) - 1 ml
- Vitamini (x 500)[#] - 2 ml
- Fe helat (x100)[#] - 10 ml
- Šećer 2% - 20 g
- Agar - 7 g

Doda se dH₂O do litre podloge

pH podloge se podešava sa NaOH i H₂SO₄ na pH 7 i 8

*Murashige i Skoog (1962)

[#] sastav rastvora koji čine MS podlogu je dat u Prilogu 2.

PRILOG 2 – Sastav rastvora koji čine MS podlogu**MS makroelementi (x 100) - 1l**

- NH_4NO_3 - 16,5 g
- KNO_3 - 19,0 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 4,4 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 3,7 g
- KH_2PO_4 - 1,7 g

Doda se dH_2O do litre makroelemenata

MS mikroelementi (x 1000) - 1l

- H_3BO_3 - 6,2 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 16,9 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 8,6 g
- KI - 830 mg
- $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 250 mg
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 25 mg
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 25 mg

Doda se dH_2O do litre mikroelemenata

MS vitamini (x 500) - 1l

- *mio*-Inozitol - 50 g
- Gilicin - 1 g
- Nikotinska kiselina - 250 mg
- Piridoksin HCl - 250 mg
- Tiamin HCl - 50 mg

Doda se dH_2O do litre vitamina

Fe helat (x 100) - 1l

- Na₂EDTA - 3,73 g
- FeSO₄·7H₂O - 2,78 g

Doda se dH₂O do litre helata

PRILOG 3 – Sterilizacija semena *

1. Seme se dobro ispere sa deterdžentom, Tween 80, 2 min i zatim dobro ispere vodom.
2. Nakon faze ispiranja, doda se 14% varikina u erlenmajer posudu sa semenom i ostavi se 20 min uz povremeno mešanje.
3. Posle 20 min odlije se varikina i seme se dobro ispere sterilnom dH_2O .
4. Nakon ispiranja, seme se oljušti i doda se 7% varikina. Seme se uz povremeno mešanje ostavi u varikini 1 h, nakon čega se dobro ispere sterilnom dH_2O .
5. Seme se postavi u Perti posudu na filter papiru i drži 1 h na $45^{\circ}C$.

* Taški-Ajduković i Vasić (2005)

PRILOG 4 - Rastvori za ekstrakciju DNK

Pufer za ekstrakciju (27 ml):

- 100 mM Tris-HCl pH 8 - 5,4 ml
- 20 mM EDTA - 2,7 ml
- 1,4 M NaCl - 12.58 ml
- 2% CTAB - 0.54 g
- 0,5 M glukoza – 2,43 g

TE pufer – za međukorak (korak 8.):

- 100 mM Tris-HCl pH 8 - 2,0 ml
- 1 mM EDTA - 0,5 ml

TE pufer – konačno razblaženje:

- 10 mM Tris-HCl pH 8 - 5,0 ml
- 0,1 mM EDTA - 5,0 ml

PRILOG 5 - Protokol za ekstrakciju DNK *

1. Od prethodno usitnjenog biljnog materijala u tečnom azotu u Eppendorf epruvetu, odmeri se približno 70 mg
2. Doda se 1 ml pufera za ekstrakciju i brzo izmeša na vorteksu
3. Kada je suspenzija homogena uzorak se ostavi u vodeno kupatilo na 60°C, 60 min uz povremeno blago mešanje
4. Doda se 700 µl hloroforma, izmeša se inverzijom epruvetice dok se ne napravi emulzija
5. Centrifugiraju se uzorci 10 min na 10 000 rpm i 4°C
6. Posle centrifugiranja odvoji se vodena faza u kojoj je DNK u novu Eppendorf epruvetu, doda se 560 µl hladnog izo-propanola i polako meša inverzijom epruvete 1-2 min na sobnoj temperaturi do precipitacije nukleinskih kiselina
7. Posle 30-60 min na -20°C, uzorak se centrifugira 10 min na 10 000 rpm, pri temperaturi od 4°C
8. Pipetom se odvoji supernatant, a talog rastvori u koncentrovanom TE puferu (po potrebi grejati 5 min na 65°C)
9. DNK se taloži sa 20 µl 3M natrijum acetata i 400 µl 100% etanola
10. Talog se izdvaja na -20°C (1h), zatim se centrifugira 10 min na 10000 rpm
11. Supernatant se pažljivo odvoji pipetom
12. Talog sa DNK se prosuši na sobnoj temperaturi (do 15 min)
13. Rastvori se talog u razblaženom TE puferu (zapremina pufera zavisi od količine DNK)

*Permingeat i sar. (1998)

PRILOG 6 - Sekvence SSR prajmera* i pozicija na mapi vezanosti suncokreta

Ime prajmera	Sekvenca prajmera	LG
ORS 176	F: CCCTAACTGGTTTTCTGACCC R: AACTTTTGTTTGTCCAGG	9
ORS 838	F: TGCATCTTGTAATTGTGTGGGTA R: AACGACTCCTCTTTGATCTCGTC	9
ORS 844	F: ACGATGCAAAGAATATACTGCAC R: CATGTTTAATAGGTTTTAATTCTAGGG	9
ORS 897	F: GTTCTCGCAATAAAGGTGGTTCT R: CAAAACCGGAAACTGAAGATGA	9
ORS 1034	F: TGGCAATGGGTCAGAATGTTT R: TTTCGGAGCAGCATTAGTATCTCT	9
ORS 1211	F: GAAACCACCATTACAATCCCAGT R: TCACCACAAATCTCAAATCTTCC	9, 2 polimorfan
ORS 1220	F: ACAATAGCCTTCAGTTGCCTTGT R: GTTTAGTTGAAACCCGGATCG	9
ORS 1270	F: AAATAATCATCCGTGCTTGTCCT R: ATGAATGGAATCAAACATTACCG	9

*Tang i sar. (2002)

PRILOG 7 - PCR programi za umnožavanje DNK SSR markerima:

I) SUMOTOUCH (Kolkman i sar., 2004)

Inicijalna denaturacija DNK 1 min na 94°C;

10 ciklusa:

- Denaturacija 94°C u trajanju od 30 s
- Aniling na 67°C u trajanju od 30 s i opadanje temperature za 1°C svaki sledeći ciklus
- Ekstenzija na 72°C u trajanju od 30 min

30 ciklusa:

- Denaturacija 94°C u trajanju od 30 s
- Aniling na 58°C u trajanju od 30 s
- Ekstenzija na 72°C u trajanju od 30 s

II) TOUCH DOWN 3 (Dimitrijević i sar., 2010b):

Inicijalna denaturacija DNK 3 min na 95°C;

6 ciklusa:

- Denaturacija 94°C u trajanju od 30 s
- Aniling na 66°C u trajanju od 30 s i opadanje temperature za 1°C svaki sledeći ciklus
- Ekstenzija na 65°C u trajanju od 30 min

32 ciklusa:

- Denaturacija 94°C u trajanju od 30 s
- Aniling na 60°C u trajanju od 30 s
- Ekstenzija na 65°C u trajanju od 30 s
- Finalna ekstenzija na 65°C u trajanju od 20 min

BIOGRAFIJA

Aleksandra Dimitrijević je rođena u Novom Sadu 02.07.1985. godine. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, smer diplomirani biolog-molekularni biolog, upisala je 2004. godine, a diplomirala u septembru 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,37 i diplomskim radom „Molekularni markeri za gen otpornosti suncokreta prema plamenjači”, koji je odbranila sa ocenom 10.

Master studije upisala je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu 2008. godine, smer diplomirani biolog-molekularni biolog, master. Master rad “Krioprotektivna dehidratacija: identifikacija i ekspresija gena za delta 9-acil-CoA desaturazu kod *Megaphorura arctica*“, odbranila je sa ocenom 10, 25.09.2009. godine. Tokom master studija učestvovala je u nastavi, držeći vežbe na predmetu Osnove molekularne biologije. Doktorske studije, studijski program: Poljoprivredne nauke, modul: Ratarstvo i povrtarstvo na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2009/2010. Položila je sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,63.

Od 01.07.2009. godine zaposlena je u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, kao istraživač pripravnik. Od 02.05. -30.06.2011. učestvovala je na kursu Adapting to Climate Change: Biotechnology in Agriculture in a World of Global Environmental Changes na Hebrew University of Jerusalem, Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, Division for External Studies, Rehovot, u Izraelu. Član je Federation of European Societies of Plant Biology. Kao autor ili koautor je objavila 25 naučna rada i učestvovala je na dva projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Govori tečno engleski.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Александра Димитријевић
Број индекса или пријаве докторске дисертације _____ 09/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Употреба молекуларних маркера и *in vitro* метода у детекцији отпорности
сунцокрета према трибенурон-метилу

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 08. 07. 2013. године

Потпис докторанда



Александра Димитријевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Александра Димитријевић
Број индекса или пријаве докторске дисертације 09/10
Студијски програм Пољопривредне науке
Наслов докторске дисертације Употреба молекуларних маркера и *in vitro* метода у детекцији отпорности сунцокрета према трибенурон-метилу
Ментор Проф. Др Гордана Шурлан-Момировић

Потписани/а Александра Димитријевић 

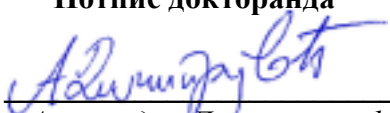
Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 08. 07. 2013. године

Потпис докторанда


Александра Димитријевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Употреба молекуларних маркера и *in vitro* метода у детекцији отпорности сунцокрета према трибенурон-метилу

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

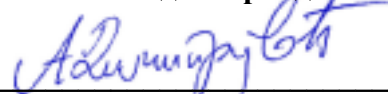
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

У Београду, 08. 07. 2013. године

Потпис докторанда



Александра Димитријевић