

**UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

Ivana L. Imerovski

**Upotreba molekularnih markera u
detekciji gena otpornosti *Plarg* na
plamenjaču kod suncokreta**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE**

Ivana L. Imerovski

**Use of molecular markers in detection
of downy mildew resistance gene *Pl_{arg}* in
sunflower**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

UNIVERZITET U BEOGRADU POLJOPRIVREDNI FAKULTET

MENTOR:

prof. dr Gordana Šurlan-Momirović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet, NO Genetika

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dragana Miladinović, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi
Sad, NO Biotehnologija

prof. dr Vera Rakonjac, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni
fakultet, NO Genetika

dr Siniša Jocić, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, NO
Oplemenjivanje biljka

dr Dragan Perović, viši naučni saradnik Instiuta Julius Kuehn, Federal Research
Centar for Cultivated Plants, Institute for Resistance Research and Stress
Tolerance, Kvedlinburg, Nemačka, NO Genetika i biotehnologija

DATUM ODBRANE:

Zahvalnica

Želela bih da se zahvalim mojim mentorkama, Gordani Šurlan-Momirović i Dragani Miladinović, za sve konstruktivne savete i kritike tokom eksperimentalnog rada i izrade disertacije, kao i članovima komisije.

Hvala koleginicama Gordani Jocić, Dragani Đokić i Aleksandri Dimitrijević za svakodnevnu pomoć i podršku. Mom drugu, Marku Mileru, zato što uvek na njega mogu da računam.

Konačno, veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici i Luki.

Upotreba molekularnih markera u detekciji gena otpornosti *Pl_{arg}* na plamenjaču kod suncokreta

Ivana L. Imerovski

SAŽETAK

Plamenjače suncokreta je bolest koja može da izazove značajno smanjenje prinosa. Šteta prouzrokovana ovim patogenom može da se kontroliše uzgajanjem otpornih hibrida suncokreta.

Gen otpornosti *Pl_{arg}* unet je u gajeni suncokret iz divljeg srodnika *H. argophyllus* i obezbeđuje otpornost na sve do sada identifikovane rase plamenjače. Kako bi se proces unošenja gena otpornosti u različite linije ubrzao i učinio pouzdanijim, potrebno je identifikovati molekularne markere blisko vezane za gen otpornosti. Od posebnog interesa su kodominantni markeri, koji mogu da naprave razliku između homozigotno i heterozigotno otpornih biljaka.

Cilj ovog rada bio je identifikacija molekularnih markera blisko vezanih za gen *Pl_{arg}* koji će moći da se koriste za marker asistiranu selekciju (MAS). U radu je korišćena mapirajuća populacija koja se sastojala od 103 F₂ biljke dobijene iz ukrštanja RHA 419 x RHA-N-49. Molekularne analize pokazale su da se gen *Pl_{arg}* nalazi na LG1 genetičke mape suncokreta. Identifikovan je novi kosegregirajući SSR marker ORS675, dok je kosegregacija markera ORS716 i ORS662 sa *Pl_{arg}* potvrđena. Veza markera i gena potvrđena je na dodatne 22 linije sa genom *Pl_{arg}*. Testiranje linija HA-R4 (*Pl₁₄* i *Pl₁₆*) i HA-R5 (*Pl₁₃*) markerima ORS662, ORS716 i ORS675 pokazalo je da se gen *Pl_{arg}* nalazi odvojeno od drugih do sada identifikovanih gena sa LG1. Nakon validacije, primena markera ORS675 i ORS716 u selekciji je testirana na dve različite BC₁ populacije. Markeri su se pokazali korisnim kako u molekularnom oplemenjivanju tako i za analizu genetičke čistoće linija suncokreta.

Može se zaključiti da se molekularni markeri iz ove studije blisko vezani za gen *Pl_{arg}* mogu koristiti za MAS, i s toga se upotrebljavati u selekcionim programima kako bi se olakšao unos gena otpornosti u različite linije suncokreta.

Ključne reči: suncokret, plamenjača, SSR, *Pl_{arg}*, MAS

Naučna oblast: Ratarstvo i povrtarstvo

Uža naučna oblast: Biotehnologija

UDK broj: 582.998.16>631.52:632.9(043.3)

Use of molecular markers in detection of downy mildew resistance gene *Pl_{arg}* in sunflower

Ivana L. Imerovski

SUMMARY

Downy mildew is a common sunflower disease that can cause significant yield reduction. The damage caused by the pathogen can be controlled by growing sunflower varieties resistant to this disease.

Resistance gene *Pl_{arg}* was introduced into cultivated sunflower from the wild species *H. argophyllus* and it provides resistance against all known downy mildew races. Molecular markers can facilitate and accelerate the process of transfer of resistance gene into commercial sunflower lines. Co-dominant markers are particularly useful, since they can discriminate between homozygous and heterozygous resistant plants.

The aim of this study was to identify molecular markers closely linked to gene *Pl_{arg}* that will be used in marker assisted selection (MAS). A mapping population of 103 F₂ progeny from the cross RHA 419 x RHA-N-49 was used. Molecular analyses indicated that the gene *Pl_{arg}* is located on LG1 of the genetical map of sunflower. A new co-segregating simple sequence repeat (SSR) marker ORS675 was identified and the co-segregation of markers ORS716 and ORS662 with *Pl_{arg}* gene was confirmed. The markers were validated on twenty two resistant inbred lines (RHA 443, RHA 464 and RH 1-20). Results obtained on lines HA-R4 (*Pl₁₄* i *Pl₁₆*) and HA-R5 (*Pl₁₃*) with markers ORS662, ORS716 i ORS675 showed that *Pl_{arg}* is a resistance locus different from other resistance genes mapped on LG1. Application of the markers ORS675 and ORS716 in marker assisted selection was tested on two different BC1 populations. Markers were found to be useful both for molecular breeding and genetic purity analyses. The closely linked molecular markers from this study will facilitate transfer of the resistance gene into different sunflower lines.

Keywords: breeding, downy mildew, *Pl_{arg}*, sunflower, SSR, MAS

Scientific field: Field and Vegetable Crops

Narrow scientific field: Biotechnology

UDK: 582.998.16>631.52:632.9(043.3)

LISTA SKRAĆENICA

AFLP (*eng.* amplified fragment length polymorphism) - polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata

BSA (*eng.* bulked segregant analysis) - analiza grupnih uzoraka koji se razdvajaju za određeno svojstvo

CAPS (*eng.* cleaved amplified polymorphic site) - polimorfizam amplifikovanih mesta sečenja

CLI (*eng.* cotyledon limited infection) - infekcija limitirana na kotiledon

CMS (*eng.* cytoplasmatic male sterility) - citoplazmatska muška sterilnost

HR (*eng.* hypersensitive response in the hypocotyls) - reakcija hipersenzitivnosti kod hipokotila

IFLP (*eng.* intron fragment length polymorphism) - polimorfizam dužine intronskih fragmenata

JA (*eng.* jasmonic acid) - jasmonična kiselina

LAR (*eng.* local-acquired resistance) - lokalna stečena otpornost

LG (*eng.* linkage group) - grupa vezanosti

MAB (*eng.* marker assisted backcrossing) - marker asistirano povratno ukrštanje

MAS (*eng.* markers assisted selection) - marker asistirana selekcija

NO (*eng.* nitrogen oxide) - azot monoksid

PIC (*eng.* polymorphic information content) - sadržaj informacija o polimorfizmu

QTL (*eng.* quantitative trait loci) - kvantitativni lokus

RAPD (*eng.* random amplified polymorphic DNA) - polimorfizam nasumično amplifikovane DNK

RFLP (*eng.* restriction fragment length polymorphism) - polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata

RGC (*eng.* resistance gene candidat, RGC, *syn.* resistance gene analogue, RGA) - kandidat gena otpornosti

RIL (*eng.* recombinant inbred line) - rekombinantna inbred linija

ROS (*eng.* reactive oxygen species) - reaktivne kiseonične vrste

SA (*eng.* salicylic acid) - salicilna kiselina

SAR (*eng.* systemical acquired resistance) - sistemska stečena otpornost

SSR (*eng.* simple sequence repeats) - ponovci jednostavnih sekvenci

SNP (*eng.* single nucleotide polymorphism) - polimorfizam jednog nukleotida

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	4
3. PREGLED LITERATURE	5
3.1. PLAMENJAČA	5
3.1.1. Rasprostranjenost plamenjače	5
3.1.2. Nomenklatura rasa	6
3.1.3. Rasna kompozicija	8
3.1.4. Pojava novih patotipova prouzrokivača plamenjače	9
3.1.5. Uslovi za razvoj plamenjače.....	9
3.1.6. Mere prevencije i suzbijanja plamenjače	11
3.2. OTPORNOST SUNCOKRETA NA PLAMENJAČU.....	12
3.2.1. Genetska osnova otpornosti suncokreta na plamenjaču	12
3.2.2. Molekularni aspekt otpornosti suncokreta na plamenjaču i reakcija hipersenzitivnosti	15
3.3. UPOTREBA MOLEKULARNIH METODA U SELEKCIJI SUNCOKRETA NA BOLESTI.....	17
3.3.1. Genetičke mape suncokreta.....	17
3.3.2. Marker asistirana selekcija	20
3.3.3. Mapiranje <i>Pl</i> gena.....	21
3.3.4. Gen <i>Pl_{arg}</i>	25
4. RADNA HIPOTEZA.....	27
5. MATERIJAL I METOD RADA.....	28
5.1. BILJNI MATERIJAL	28
5.1.1. Materijal korišćen za mapirajuću populaciju.....	28
5.1.2. Materijal za validaciju markera	28
5.1.3. Materijal za povratna ukrštanja	30
5.2. RAZVOJ MAPIRAJUĆE POPULACIJE.....	32
5.3. FITOPATOLOŠKA OCENA.....	33
5.4. IZOLACIJA GENOMSKE DNK	34
5.5. USLOVI PCR REAKCIJE	35
5.6. MOLEKULARNE ANALIZE POLULACIJE RHA 419 x RHA-N-49	36
5.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA MAPIRAJUĆE POPULACIJE.....	38
5.8. POTVRDA MARKERA	38

5.9. MARKER-ASISTIRANO POVRATNO UKRŠTANJE	39
6. REZULTATI	40
6.1. FITOPATOLOŠKA OCENA.....	40
6.2. PRELIMINARNO MOLEKULARNO ISTRAŽIVANJE.....	41
6.2.1. Optimizacija PCR uslova.....	41
6.2.2. Tetsiranje markera sa LG1	43
6.3. MOLEKULARNE ANALIZE MAPIRAJUĆE POPULACIJE RHA 419 x RHA-N-49.	
KONSTRUKCIJA GENETIČKE MAPE.	48
6.4. VALIDACIJA MARKERA.....	50
6.5. MAS.....	51
6.5.1. Testiranje osetljivih linija	51
6.5.2. Konstrukcija klastera.....	54
6.5.3. Upotreba markera u povratnim ukrštanjima	56
7. DISKUSIJA.....	57
7.1. OTPORNOST ŠIROKOG SPEKTRA UNEŠENA IZ DIVLJIH SRODNICA.....	57
7.2. GEN ILI GENSKI KLASTER?	58
7.3. OTPORNOST TIPA II.....	60
7.4. LOKACIJA GENA I BLISKO VEZANI MARKERI. SUPRESOVANA REKOMBINACIJA U POPULACIJI RHA 419 x RHA-N-49.	61
7.5. VALIDACIJA MARKERA.....	62
7.6. POLIMORFNOST MARKERA SA LG1. KORELACIJA IZMEĐU PROFILA DOBIJENIH MARKERIMA SA LG1 I POREKLA LINIJA.	64
7.7. NULTI ALELI U INTERSPECIES UKRŠTANJIMA.....	65
7.8. MARKER ASISTIRANA SELEKCIJA. MARKER ASISTIRANO POVRATNO UKRŠTANJE.....	66
7.9. PIRAMIDIZACIJA GENA OTPORNOSTI.....	68
8. ZAKLJUČAK.....	70
9. LITERATURA.....	72
PRILOG 1 - Rastvori za ekstrakciju DNK	87
PRILOG 2 - Protokol za ekstrakciju DNK.....	88
PRILOG 3 - Pufferi za elektroforetsko razdvajanje.....	89

1. UVOD

Suncokret, *Heliantus annuus* L., je jedna od najvažnijih uljanih kultura u svetu, a u Srbiji je glavni izvor jestivog ulja (Čurović 2012). Pripada rodu *Helianthus*, familiji Asteraceae (Marinković i sar. 2003). *Helianthus*, ime roda kojem pripada suncokret, složenica je od dve grčke reči: „helios” (sunce) i „anthus”(cvet).

Suncokret je poreklom iz Severne Amerike, sa sadašnje teritorije SAD. Na osnovu arheoloških nalaza, dokazano je da su ga koristili američki Indijanci kao i da je kao var. *macrocarpus* bio poznat i pre otkrića Amerika (Marinković i sar. 2003). Korišćen je za ishranu, dobijanje ulja za mazanje kose i tela, kao i u medicinske svrhe (Paniego i sar. 2007). Poznato je da su Indijanci u Severnoj Americi koristili suncokret kao prehrambenu namirnicu 4625 godina pre nove ere (Crites 1993).

Tokom domestifikacije suncokreta, dogodio se relativno mali broj promena u genetskom smislu koji je rezultovao velikim promenama na fenotipskom nivou. Posledice domestifikacije su povećanja količine i veličine semena, prisustvo apikalne dominacije, smanjenje dormantnosti semena i smanjenje autoinkompatibilnosti (Burke i sar. 2005).

Suncokret se koristi za dobijanje ulja za ishranu ljudi i životinja, što mu je prevashodna namena, a zbog lepog cveta uzgaja se i kao ukrasna biljka. Ulje suncokreta se mahom ne koristi u industrijske svrhe zbog relativno visoke cene u odnosu na druga ulja. Ipak, u manjoj meri se upotrebljava u proizvodnji boja i lakova, kao i sapuna i deterdženata. Zajedno sa drugim biljnim uljima, ima potencijalnu vrednost za proizvodnju lepkova, plastike, sintetičkih maziva (Jan i Seiler 2007), a koristi se i za proizvodnju biodizela (Čurović 2012).

Suncokret su u Evropu doneli Španci, početkom 1500-ih. Engleski i Francuski istraživači su ga potom preneli dalje po Evropi i inicijalno je uzgajan kao

ukrasna biljna vrsta. Iz zapadne Evrope, suncokret je prenešen u Egipat, Avganistan, Indiju, Kinu i Rusiju (Jan i Seiler 2007). U Rusiju gde ga je doneo Petar Veliki u povratku sa putovanja 1697., i od tada počinje naglo da se širi i postaje jedna od vodećih biljnih vrsta (Marinković i sar. 2003).

Početak oplemenjivanja suncokreta na naučnim osnovama datira od 1912., kada su osnovani oplemenjivački centri u SSSR. Kao rezultat tog rada, prinos ulja drastično je povećan: sa 330 g/kg, koliko je dobijano kasnih četrdesetih godina dvadesetog veka, na 550 g/kg do 1960-ih (Paniego i sar. 2007). Visokouljane ruske sorte su doprinele da suncokret osvoji većinu kontinenata kao uljarica. Početkom 1960-ih godina došlo je do uvođenja ruskih visokouljanih sorti u velik broj evropskih zemalja, među kojima je i Srbija, što je uticalo na povećanje površina pod ovom kulturom u svetu i na početak gajenja suncokreta kao uljane kulture (Miklič i sar. 2008).

Otkrićem podesnog izvora CMS (Leclercq, 1969) i gena za restauraciju fertilnosti (Kinman 1970) omogućeno je stvaranje hibrida. Prednost hibrida u odnosu na sorte je veći prinos i količina ulja, kao i veća uniformnost (Jan i Seiler 2007).

Danas se površine zasejane suncokretom nalaze svuda gde klimatski uslovi dozvoljavaju, i prisutan je na šest kontinenata. Najpogodnije za njegovo gajenje su regije 50° severno i južno od Ekvatora. Suncokret je u svetu zasejan na preko 26 miliona hektara, uz prinos od 1,49 t/ha. U Srbiji se površine pod suncokretom u poslednjoj deceniji kreću u rasponu od 140 000 do 220 000 ha godišnje (Čurović 2012). Hibridi suncokreta se gaje u većini država u svetu, dok su sortne populacije prisutne u proizvodnji u malom broju zemalja u razvoju (Škorić i sar. 2006).

Glavni cilj oplemenjivanja je stvaranje hibrida ili sorata intenzivnog tipa koji će omogućiti u određenim klimatskim zonama visok i stabilan prinos semena, visok sadržaj ulja sa optimalnim odnosom masnih kiselina i tokoferola, otpornost prema bolestima, insektima, pticama, i lošim klimatskim uslovima i pogodnost pri mehanizovanoj žetvi (Marinković i sar. 2003). Bolesti predstavljaju jedan od glavih ograničavajućih faktora u proizvodnji suncokreta. Poznato je da preko 30 različitih patogena napada suncokret (Škorić i sar. 2006), a gljivična oboljenja su među najbrojnijim (Jan i Seiler 2007). Plamenjača suncokreta je oboljenje koje uzrokuje

gljiva *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et Toni. (syn. *Plasmopara helianthi* Novot.). Ova bolest je rasprostranjena u svim regionima gde se gaji suncokret (Škorić i sar. 2006), sa izuzetkom Australije, i dovodi do ekonomski značajnih smanjenja prinosa suncokreta. Do sada je opisano više *Pl* gena, koji obezbeđuju otpornost prema različitim rasama *Plasmopara halstedii*. Glavni izvori otpornosti se nalaze u divljim vrstama suncokreta i putem interspecieshibridizacije gene otpornosti na plamenjaču treba transferovati u genotipove gajenog suncokreta (Fick i Miller 1997). Korišćenje divljih vrsta kao izvora poželjnih gena je složen proces gde je prvi korak identifikacija željenih gena u divljem srodniku, a potom sledi unošenje gena u genotipove gajenog suncokreta i proučavanje načina nasleđivanja (Škorić 1988).

Poslednjih godina je došlo do pojave novih rasa plamenjače i zbog toga se ulažu naponi kako bi se otkrili novi izvori otpornosti na plamenjaču među jednogodišnjim i višegodišnjim vrstama roda *Helianthus*. Plamenjača se veoma retko javlja kod divljih vrsta, a epidemije u divljim populacijama nikada nisu zabeležene (Viraniy i Spring 2011). Prisustvo *Pl* gena utvrđeno je u 28 divljih vrsta (Škorić i sar. 2006). Tako je npr. gen *Pl₆* unet iz divljeg ekotipa *H. annuus* (Miller i Gulya 1991), *Pl₅* iz *H. tuberosus* (Vranceanu i sar. 1981), potom *Pl₇* iz *H. praecox* (Miller i Gulya 1991), a *Pl₈* i *Pl_{arg}* iz *H. argophyllus* (Miller i Gulya 1991; Seiler i sar. 1991).

Da bi se primenom klasičnih metoda u genom suncokreta unelo poželjno svojstvo potrebno je najmanje deset generacija. Ovako dug proces je u neskladu sa zahtevima i promenama na tržištu (Marinković i sar. 2003). Danas se sve više u oplemenjivanju koriste biotehnoške metode u cilju ostvarivanja bržeg i efikasnijeg oplemenjivanja. Razvoj molekularnih markera u mnogome je ovaj proces skratio i olakšao. Identifikacija molekularnih markera koji kosegregiraju sa *Pl* genima od izuzetnog je značaja, jer njihova upotreba omogućava praćenje unošenja gena u otpornosti u selekcionu materijal, čime se otporni hibridi stvaraju u kraćem vremenskom periodu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi rada su:

- identifikacija molekularnih markera blisko vezanih za gen *Plarg*;
- utvrđivanje vezanosti gena i markera i konstrukcija genetičke mape regiona u kojem se gen nalazi;
- validacija markera;
- upotreba molekularnog markera u marker asistiranoj selekciji (MAS);

Prvi korak u istraživanju bila je identifikacija markera koji okružuju gen *Plarg*. Nakon utvrđivanja polimorfni markera pristupilo se ispitivanju genetičke udaljenosti markera i gena. Od posebnog značaja su bili kodominantni markeri, koji omogućavaju razlikovanje homozigotno otpornih biljaka od heterozigotno otpornih. Posle identifikacije najbliže vezanih markera, markeri su testirani na različitim otpornim i osjetljivim genotipovima, kako bi se potvrdila veza markera i gena.

Predloženo istraživanje ima praktičan značaj. Efikasnost MAS u selekcionim programima zavisi od jačine veze između molekularnog markera i segmenta DNK koji je nosilac osobine od interesa. Pronalaženje molekularnih markera blisko vezanih za gen *Plarg* omogućava detekciju ovog gena otpornosti na molekularnom nivou u različitim genotipovima. Blisko vezani kodominantni markeri moći će se koristiti u selekcionim programima za odabir otpornih biljaka. Molekularni markeri će značajno ubrzati proces unošenja gena otpornosti u elitne komercijalne linije suncokreta i olakšati dobijanje hibrida suncokreta otpornih na *P. halstedii*.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. PLAMENJAČA

3.1.1. Rasprostranjenost plamenjače

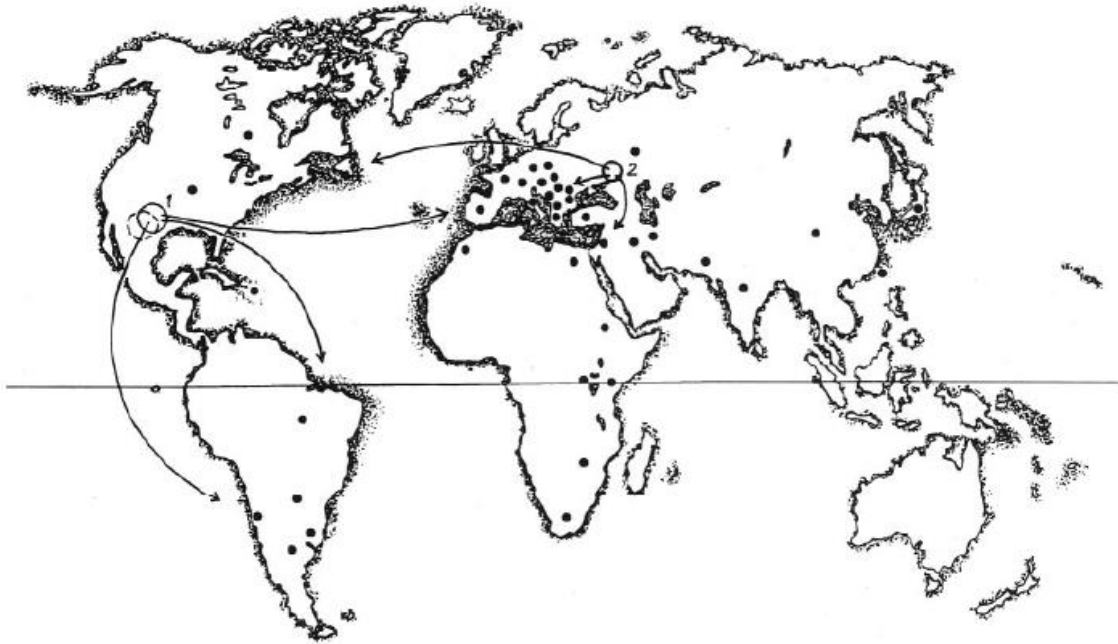
Bolesti suncokreta dovode do smanjene realizacije njegovog genetskog potencijala (Škorić i sar. 2006), a jedno od ekonomski veoma značajnih oboljenja je plamenjača, koju prouzrokuje gljiva *Plasmopara halstedii*. Plamenjača suncokreta je prvi put otkrivena u Americi 1883. godine, dok je u Rusiji otkrivena 1892. na *Helianthus tuberosus*-u (Aćimović 1998). U tadašnjoj Jugoslaviji ju je otkrio Perišić (1949) a opisao Nikolić (1952) (prema Jocić i sar. 2009). Imajući u vidu da su i patogen i domaćin poreklom iz centralnog dela Severne Amerike (Lepik 1962, prema Viranyi 2002), pretpostavlja se da su ova dva organizma koevoluirala zajedno (Slika 1). Kako je u prvoj polovini XX veka suncokret počeo da se uzgaja u mnogim zemljama, došlo je i do širenja bolesti između dva svetska rata, najverovatnije prenošenjem prouzrokovača bolesti zaraženim semenom suncokreta (Aćimović 1998).

Širenje plamenjače i pojava novih patotipova gljive se dešavalo u dva faze:

1. Prilagođavanje patogena na suncokret kao domaćina i uspostavljenje interkontinentalne rasprostranjenosti u periodu XVI-XX veka;

2. Pojava novih patotipova u gljivičnim populacijama u regionima u kojima se uzgaja suncokret, usled intenzivnog korišćenja mera suzbijanja bolesti. Ova koevolucija je počela 1960. godine i još uvek traje (Viranyi 2002).

Do danas je identifikovano 37 virulentnih patotipova (Gulya i sar. 1991; Gulya 2007; Liu i sar. 2012), od kojih je najveći broj nađen na teritoriji Kanade, Francuske i Sjedinjenih Američkih Država. Najmanji broj patotipova uočen je u Aziji i Južnoj Americi (Gulya 2007).



Slika 1. Centri proizvodnje suncokreta (obeleženi crnim tačkama) i porekla plamenjače (obeleženi belim krugovima), kao i pravci širenja bolesti (obeleženi strelicama) (Viranyi 2002)

3.1.2. Nomenklatura rasa

Dugo se smatralo da je *Plasmopara halstedii* kompaktna vrsta, da bi kasnija istraživanja pokazala da postoje fiziološke osobine specifične kako za rasu iz Evrope, tako i za onu iz Severne Amerike, kao i da postoji bitna razlika u njihovoj virulentnosti. Rasa 100 detektovana je u Rusiji, dok je u Americi prva rasa koja je primećena rasa 300 (Vear 2010). Otpornost na evropsku rasu ustanovljena je genom Pl_1 , a na američku i evropsku genom Pl_2 (Vranceanu i sar. 1970, prema Aćimović 1998). Duži niz godina postojale su samo dve rase plamenjače, tj. populacija je bila stabilna. U godinama koje su usledile, u Francuskoj, Mađarskoj, SAD, Argentini i u Srbiji pojavio se veći broj novih rasa (Miklić i sar. 2008). Kako bi se determinisale fiziološke rase prouzrokivača oboljenja, napravljena je kolekcija izolata *Plasmopara halstedii* iz zemalja Evrope, Južne i Severne Amerike, koja je

upotrebljena za inokulisanje poznatih inbred linija suncokreta sa različitim *Pl* genima i određivanje fizioloških rasa patogena. Na osnovu reakcije testiranih genotipova, determinisno je 7 fizioloških rasa (nazvanih 1-7) (Aćimović 1998). U Francuskoj je u to vreme postojala nešto drugačija nomenklatura, prema kojoj su definisane rase 1, A, B, C i D.

Tabela 1. Uporedni pregled tri nomenklature za klasifikaciju rasa plamenjače

1. set												
	D-1 (HA-304)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	D-2 (RHA-265)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	D-3 (RHA-274)	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S
2. set												
Diferencijalne linije	D-4 (PM13)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S
	D-5 (PM17)	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R
	D-6 (803-1)	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
3. set												
	D-7 (HAR4)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
	D-8 (QHP1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
	D-9 (HA335)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Nomenklature												
Nomenklature	Američka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Francuska	1	D	C	-	-	-	-	A	-	B	-
	Trocifrena	100	300	700	730	770	310	330	710	330	703	711

Kako bi se olakšala međunarodna saradnja naučnika iz različitih zemalja, 1998. godine usvojena je međunarodna trocifrena nomenklatura rasa (Gulya i sar. 1998; Tourvielle de Labrouhe i sar. 2000). Trocifrena nomenklatura se zasniva na numeričkom ocenjivanju osetljivosti 9 diferencijalnih linija podeljenih u tri seta. Unutar svakog seta, osetljivost svake od tri pojedinačne linije se ocenjuje sa 1, 2 ili 4, u odgovarajućem redosledu navođenja, a potom se konačna šifra rase dobija sabiranjem cifara unutar svake od tri kategorije. Što je rasa virulentnija, veći je njen trocifreni numerički kod. Uporedni pregled nomenklatura dat je u Tabeli 1.

3.1.3. Rasna kompozicija

U svetu je do sada identifikovano 37 rasa, a dominantne su četiri (700, 710, 730, 770) (Gulya 2007).

Prva rasa detektovana u Evropi, rasa 100, veoma je homogena i značajno drugačija od rase 300 koja je prvo identifikovana u Americi (Vear 2010). U Evropi, plamenjača je najviše prisutna u Francuskoj, gde je do sada okarakterisano 14 rasa patogena. Na jugu Francuske dominantna je rasa 703, dok je na severu najviše prisutna 710, kao i rase koje su se pojavile posle 2000. godine ("xx4" ili "xx7") (Vear 2012). Pomoću SNP markera, Delmotte i sar. (2008) su analizirali 24 individualna izolata u kojima je bilo zastupljeno 14 rasa prisutnih u Francuskoj. Na osnovu dobijenih molekularnih profila, 14 rasa svrstano je u tri genetički različite kategorije. Svaka od tri kategorije uključivala je jednu od tri najzastupljenije rase koje se nalaze u Francuskoj (100, 703 i 710). Međutim, ovi markeri nisu dali relevantne informacije koje bi se ticale patogenosti rase, tj. nije uspostavljena veza između patogenosti i markera, već je na osnovu polimorfizma mogla da se vidi opšta genetička struktura populacije *Plasmopara halstedii*. Prema rezultatima Roeckel-Drevet i sar. (2003), evropske rase 710 i 703 bliže su izolatima iz Severne Amerike nego drugim evropskim rasama.

U Americi su najčešće rase "xx0", npr. 330, 710, 730 i 770 (Vear 2012).

Na teritoriji Srbije, rasa 100 je bila dominantna sve do 1990. Međutim, 1991. izolat pod imenom NS 912 identifikovan je kao rasa 730. U tom trenutku

rasa 730 činila je 10% ukupne populacije prouzrokivača plamenjače, da bio se taj procenat do 1996. uvećao na 50% (Jocić i sar. 2009). Danas, rasa 730 je dominantna na teritoriji Srbije (Jocić i sar. 2010).

3.1.4. Pojava novih patotipova prouzrokivača plamenjače

Postoje različita objašnjenja za pojavu novih virulentnih formi prouzrokivača plamenjače (Delmotte i sar. 2008), ali povećanje broja patotipova u poslednjoj deceniji je najverovatnije uzrokovano intenzivnim uzgojem suncokreta i intenzivnom primenom mera borbe protiv plamenjače, u koje spada uzgoj otpornih hibrida suncokreta i primena fungicida (Viranyi i Spring 2011). Pored rekombinacije genetskog materijala između različitih sojeva, postoje brojni mehanizmi kod oomiceta koji su uzrok varijabilnosti, poput mitotske rekombinacije, genske konverzije i transpozona (Chamnanpant i sar. 2001; Kamoun 2003). Poznato je da vrste roda *Phytophthora* fuzijom zoospora mogu formirati aseksualne hibride (Érsek i sar. 1995; Érsek i Nagy 2008). Ukoliko je suncokret zaražen sa dva soja prouzrokivača plamenjače koja se razlikuju po svojoj patogenosti i otpornosti na fungicide, postoji mogućnost dobijanja rekombinanata koji će imati patogenost jednog soja i otpornost drugog (Spring i Zipper 2006).

3.1.5. Uslovi za razvoj plamenjače

P. halstedii je homotalusna oomiceta, što znači da obrazuje kompatibilne gamete na istoj miceliji (Stojanović, 2004). Ciklus *P. halstedii* se sastoji od jedne seksualne generacije koja obezbeđuje prezimljavanje, i jedne do dve aseksualne generacije tokom sezone rasta (Sakr 2010).

Za uspešnu infekciju neophodni su određeni uslovi, pre svega odgovarajuća temperatura, vlažnost, pH, prisustvo vijabilnog inokuluma i domaćina (Aćimović 1998). Vlažno i toplo zemljište pospešuju infekciju i simptome bolesti kod osetljivih genotipova (Sakr 2010).



Slika 2. Izgled biljke sa sistemichnom infekcijom i izgled plamenjace na poledini lista (Friskop i sar. 2009)

Šteta uzrokovana plamenjacom zavisi od načina infekcije, koja može biti:

- A. Primarna
- B. Sekundarna

A. Primarna infekcija

Svaka biljka obolela od primarne zaraze ima značajno smanjen prinos, dok sekundarna zaraza uglavnom nema bitniji značaj za proizvodnju suncokreta (Aćimović 1998; Albourie i sar. 1998). Uzročnici pojave primarne infekcije su zaraženo seme suncokreta ili vijabilne oospore gljive u zemljištu tj. zaraženo zemljište. Oospore dospevaju u zemljište sa zaraženim žetvenim ostacima suncokreta (Aćimović 1998). U prisustvu slobodne vode oospora klija i formira se sporangija, koja se diferencira i oslobađa zoospore. Zoospore potom dolaze u kontakt sa tkivom domaćina.

Prvi simptomi bolesti su uočljivi na kotiledonim listićima i prvim pravim listovima. Lišće zaraženih biljaka je deformisano, naborano, zadebljalo, hlorotično ili sa mozaičnim zelenim i hlorotičnim površinama. Na naličju zaraženih listova, oko glavnog nerva i peteljke, obrazuje se gusta bela navlaka sastavljena od micelija konidiofora i konidija gljive koja se kasnije širi duž bočne nervature.

Biljke kearakteriše nizak rast (patuljasti fenotip) i skraćene internodije. Stablo zaraženih biljaka je krto, glave stoje uspravno, sitnije su i manje u odnosu na zdrave. Glave su sterilne ili se na njima se formira veoma malo semena (Jasnić i Maširević 2006). S obzirom na to da je infekcija zahvata i glavu suncokreta, seme će takođe biti zaraženo, čime se stvaraju uslovi za širenjem plamenjače putem semena (Aćimović 1998). Raspadanjem tkiva korena obolelih bijaka oslobađaju se oospore i dospevaju u zemljište (Jasnić i Maširević 2006). Dormantne spore gljive *P. halstedii* mogu ostati vijabilne u zemljištu 8-10 godina, zbog čega je sa zaraženog zemljišta veoma teško iskoreniti bolest (EPPO/CABI 1997).

B. Sekundarna infekcija

Ukoliko su uslovi povoljni, gljiva se razmnožava i aseksualnom sporulacijom (Albourie i sar. 1998). Letnije konidije (zoosporangije) se mogu uočiti kao pege koje su na naličju lista poligonalnog oblika sa karakterističnom belom navlakom, dok se na licu opaža hloroza (Jocić i sar. 2009). Spore oslobađene sa zaraženih biljaka suncokreta izazivaju sekundarnu zarazu. Lokalne lezije na listovima se mogu pojaviti kao posledica infekcije inokulumom koji se prenosi vetrom (Spring i Zipper 2000). Iako po pravilu sekundarna zaraza ne utiče značajno na prinos suncokreta (Aćimović 1998), u povoljnim uslovima ona može postati sistemična.

3.1.6. Mere prevencije i suzbijanja plamenjače

Mere borbe protiv plamenjače se mogu podeliti na agrotehničke, hemijske mere i gajenje otpornih hibrida.

U agrotehničke mere spadaju: korišćenje zdravog semena za setvu koje je tretirano fungicidima protiv plamenjače, poštovanje plodoreda, odnosno izbegavanje gajenja suncokreta 4–5 godina na istoj parceli, uklanjanje samoniklih biljaka sa parcela, setva u optimalnom roku (izbegavanje kasne setve) kao i duboko oranje parcele na kojoj je bio suncokret (Jocić i sar. 2009).

U hemijske mere spadaju tretiranje semena fungicidima i tretiranje biljaka fungicidima u početnim fazama razvoja (do 3-4 para listova). Najefikasnija hemijska mera je nanošenje preparata na bazi metalaksila na seme suncokreta. Na taj način se obezbeđuje zaštita u doba ostvarivanja primarne zaraze, tj. u početnim fazama razvoja suncokreta (Jocić i sar. 2009). Pored metalaksila, postoji niz hemijskih preparata za tretiranje suncokreta nakon nicanja. Ipak, upotreba fungicida u ovoj fazi donosi i dodatne troškove, te se postavlja pitanje ekonomske opravdanosti. Otežavajući faktor je i pojava novih rasa *P. halstedii* otpornih na metalaksil. Rase otporne na metalaksil su se prvo pojavile u Francuskoj, kao posledica intenzivne upotrebe fungicida tokom šest godina (Albourie i sar. 1998; Molinero-Ruiz i sar. 2005; Spring i sar. 2006). Upravo iz ovog razloga, stvaranje hibrida suncokreta otpornih na plamenjaču postaje imperativ u selekciji.

Izvori otpornosti traženi su među divljim vrstama roda *Helianthus*, a ukrštanjem sorte VNIIMK 8931 sa *H. tuberosus* dobijene su prve biljke otporne prema *P. halstedii*. Kao rezultat ovih ukrštanja stvorena je prva sorta otporna na plamenjaču, Progres (Aćimović 1998). Od tada do danas identifikovan je velik broj gena otpornosti i stvoren je veliki broj linija i hibrida otpornih na različite rase prouzrokiivača plamenjače (Tabela 2).

3.2. OTPORNOST SUNCOKRETA NA PLAMENJAČU

3.2.1. Genetska osnova otpornosti suncokreta na plamenjaču

Genetska otpornost suncokreta na plamenjaču može se podeliti u dve kategorije:

A. Kvantitativna otpornost, kontrolisana minor genima (*eng.* quantitative trait loci, QTL),

B. Kvalitativna ili monogenska otpornost, kontrolisana pojedinačnim *Pl* genima.

A. Kvantitativna otpornost (*syn.* opšta, delimična ili horizontalna otpornost)

Kao i kod volovoda (Perez-Vich i sar. 2004), i u slučaju plamenjače uočeno je postojanje otpornosti suncokreta koja je kontrolisana minor genima ili QTL-ovima (Vear i sar. 2008). Biljke koje pokazuju ovaj vid odbrane i dalje mogu biti zaražene patogenom, ali je intenzitet napada bolesti značajno smanjen a simptomi su manje prisutni nego kod osetljivih biljaka (Mauch-Mani 2002).

Rachid Al-Chaarani i sar. (2002) identifikovali su četiri kvantitativna lokusa za otpornost prema plamenjači koji objašnjavaju 54,9% od ukupne fenotipske varijanse. Tri najveća lokusa nađena su na LG1, 9 i 17 (*eng.* linkage group, grupa vezanosti). Prema Vear i sar. (2008) dva najznačajnija lokusa se nalaze na LG10 i LG8, i za njihovo utvrđivanje su predložili mikrosatelitske markere ORS613 i ORS389.

Dugotrajna otpornost mogla bi se postići kombinovanjem kvalitativne otpornosti sa dominantnim *Pl* genima.

B. Kvalitativna otpornost

Do danas je identifikovano 23 *Pl* gena (*Pl₁₋₁₆*, *Pl_v*, *Pl_w*, *Pl_{x-z}*, *M_w*, *M_x* and *Pl_{arg}*), a za 11 je utvrđena lokacija na genetičkoj mapi suncokreta (Tabela 2) (Jocić i sar. 2012). *Pl₁* daje otpornost samo na jednu rasu patogena (Vranceanu i Stoenescu 1970), dok drugi *Pl* geni obezbeđuju otpornost na više rasa (Vranceanu i sar. 1981; Sackston 1990; Miller 1992).

Vranceanu i Stoenescu (1970) prvi su došli do zaključka da otpornost suncokreta na plamenjaču kontrolišu dominantni geni, koje su nazvali *Pl* geni, i predložili da otpornost koju oni daju prati model "gen-za-gen" po hipotezi Flor (1955). Tipičan odnos "gen-za-gen" podrazumeva da za svaki gen koji uslovljava otpornost domaćina postoji specifičan gen patogenosti kod parazita. Smatralo se da su *Pl* geni nezavisni, ali nakon mapiranja *Pl₁*, *Pl₂* i *Pl₆* (Mouzeyar i sar. 1995; Roeckel-Drevet i sar. 1996; Vear i sar. 1997) na LG1 Cartisol RFLP mape (Gentzbittel i sar. 1995), ova teorija je dovedena u pitanje.

Eukariotski organizmi često sadrže genske familije koje nastaju duplikacijom jednog gena. Poznato je da od ukupnog broja gena koji se otkriju tokom sekvenciranja, čak 50% pokazuju veliku sličnost sa prethodno identifikovanim ortolozima i paralogima poznate funkcije (Pierce 2010). Kada su u pitanju geni otpornosti na plamenjaču kod suncokreta, genetičke studije na razdvajajućim populacijama su ukazale na kompleksnost *Pl* lokusa i blisku povezanost pojedinih gena otpornosti. *Pl₁*, *Pl₂*, *Pl₆*, *Pl₇* i *Pl₁₅* su mapirani na LG8 (Bert i sar. 2001; Bouzidi i sar. 2002; Gentzbittel i sar. 1998; Mouzeyar i sar. 1995; Roeckel-Drevet i sar. 1996; Vear i sar. 1997; Radwan i sar. 2008; Slabaugh i sar. 2003; de Romano i sar. 2010); *Pl₅* i *Pl₈* su mapirani na LG13 (Bert i sar. 2001; Radwan i sar. 2004), dok su *Pl_{arg}*, *Pl₁₃*, *Pl₁₄* i *Pl₁₆* mapirani na LG1 (Bachlava i sar. 2011; Dušle i sar. 2004; Mulpuri i sar. 2009; Liu i sar. 2012). Poreklo pojedinačnih gena unutar klastera je različito, a verovatno i njihova struktura (Vear 2010). Na primer, u istom klasteru nalaze se *Pl₆* (iz *H. annuus*) i *Pl₇* (iz *H. praecox*) (Miller i Gulya 1991), i oba gena daju otpornost na rasu 710 ali ne štite od rase 304. Na LG13 se nalazi *Pl₅* (iz *H. tuberosus*) koji je grupisan sa *Pl₈* (iz *H. argophyllus*), s tim da *Pl₈* pruža otpornost prema svim do sada identifikovanim rasama plamenjače, a *Pl₅* je osetljiv na američki izolat rase 330 (Bert i sar. 2001).

Otpornost koja se dobija unošenjem dominantnih gena u linije suncokreta efikasna je do pojave novog virulentnijeg patotipa. U Francuskoj su geni *Pl₁* i *Pl₂*, koji pružaju otpornost prema rasi 100, bili efikasni u suzbijanju plamenjače u periodu od 1978. do 1988., kada dolazi do pojave novih rasa koje prevazilaze te gene. Rase 710 i 703 su se pojavile 1988. i 1989. (Lafon i sar. 2000), a otpornost na te rase daju geni *Pl₆* i *Pl₇*. Ova otpornost je prevaziđena 2000. godine rasom 304 (Tourvieille de Labrouhe i sar. 2000). Tokom osam narednih godina, u Francuskoj je identifikovano još šest novih rasa (307, 314, 334, 704, 707, 714). Godine 2009. rasa 374 je pronađena u SAD, čime je *Pl₆* postao nedovoljan i na ovoj teritoriji (Gulya i sar. 2011). *Pl₈* i *Pl_{arg}* su geni za koje još uvek nisu identifikovane rase koje ih prevazilaze (Gulya 2007; Gulya i sar. 2011). Oba gena su u gajeni suncokret unešena iz vrste *Helianthus agrophyllus*.

3.2.2. Molekularni aspekt otpornosti suncokreta na plamenjaču i reakcija hipersenzitivnosti

Prema Mouzeyar i sar. (1994), postoje dva tipa otpornosti suncokreta na *P. halstedii*:

A. tip I kod kojeg se *P. halstedii* uočava samo na korenu klijanaca;

B. tip II, kod kojeg *P. halstedii* raste kroz hipokotil i blaga sporulacija se može uočiti na kotiledonima. Fenomen koji se zapaža kod otpornosti tipa II, Sackston (1990) naziva infekcijom limitiranom na kotiledonima (*eng.* cotyledon limited infection, CLI), dok je Radwan i sar. nazivaju reakcijom hipersenzitivnosti kod hipokotila (*eng.* hypersensitive response in the hypocotyls, HR).

Mouzeyar i sar. 1993 su pokazali da se pod mikroskopom i u slučaju otpornih i u slučaju neotponih genotipova može uočiti infekcija tokom početnih faza razvoja kotiledona. Međutim, pet dana nakon infekcije korena, kod otpornih genotipova se pojavljuje reakcija hipersenzitivnosti i u većini slučajeva parazit ne uspeva da inficira listove (Mouzeyar i sar., 1993, 1994). Radwan i sar. (2005) pokazuju da je otpornost koja se javlja kod biljaka sa genom *Pl₈* povezana sa mehanizmom hipersenzitivnosti. Zahvaljujući HR, infekcija se zaustavlja u blizini mesta prodiranja micelije, dok kod osetljivih dolazi do kolonizacije korena hipokotila i tkiva kotiledona. Kada je tkivo napadnuto, aktivira se kaskada reakcija i otpočinje niz povezanih intracelularnih procesa - povećava se unos kiseonika u ćeliju, raste produkcija azot monoksida (NO) i nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng.* reactive oxygen species, ROS), dovodeći do "oksidativne eksplozije" (*eng.* oxidative burst). Prema Herbette i sar. (2003), enzim glutation peroksidaza uključen je u reakciju hipersenzitivnosti, dok Radwan i sar. (2005) smatraju da je reakcija hipersenzitivnosti povezana sa aktivacijom gena sličnog *hsr203J*, koji je odgovoran i za hipersenzitivnu reakciju kod duvana. Aktivacija ovog gena je uočena u zaraženim tkivima, naročito kod biljaka kod kojih infekcija nije uzela maha, tj. zaustavljena je na nivou hipokotila.

Reakcija hipersenzitivnosti podrazumeva da u domaćinu postoje geni otpornosti, takozvani „R“ geni, koji omogućavaju biljci da prepozna produkte *Avr*-

gena patogena, pokrene signalnu transdukciju i aktivira odbrambene mehanizme (Hammond-Kosac i Parker 2003, prema Radwan i sar. 2004). Prema njihovim strukturnim osobinama, „R“ geni se mogu svrstati u pet grupa. Najveća grupa gena je ona čije proteinske produkte karakteriše prisustvo leucinom bogatog ponovka, tj. LRR motiva. Gotovo dve trećine R gena kodiraju NBS-LRR proteine, koji se sastoje od terminalnog amino domena, nukleotid vezujućeg domena (NBS), i leucinom bogatog ponovka (LRR). NBS-LRR proteini direktno ili indirektno prepoznaju avirulentni faktor patogena, potom pokreću kaskadu signala i aktiviraju brz odbramben odgovor domaćina koji se često manifestuje kao reakcija hipersenzitivnosti ili programirana ćelijska smrt (Dangl i Jones 2001; Hulbert i sar. 2001). Na osnovu razlike u N-strukturalnom domenu, ovi proteini se dele u dve superfamilije: TIR- i non-TIR-NBS-LRR. Do sada je identifikovano i sekvencirano na stotine NBS-LRR kodirajućih gena, ali kod njihov tačan broj i rasprostranjenost u genomu suncokreta nije poznat (Radwan i sar. 2008). Kako genom suncokreta nije sekvencioniran, jedina dostupna metoda za pronalaženje NBS-LRR kodirajućih gena je uz pomoć degenerativnih prajmera. Zahvaljujući konzerviranosti strukture i sličnosti u sekvenci koja karakteriše ovu grupa gena, moguće je identifikovati kandidat gene za otpornosti (*eng.* resistance gene candidates, RGCs) (Michelmore 2003; Radwan i sar. 2008). Identifikovani RGC služe kao polazna tačka za identifikaciju i izolaciju R gena, koji su od esencijalne važnosti za odbranu organizma od patogena.

Otpornost tipa II je mehanizam za koji se zna da se javlja kod suncokreta sa genima *Pl₅* (Bert i sar. 2001), *Pl₈* (Radwan i sar. 2005) i *Pl₁₄* (Radwan i sar. 2011). Prema Vear i sar. (2003), otpornost tipa II uočena je i kod linije RHA 419, koji je nosilac gena *Pl_{arg}*, a prema Hulke i sar.(2010) isti mehanizam uočen je i kod linije RHA 464, koja takođe ima gen *Pl_{arg}*.

3.3. UPOTREBA MOLEKULARNIH METODA U SELEKCIJI SUNCOKRETA NA BOLESTI

3.3.1. Genetičke mape suncokreta

Genomi svih komercijalno važnih biljaka, pa tako i suncokreta, ispitivani su uz pomoć molekularnih markera. Prednost molekularnih u odnosu na morfološke markere jeste njihova nezavisnost od faktora spoljašnje sredine, čime se smanjuje verovatnoća da će doći do greške prilikom ocenjivanja.

Genetičke mape predstavljaju redosled i lokaciju genetičkih jedinica u okviru jedne grupe vezanih markera. Osnovna informacija za konstruisanje mapa je utvrđivanje procenta rekombinacije između posmatranih markera. Marker mogu biti geni čije se fenotipsko rekombinovanje prati iz generacije u generaciju, klase proteina ili sami DNK fragmenti koji su blisko vezani sa genom čije nasleđivanje i lokacija na hromozomu istražuje (Obreht i sar. 2008).

Prve genetičke mape suncokreta napravljene su upotrebom RFLP (*eng.* restriction fragment length polymorphism) markera. Berry i sar. (1995) konstruisali su RFLP mapu suncokreta uz pomoć 269 RFLP markera, koji su bili mapirani na 20 grupa vezanosti. Za konstrukciju genetičke mape Gentzbittel i sar. (1995) su koristili sedam različitih populacija i pratili su četiri morfološka markera kao i 18 lokusa gena koji su prethodno identifikovani. Njihovo istraživanje pokazalo je da čak 30% markera ima duplikaciju, tj. detektovane su po dve kopije na istoj LG.

Iako su RFLP veoma informativni markeri koji daju ponovljive rezultate visokog kvaliteta, danas se malo koriste jer njihova upotreba uključuje radioaktivno obeležene probe, a metoda zahteva veliku količinu DNK i hibridizaciju DNK sa probama na membranama, zbog čega je procedura veoma zahtevna i dugotrajna. Prelazak na markere koji se baziraju na upotrebi PCR aparata značajno je olakšalo molekularna istraživanja. Danas je dostupan niz "PCR-based" markera, a izbor markera zavisi prevashodno od cilja istraživanja ali i od finansijskih ograničenja (Hu 2010).

Mikrosateliti ili SSR (*eng.* simple sequence repeats) su kratke ponovljive sekvence, koje su ravnomerno i frekventno raspoređene unutar eukariotskih genoma. Sastoje od nizova čija osnovna jedinica ponavljanja sadrži jedan do pet nukleotidnih motiva (Tautz i Renz 1984, prema Agarwal i sar. 2008). Svaki lokus može da obuhvati nekoliko stotina alela koji se razlikuju jedan od drugog prema dužini (tj. broju ponovaka) i/ili sekvenci. Razlike u dužini sekvence posledica su “proklizavanja” polimeraze tokom replikacije, jer priroda repetitivne sekvence omogućava skraćivanje i produžavanje alela dodavanjem odnosno oduzimanjem ponovljivog motiva (Agarwal i sar. 2008). Usled postojanja polimorfizma, u PCR aparatu se umnožavaju fragmenti različitih dužina koji se detektuju na agaroznim i poliakrilamidnim gelovima, kao i uz pomoć kapilarne elektroforeze. Zbog jednostavnosti metode i niske cene, SSR su zamenili RFLP markere u svim oblastima istraživanja, uključujući genotipizaciju, konzervaciju germplazme i zaštitu vrsta, evaluaciju genetske čistoće inbred linija suncokreta u semenskoj proizvodnji, ispitivanje diverziteta vrsta, QTL analize i marker asistiranu selekciju (Hu 2010).

Broj mikrosatelita varira među vrstama i podvrstama. Zbog visoke stope mutabilnosti koja ih karakteriše, oni se ubrajaju u markere sa najvišim nivoom polimorfnosti koji se može izraziti kao PIC vrednost (*eng.* polymorphic information content). Osim visoke stope polimorfnosti i velike zastupljenosti u genomu, prednost mikrosatelita je i njihovo kodominantno nasleđivanje i visoka reproducibilnost, a veoma često su i hromozom specifični. Ne zahtevaju specijalnu opremu što ih čini dostupnim i onim laboratorijama koje nemaju opremu za sofisticirane analize (Paniego i sar. 2002).

Objavljivanje SSR mape suncokreta jedno je od najznačajnijih dostignuća u molekularnoj biologiji suncokreta. Prva SSR mapa (Dehmer i Friedt 1998) konstruisana je na osnovu rezultata mapirajuće populacije koja je ubrajala 94 RIL (*eng.* recombinant inbred line, rekombinantna inbred linija) dobijenih iz ukrštanja dve javne linije, RHA 280 i RHA 801. Danas se za konsenzus mape suncokreta smatraju SSR mape koje su razvili Tang i sar. (2002) i Yu i sar. (2003) (Hahn i Wiechhorst 2010). Genetička mapa Yu i sar. (2003) konstruisana je uz pomoć 2 040 SSR markera svrstanih u 17 grupa, sa prosečnom gustinom od 3,1 cM po

lokusu. Markeri su ujednačeno distriburani po celom genomu. Ova genetička mapa je polazna tačka za mapiranje mnogih agronomski važnih gena.

Sa pojavom novih molekularnih tehnika počeo je razvoj SNP markera (*eng.* single nucleotide polymorphism). SNP marker se baziraju na razlikama u DNK sekvenci na nivou jednog nukleotida, i predstavljaju najučestaliji vid genetske varijacije. Teoretski, SNP markeri bi trebali da imaju četiri alelne varijante, ali praktično iskustvo ukazuje da se uglavnom javljaju svega dva alela. U poređenju sa drugim multialelnim markerima, kao što su npr. RFLP ili SSR, SNP su manje informativni. Međutim, ovaj nedostatak se nadoknađuje time što su znatno frekventniji, tj. karakteriše ih veća gustina (*eng.* marker density) unutar genoma. Kada su u pitanju SNP marker kod suncokreta, primećeno je da se oni javljaju češće nego kod drugih biljnih genoma, kod kojih je 1 SNP uočen na svakih 100 -300 bp (Hu i sar. 2010). Zahvaljujući pre svega „high throughput“ metodama, poslednjih nekoliko godina počeo je razvoj novih SNP mapa suncokreta. Koristeći EST bazu podataka sa preko 67 000 depozitovanih EST sekvenci, Lai i sar. (2005) su *in silico* identifikovali 605 EST sekvenci sa SNP varijacijama. Dizajnirani su prajmeri za 535 lokusa, koji su potom testirani na rekombinantnim linijama dobijenim iz ukrštanja RHA280 × RHA801. Kod 273 lokusa je polimorfizam eksperimentalno potvrđen, i 243 lokusa je mapirano na 17 LG suncokreta. Kolkman i sar. (2007) su resekvenirali alele 81 genetičkog lokusa, i identifikovali 1078 SNP (1/45,7 bp) i 178 INDEL markera (1/277 bp) u 49,4 kbp DNA po gentipu.

SNP markeri se sve više koriste za ispitivanje genetičkog diverziteta asocijativn mapiranje i marker asistiranu selekciju. Razvijeno je više metoda za detekciju polimorfizma na nivou jednog nukleotida, međutim ove tehnologija su uglavnom nedostupne istraživačkim grupama i institucijama sa manjim budžetskim sredstvima (Fusari i sar. 2011). Zahvaljujući postojanju guste genetičke SSR mape, lakoći upotrebe i ekonomskoj isplativosti, SSR markeri su i dalje markeri koji se najviše koriste u primenjenim istraživanjima kod suncokreta, i predstavljaju polaznu tačku prilikom mapiranja gena za agronomski važna svojstva.

3.3.2. Marker asistirana selekcija

Od pojave prve genetičke mape suncokreta (Gentzbitel i sar. 1995), započet je rad na mapiranju gena za agronomski važna svojstva. Genetičke mape pružaju mogućnost da različiti istraživači, koji koriste istu referentnu mapu, mogu da uporede svoje rezultate, što je značajna karakteristika.

Marker asistirana selekcija (MAS) je indirektna selekcija na neko svojstvo, gde se kao merilo koriste molekularni markeri. Markeri mogu biti sami geni, ili pak DNK fragmenti koji su blisko vezani sa genom čija se lokacija istražuje. Pored molekularnih markera koji su vezani za gen od interesa, nove tehnologije omogućile su razvoj takozvanih funkcionalnih markera, koji se dizajniraju za konkretnu sekvencu gena koja je odgovorna za pojavu određenog fenotipa (Andersen i Lubberstedt, 2003). Imajući u vidu da genom suncokreta nije sekvenciran, za ovu biljnu vrstu postoji malo broj funkcionalnih markera i za MAS selekciju se mahom koriste drugi tipovi markera.

Molekularni markeri su u oplemenjivačkim programima našli široku primenu i koriste za:

- izbor roditeljskih komponenti za ukrštanje;
- povećanje efikasnosti povratnih ukrštanja;
- selekciju na osnovu veze marker-svojstvo;
- identifikaciju genotipova sa retkim, važnim svojstvima;
- detekciju gena poreklom iz drugih vrsta;
- zaštitu autorskih prava i dr.

Marker asistirana selekcija se primenjuje u kombinaciji sa konvencionalnim metodama oplemenjivanja. Da bi se markeri koristili u marker asistiranoj selekciji, potrebno je da se ispuni nekoliko preduslova. Prvo, potrebno je da postoje genetičke mape velike gustine, tj. da postoji relativno velik broj markera poznate lokacija na relativno malim intervalima u celom genomu. Zatim, treba definisati gen za koji se pretpostavlja da reguliše osobinu od interesa i testirati statistički odnos između markera i osobine koja se prati. Kada se utvrdi da je marker u

neposrednoj blizini poželjnog gena, moguć je sledeći korak - MAS poželjne osobine (Panković i sar. 2004b).

Markeri se koriste i u povratnim ukrštanjima prvenstveno kao dijagnostička "alatka" kojom se utvrđuje prisustvo određenog alela, a mogu se koristiti i za identifikaciju individua sa najmanjim procentom nepoželjnog genoma (tj. genoma roditelja koji je donor gena otpornosti, ali nema adruge genomske poželjne osobine). Prilikom ukrštanja gajenog suncokreta sa divljim srodnicima, zajedno sa željenim genom/genima, u genom recipijenta unosi se niz neželjenih osobina, tj. gena. Tako će, na primer, prilikom interspecies hibridizacije, pored otpornosti na bolesti potomstvo imati i niz nepoželjnih karakteristika poput bočnog grananja, malog prečnika glave, sitnog semena i dr. Zbog toga je potrebno izvesti povratna ukrštanja F_1 interspecies hibrida sa gajenim suncokretom (Škorić i sar. 2006). S druge strane, prilikom povratnih ukrštanja sa gajenim suncokretom gube se i poželjni geni, te je zbog toga u svakom koraku potrebno analizirati potomstvo (Atlagić i sar. 2003), pri čemu se mogu koristiti molekularni markeri.

3.3.3. Mapiranje *Pl* gena

Otpornost na plamenjaču je jedna od prvih osobina suncokreta koja je mapirana. Vranceanu i Stoenescu (1970) su opisali prvi gen otpornosti na plamenjaču (*Pl₁*), a potom su Mouzeyar i sar. (1995) koristeći se analizom grupnih uzoraka koji se razdvajaju za određeno svojstvo (*eng.* bulked segregant analysis, BSA) (Michelmore 1991) ovaj gen mapirali na LG1 CARTISOL genetičke map (Gentzbittel i sar. 1995). Mouzeyar i sar. (1995) su identifikovali dva polimorfna RFLP markera SUN17 i SUN124 udaljena 5,6 cM i 7,1 cM od gena *Pl₁*. Roeckel-Drevet i sar. (1996) i Vear i sar. (1997) su uz pomoć BSA mapirali *Pl₆* i *Pl₂* na F_2 potomstvu iz ukrštanja H52 x HA335 (*Pl₆*) i GH x PAC2 (*Pl₂*). Oba gena su pokazala vezanost sa istim RFLP markerima kao i *Pl₁*. Vear i sar. (1997) su, izučavajući razdvajanje u F_3 i F_4 generaciji iz ukrštanja HA335 (*Pl₆*) x H52, nakon infekcije sa pet različitih rasa plamenjače (100, 300, 700, 703, 710) došli do zaključka da se lokus *Pl₆* sastoji iz najmanje dva dela, od kojih jedan daje otpornost na rasu 100 i

300, a drugi na rase 700, 703 i 710. Ovo je prvi rezultat koji je pokazao da Pl_6 nije jedan nezavisan gen koji daje otpornost prema velikom broju rasa plamenjače, već kompleksan lokus, tj. grupa gena, od kojih svaki pojedinačan gen daje otpornost na specifičnu rasu plamenjače.

Tražeci markere vezane za Pl_2 , Brahm i sar. (2000) su identifikovali devet RAPD (*eng.* random amplified polymorphic DNA) i dva AFLP (*eng.* amplified fragment length polymorphism) markera. Najbliže markeri OPAA14750, OPAC20831 i E35M48-3 mapirani na udaljenosti od 2 cM od Pl_2 lokusa. Svi markeri su bili u fazi spajanja, a identifikovani su i markeri koji su bili u fazi razdvajanja, te su njihovim kombinovanjem mogle detektovati i heterozigotni genotipovi. Markeri razvijeni za Pl_2 lokus su ujedno bili korisni i za utvrđivanje prisustva gena Pl_6 , jer su ova dva gena deo kompleksnog lokusa (Vear i sar. 1997; Brahm i sar. 2000).

Gentzmittel i sar. (1998) krenuli su sa polazišta kandidat gena (*eng.* resistance gene cadidat, RGC, *syn.* resistance gene analogue, RGA) i kreirali su degenerativne prajmere koristeći konzervirane sekvence NBS domena gena N za otpornost duvana na viruse (Whitham i sar. 1994) i gena $L6$ za otpornost lana na rđu (Lawrence i sar. 1995). Posle kloniranja i sekvenciranja, RGA (NBS-R3), koji pripada TIR-NBS-LRR grupi gena, mapiran je u 3 populacije suncokreta na LG1 CARTISOL mape (Gentzmittel i sar. 1995).

Gedil i sar. (2001) su razvili CAPS (*eng.* cleaved amplified polymorphic site) marker za Ha-4W2 na LG 8, koji je bio vezan ali nije u potpunosti kosegregirao sa genom Pl_1 . Slabaugh i sar. (2003) su potvrdili postojanje multigenske familije HaRGC1 iz klase TIR-NBS-LRR u Pl_1 - Pl_2 - Pl_6 regionu. Region je ispitan uz pomoć IFLP markera (*eng.* intron fragment length polymorphism). Dvadeset i četiri HaRGC1s su mapirana na LG8 u tri različite populacije, a tri SSR markera (ORS166, ORS299, ORS1043) su pronađena da kosegregiraju sa klasterom gena. Bouzidi i sar. (2002) su, koristeći punu sekvencu HA-NBS3, dizajnirali specifične prajmere koji su potom testirali uz pomoć BSA metode. Trineast dominantnih STS (*eng.* sequence tagged site) markera su mapirani na 3 cM oko Pl_6 lokusa. Svih 13 STS markera su pokazali homologiju sa TIR-NBS-LRR subklasom RGA. Panković i sar. (2007) su tri specifična prajmera HAP1, HAP2 i HAP3, koja su razvili Bouzidi i sar. (2002), testirali na NIL populaciji [HA26 S x NIL HA26 R (Pl_6)]. Fragment HAP3/S1

(sličan fragmentu Ha-NBS 12S iz studije Bouzidi i sar. 2002) je jedini koji je uočen i kod otporne i kod osetljive linije. Od ovog RGA su razvijena dva kodominanta CAPS markera, koja su u potpunosti kosegregirala sa *Pl* genom koji daje otpornost na rasu 730.

Druga grupa *Pl* gena identifikovana je na LG13 SSR genetičke mape suncokreta (Yu i sar. 2003). Istraživanje Bert i sar. (2001) na F₂ potomstvu iz ukrštanja XRQ (*Pl*₅) x PSC8 (*Pl*₂) pokazalo je da je *Pl*₅ vezan sa deset AFLP, dva RFLP markera i lokusom za restauraciju fertilitnosti *Rf1*. Dva RFLP markera i *Rf1* gen su prethodno mapirana na LG6 CARTISOL genetičke mape, koja je identična sa LG13 SSR genetičke mape. U test-ukrštanju XRQ (*Pl*₅) x Ha338 (*Pl*₇) razdavanje je ukazalo na postojanje dva nezavisna gena, od kojih svaki daje otpornost na rase 100, 710, 703, dok u ukrštanju XRQ (*Pl*₅) x RHA340 (*Pl*₈) razdavanje nije uočeno. Razlog ovome može biti bliska vezanost gena *Pl*₅ i *Pl*₈. Radwan i sar. (2003) potvrdili su lokaciju gena *Pl*₅ na LG6 RFLP mapi Gentzbittela i sar. (1995), na kojoj je mapiran i gen *Pl*₈. Ipak, *Pl*₅ i *Pl*₈ nisu identični već pojedinačni dominantni geni koji pružaju otpornost prema različitim rasama (Bert i sar. 2001).

Tabela 2. Uporedni pregled rasa plamenjače, izvora gena otpornosti i njihove pozicije (Jocić i sar. 2012).

Rase <i>Plasmopara halstedii</i>																	Izvor otpornosti	Gen	Pozicija gena		Literaturni izvor	
100	300	304	310	314	330 USA	330 ESP	334	700	703	704	710	714	717	730	733	734	770			RFLP mapa	SSR mapa	
R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	RHA-266, RHA-265	<i>Pl₁</i>	LG 1	LG 8	Zimmer i Fick 1974; Gedil i sar. 2001; Bertero de Romano i sar. 2010
R	R	R	?	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	RHA-274	<i>Pl₂</i>	LG 1	LG 8	Zimmer i Fick 1974; Bertero de Romano i sar. 2010
R	R	R	?	R	R	R	?	S	S	S	S	S	S	S	?	?	S	HIR-34	<i>Pl₄</i>	?	?	Sackston 1990
R	R	R	?	R	S	R	?	R	R	R	R	R	?	?	?	?	?	XRQ YSQ	<i>Pl₅</i>	LG 6	LG13	Bert i sar. 2001; Radwan i sar. 2004
R	R	S	?	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	HA-335, HA-336	<i>Pl₆</i>	LG 1	LG 8	Miller i Gulya 1991; Bouzidi i sar. 2002; Vear i sar. 2003; Panković i sar. 2007
R	R	S	?	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	HA-337, HA-338	<i>Pl₇</i>	LG 1	LG8	Miller i Gulya 1991; Bert i sar. 2001;
R	R	R	?	R	R	R	?	R	R	S	R	S	?	R	?	?	?	83RM	<i>Pl₇₊</i>	?	?	Sackston 1990
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	RHA-340	<i>Pl₈</i>	LG 6	LG 13	Miller i Gulya 1991; Radwan i sar. 2004; Bachalava i sar. 2011
R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	RHA-274	<i>Pl₉</i>	?	?	Sackston 1990; Molinero-Ruiz i sar. 2003
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	HA-R5	<i>Pl₁₃</i>	?	LG 1	Mulpuri i sar. 2009; Bertero de Romano i sar. 2010
R	R	?	R	?	R	?	?	R	S	?	R	?	?	R	?	?	R	29004	<i>Pl₁₄</i>	?	LG 1	Bachalava i sar. 2011
R	R	R	?	?	R	R	?	R	R	?	R	R	?	R	?	R	R	RNID	<i>Pl₁₅</i>	?	LG 8	Bertero de Romano i sar. 2010
R	R	R	?	R	R	S	?	R	R	R	R	R	R	R	?	?	S	DM4	<i>Pl_v</i>	?	?	Molinero-Ruiz i sar. 2003
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	RHA-419	<i>Pl_{arg}</i>	?	LG 1	Dussle i sar. 2004; Wieckhorst i sar. 2010; Imerovski i sar. 2011
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	HA-R4	<i>Pl_{HA-R4}</i>	?	LG 1	Liu i sar. 2010
R	R	R	?	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	PM-17	<i>Pl?</i>	?	?	Vear 2010
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	803-1	<i>Pl?</i>	?	?	Vear 2010
R	R	R	?	R	R	R	?	R	R	R	R	R	?	R	?	?	R	QPR1	<i>Pl?</i>	?	?	Vear 2010
R	R	R	?	R	R	R	?	R	S	R	R	R	R	S	R	?	?	QHP-1	<i>Pl?</i>	?	?	Vear 2010
R	R	R	?	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	?	?	?	PMI-3	<i>Pl?</i>	?	?	Vear 2010

R - otporan; S - osetljiv; LG – grupa vezanosti na genetičkoj mapi; ? – nepoznato;

Nedavno su i na LG1 mapirani *Pl* geni. Mulpuri i sar. (2009) su mapirali *Pl*₁₃ u F₂ populaciji dobijenoj iz ukrštanja otporne linije HA-R5 sa osetljivom linijom HA 821. Uz pomoć BSA metode identifikovano je 213 polimorfnih prajmera koji su se razlikovali između smeše otpornih i smeše osetljivih uzoraka. Šest markera sa LG1 (ORS 965-1, ORS965-2, ORS959, ORS371, ORS605, ORS716) je bilo povezano sa otpornim fenotipom. ORS965 pokazao se kao marker sa LG1 najbliže vezan za *Pl*₁₃. Bachlava i sar. (2011) su u liniji HA-R4 mapirali gen *Pl*₁₄ u distalnom regionu LG1, dok su Liu i sar. (2012) u istoj liniji identifikovali gen *Pl*₁₆, i mapirali ga u donjem delu LG1 na SSR mapi suncokreta. Kolokacija markera HT636 sa genom *Pl*₁₃ i sa *Pl*₁₆ kao i sa RGC-ovima iz tog regiona, ukazuje na mogućnost da ova dva gena pripadaju klasteru RGC (Liu i sar. 2012).

3.3.4. Gen *Pl*_{arg}

*Pl*_{arg} je poreklom iz divljeg srodnika suncokreta *H. argophyllus*, akcesija 1575 (PI 468651). Ukrštanjem divljeg suncokreta sa linijom cmsHA89 dobijena je linija ARG1575-2 (Seiler i sar. 1991), iz koje su potom razvijene druge otporne linije uključujući RHA 419, RHA 464 i RHA 443.



Slika 3. Izvor gena otpornosti, *H. argophyllus* iz kolekcije Instiuta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad (fotografija S. Terzić)

Gen unešen iz *H. argophyllus* nezavisan je od drugih *Pl* gena i genskih klastera. Miller i sar. (2002) prijavljuju da je otpornost u liniji RHA 419 monogenska i da se nasleđuje dominantno, i štiti od prevalentnih rasa *P.halstedii* u Americi. Vear i sar. (2003) su ispitivali razdvajanje u potomstvu koja su dobijane u ukrštanjima linije RHA 419 (*Pl_{arg}*) sa linijama HA 335 (*Pl₆*), HA 338 (*Pl₇*), RHA 340 (*Pl₈*), YDQ (*Pl₆*), XRQ (*Pl₅*), kao i potomstva iz ukrštanja linije RHA 419 (*Pl_{arg}*) sa osetljivom linijom. Ova studija pokazala je da RHA 419 ima nov gen ili genski klaster koji je nezavisan od genetskih faktora identifikovanih na LG8 i LG13.

Molekularna ispitivanja potvrdila su da se *Pl_{arg}* nalazi na drugoj LG od ostalih *Pl* gena. Dušle i sar. (2004) mapirali su ovaj gen otpornosti na LG1 koristeći populaciju koju je činilo 126 F₂ individa iz ukrštanja cmsHA342 x Arg1575-2 (*Pl_{arg}*). Identifikovano je dvanaest blisko vezanih SSR markera u okružujućoj regiji gena *Pl_{arg}*.

Wieckhorst i sar. (2010) su potvrdili poziciju gena *Pl_{arg}* na LG1 i saturisali region blisko vezanim markerima ORS509, HT244 i HT446. Identifikovani su i dodatni kosegregirajući SSR i SNP markeri (ORS716, HT211 i HT722), kao i tri kosegregirajuća kandidat gena iz klase NBS-LRR. Utvrđeno je da se *Pl_{arg}* nalazi u gornjem delu LG1 (Dušle i sar. 2004; Wieckhorst i sar. 2010), za razliku od gena *Pl₁₃* i *Pl₁₄* koji su mapirani u donjem delu LG1 (Mulpuri i sar. 2009).

Istraživanja Dušle i sar. (2004) i Wieckhorst i sar. (2010) postavila su osnove za dalja molekularna istraživanja, utvrđivanje veze markera i gena u različitim linijama kao i upotrebu markera za MAS.

4. RADNA HIPOTEZA

Polazeći od činjenice da je gen otpornosti za koji se traži blisko vezani molekularni marker poreklom iz divljeg srodinka (*H. argophyllus*), očekuje se da će region LG1 gde je gen lociran biti visoko polimorfan na molekularnom nivou, te da će taj polimorfizam uspešno moći da se detektuje uz pomoć SSR markera. Polazi se od pretpostavke da će saturacijom ovog segmenta genetičke mape suncokreta SSR markerima biti moguće identifikovati markere koji su u neposrednoj blizini gena otpornosti i kosegregiraju sa njim. Pošto će se u istraživanju koristiti mikrosatelitski markeri koji su po svojoj prirodi kodominantni, očekuje se da će markeri moći da razlikuju homozigotno otporne genotipove od heterozigotnih. Pored toga, pretpostavlja se da će razvijeni marker moći da se koristi za genotipizaciju na agarozu. Nadalje, polazi se od hipoteze da će markeri biti stabilni u različitim ukrštanjima (tj. u različitim genotipovima suncokreta), i da će moći da se koriste za marker asistiranu selekciju.

5. MATERIJAL I METOD RADA

5.1. BILJNI MATERIJAL

5.1.1. Materijal korišćen za mapirajuću populaciju

Kao roditeljske komponente za razvoj mapirajuće populacije korišćene su inbred linije RHA 419 i RHA-N-49.

RHA 419 je linija u F_6 generaciji koja je dobijena pedigre metodom od F_4 potomstva iz ukrštanja RHA 373/ARG 1575-2. Ova linija je homozigotno otporna na rase plamenjače 300, 700, 730 i 770 (Miller i sar. 2002), kao i na sve poznate rase plamenjače.

Linija RHA-N-49 je stabilna inbred linija restorer tipa, stvoren na Institutu za ratartvo i povrtarstvo, Novi Sad. RHA-N-49 je dobijena iz ukrštanja RHA-ANN-65 x RHA-SEL. Odlikuje se dobrim kombinacionim sposobnostima za prinos semena i sadržaj ulja, ali je osetljiva na sve rase plamenjače (Tabela 3).

5.1.2. Materijal za validaciju markera

Pored linije RHA 419, u ispitivanje su bila uključene dodatne 22 linije sa genom Pl_{arg} - RHA 443 i RHA 464 (poreklom iz USDA, Fargo, Severna Dakota), kao i dvadeset inbred linija, RH 1-20, stvorenih na Institutu za ratarstvo i povrtarstvo. Kako bi se utvrdilo da li postoji veza između markera vezanih za Pl_{arg} i drugih gena sa LG1, za testiranje markera su korišćene i linije HA-R4 (Pl_{14} i Pl_{16}) i HA-R5 (Pl_{13}) (Tabela 3).

RHA 443 je $F_{6:7}$ restorer sa genom Pl_{arg} tolerantan na herbicide iz grupe imidazolin, dobijen iz ukrštanja RHA426/RHA419//RHA377/AS4379 (Miller i sar. 2006).

RHA 464 je $F_{6.7}$ restorer nastao pedigre metodom iz ukrštanja RHA418/RHA 419/3/RHA 801//RHA 365/PI 413047 (Hulke i sar. 2010).

Linije RH 1-20 su F_{14} restoreri otporni na plamenjaču, koji su dobijeni klasičnom selekcijom pomoću pedigre metoda iz ukrštanja RHA 419/RHA 583.

Tabela 3. Poreklo i namena linija otpornih na plamenjaču

Linija	Pl geni	Namena	Reference
RHA 419	<i>Pl_{arg}</i>	Otporan roditelj u mapirajućoj populaciji	Miller i sar. 2002
RHA 443	<i>Pl_{arg}</i>	Validacija markera	Miller i sar. 2006
RHA 464	<i>Pl_{arg}</i>	Validacija markera	Hulke i sar. 2010
RH 1-20	<i>Pl_{arg}</i>	Validacija markera	NS genotipovi
HA-R4	<i>Pl₁₄, Pl₁₆</i>	Validacija markera	Gulya 1985
HA-R5	<i>Pl₁₃</i>	Validacija markera	Gulya 1985

HA-R4 vodi poreklo od argentinske linije Saenz Pena 74-1-2, koja ima složen pedigre i nastala je od ruskih i rumunskih sorti kao i divljih jednogodišnjih i višegodišnjih vrsta suncokreta uključujući *H. petiolaris*, *H. angustifolius* i *H. maximiliani*. Otporna je na rase plamenjače koje prevazilaze *Pl₆* gen (Gulya i sar. 2011; Liu i sar. 2012). Bachlava i sar. (2011) su na liniji HA-R4 mapirali *Pl₁₄*, a Liu i sar. (2012) gen *Pl₁₆*.

HA-R5 je linija razvijena iz argentinske sorte Guaiacan iz INTA. Ova linija je otporna na rase plamenjače 100, 300, 310, 330, 700, 710, 730, 770, ali je osetljiva na rase 731, 307 i 703. Koristi se kao diferencijalna linija za određivanje rasnog sastava plamenjače u SAD (Gulya i sar. 1998.). Ova linija je nosilac gena *Pl₁₃* (Mulpuri i sar. 2009).

5.1.3. Materijal za povratna ukrštanja

Devetnaest elitnih komercijalnih inbred linija suncokreta različitih osobina, namena i porekla izabrano je iz kolekcije Odeljenja za uljane kulture, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad radi konverzije u formu otpornu na plamenjaču sa genom Pl_{arg} .

Tabela 4. Osnovne karakteristike odabranih inbred linija suncokreta osetljivih na plamenjaču u koje je unošten gen otpornosti Pl_{arg}

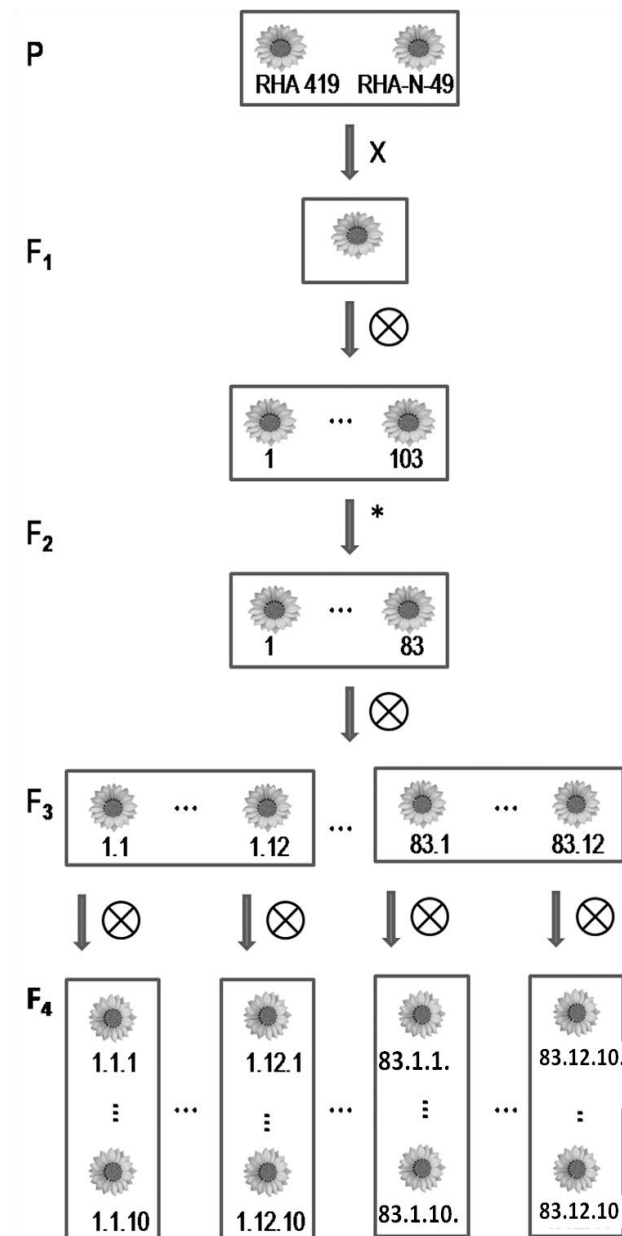
Linija	Karakteristike
1. RHA-N-49	Restorer linija otporna na rasu E volovoda.
2. PC-GR-252	Restorer linija otporna na rasu E volovoda.
3. RHA-UK	Restorer linija otporna na rasu E volovoda.
4. RHA-M-72	Restorer linija.
5. RHA-ANN-65	Ultra rana restorer linija.
6. RHA-ŠP	Restorer linija otporna na rasu E volovoda.
7. SU-RF-49	Restorer linija otporna na rasu E volovoda, tolerantna na tribenuron metil.
8. SU-RF-252	Restorer linija otporna na rasu E volovoda, tolerantna na tribenuron metil
9. Ha-26-OR	Linija majke (B analog) otporna na rasu E volovoda
10. BT-VL-17	Linija majke (B analog) otporna na plamenjaču (poseduje gen Pl_6).
11. HA-26-OL-SOL	Linija majke (B analog) otporna na plamenjaču (poseduje gen Pl_6), ima visok sadržaj oleinske kiseline u ulju (>80%).
12. NIMI-RF-27	Visokooleinska restorer linija otporna na imidazoline.
13. NIMI-RF-UK	Restorer linija tolerantna na imidazoline, otporna na rasu E volovoda
14. NIMI-RF-65	Ultra rana restorer linija tolerantna na herbicide iz grupe imidazolinona
15. NIMI-RF-SES	Ultra kasna restorer linija tolerantna na herbicide iz grupe

	imidazolinona
16. NIMI-RF-72	Rana restorer linija tolerantna na herbicide iz grupe imidazolinona
17. NIMI-RF-168	Restorer linija tolerantna na herbicide iz grupe imidazolinona
18. NIMI-RF-49	Restorer linija tolerantna na herbicide iz grupe imidazolinona
19. NIMI-RF-92	Restorer linija tolerantna na herbicide iz grupe imidazolinona

Svaka pojedinačna linija se odlikuje umerenim agronomski značajnim osobinama (Tabela 4), a sve ih karakterišu dobre opšte i posebne kombinacione sposobnosti za prinos semena i ulje, visoka tolerantnost na biotički stres, tj. na bolesti kao što su crna pegavost koju prouzrokuje *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc., mrka pegavosti lista i stabla koju prouzrokuje *Alternaria zinniae* Pape), mrkocrna pegavost koju prouzrokuje *Alternaria leucanthemi* Tub. et Nish., crna trulež stabla koju prouzrokuje *Phytophthora drechsleri* Tucker i bela trulež koju prouzrokuje *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary.

5.2. RAZVOJ MAPIRAJUĆE POPULACIJE

Mapirajuća populacija dobijena je ukrštanjem inbred linija RHA 419 i RHA-N-49 (Slika 4). Od ukupno 103 biljke iz F₂ populacije, 83 biljke su proizvele dovoljnu količinu semena za razvoj F₃ i F₄.



Legenda: x = ukrštanje; ⊗ = samooplodnja; * = broj F₂ biljaka koje su dale dovoljno semena za razvoj F₃ i F₄ familija

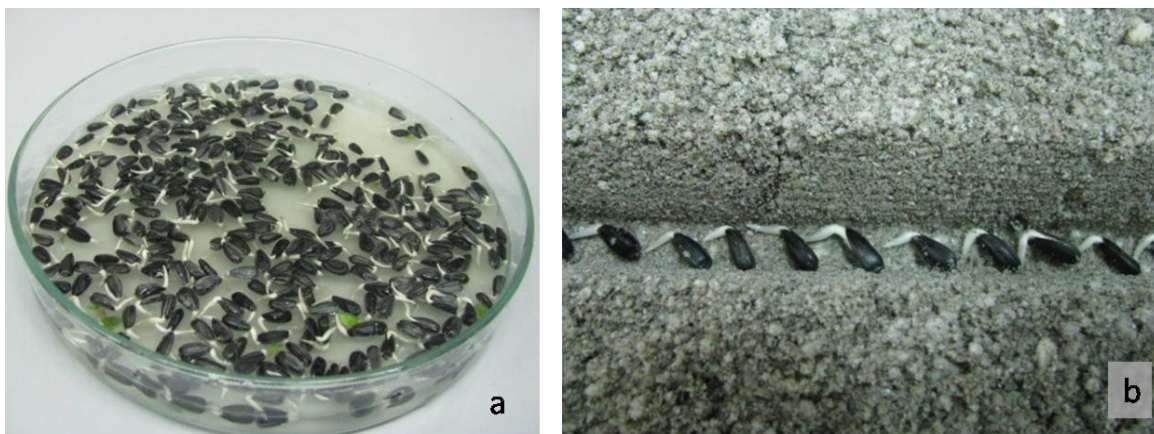
Slika 4. Razvoj mapirajuće populacije

Pojedinačna biljka inbred linije RHA-N-49 koja je korišćena kao majčinska komponenta je u početnom ukrštanju ručno emaskulirana u ranim jutarnjim časovima, pre otvaranja antera. Na nju je nanešen polen sa samooplodne linije RHA 419. Dobijeni F_1 hibrid je stavljen u uslove samooplodnje, radi dobijanja F_2 generacije. Daljom samooplodnjom i primenom pedigree metoda selekcije ("glava na red") dobijeno je 83 familije u F_3 i F_4 generaciji, koje su potom korišćene za fitopatološku ocenu. Za svaku F_2 biljku, testirano je između 5 i 10 F_4 familija, svaka od po 30 biljaka. Ukupno je testirano 9960 pojedinačnih F_4 biljaka, na osnovu čijeg fenotipa je determinisan genotip F_2 biljaka.

5.3. FITOPATOLOŠKA OCENA

Za fenotipsku ocenu otpornosti na plamenjaču je korišćen laboratorijski test prema Rahim i sar. (2002). Linije sa genom Pl_{arg} (RHA 419, RHA 443 i RHA 464) i osetljivi roditelj iz mapirajuće populacije (RHA-N-49) testirane su sa dve rase plamenjače: rasom 730 i smešom rasa koja prevazilazi gen Pl_6 .

F_4 potomstvo iz ukrštanja RHA 419 x RHA-N-49 testirano je rasom 730. Klijanci sa vidljivim korenskim dlačicama su inokulisani u suspenziji zoosporangija *P. Halstedii* (Slika 5). Nakon toga, biljke su gajene u klima komori 8-14 dana u mešavini peska i perlita (3:2 v/v), pod kontrolisanim uslovima na temperaturi od $18 \pm 2^\circ\text{C}$. U plitkim plastičnim posudama sejana su četiri reda, od kojih je u jednom redu bila na plamenjaču osetljiva kontrola L1. Inbred linija L1 se odlikuje odsustvom bilo kojih gena otpornosti na plamenjaču. Posle pojave prvog para listova, posude su prekrivane providnim plastičnim poklopcem kako bi se u periodu od 48h očuvala visoka relativna vlažnost vazduha i time podstakla sporulacija.



Slika 5. Klijanje u suspenziji spora (a) i u mešavini perlita i peska (b)

Imajući u vidu da literaturni podaci ukazuju na mogućnost neuspele infekcije kao i pojave otpornosti tipa II kod linija sa genom *Pl_{arg}* (Vear i sar. 2003), fitopatološka ocena rađena je na F₄ familijama koje su razvijene od odgovarajućih F₂ biljaka. Kada je sporulacija bila jasno vidljiva na kotiledonima i prvom paru listova, biljka je bila ocenjena kao osetljiva, dok su biljke bez znakova sporulacije ili sa sporulacijom slabog intenziteta ocenjene kao otporne. Biljke sa sumnjivim fenotipom su ponovo testirane i ocenjene.

Odnosi razdvajanja uočeni prilikom fenotipskog ocenjivanja su testirani χ^2 testom, pod pretpostavkom da je odnos razdvajanja kod F₄ familija u slučaju dominantnog svojstva 1:2:1.

5.4. EKSTRAKCIJA GENOMSKE DNK

Grupni uzorak uzet je od 10 F₁ biljaka, a pojedinačni uzorci lista su uzeti od 103 F₂ biljke i čuvani su na -70°C do izolacije DNK. Ekstrakcija DNK urađena je po modifikovanoj CTAB metodi (Permingeat i sar. 1998). Približno 700 µg lista usitnjeno je u tečnom azotu. Usitnjeno tkivo lista pomešano je sa 1ml CTAB ekstrakcionog pufera (500 mmol/L Tris pH7.5; 200 mM EDTA; 3 M NaCl; CTAB 1%; glukoza) i inkubirano na 60°C u trajanju od 60 minuta, uz povremeno mešanje. Nakon što je dodato 700 µl hloroforma, smeša je mešana do stvaranja emulzije i centrifugirana 30 min na 10000 rpm. Supernatant je prenet u nove epruvete,

dodato je 560 μl hladnog izopropanola, a potom je sadržaj epruveta mešan inverzijom 1-2 min na sobnoj temperaturi. Nakon precipitacije od 30 min na -20°C , epruvete su centrifugirane na 10000 rpm tokom 30 min. Supernatant je potom odliven, talog je rastvoren u 200 μl TE pufera, a potom je DNK precipitirana sa 20 μl 3 M natrijum acetata i 400 μl ledenog etanola. Nakon precipitacije od 45 min na -20°C , DNK je centrifugirana 20 min na 10000 rpm, a potom je odliven supernatant. Talog je prosušen na sobnoj temperaturi 15 min i rastvoren u 120 μl TE pufera (10 mM Tris; 0.1 mM EDTA pH 8.0).

Čistoća izolovane DNK utvrđen je spektrofotometrijski iz odnosa A260/280 dok je koncentracija DNK izračunata na osnovu A260. DNK svih uzoraka razblažena je do radne koncentracije od 10 ng/ μl .

5.5. USLOVI PCR REAKCIJE

Genomska DNK amplifikovana je u PCR aparatu pomoću izabranih mikrosatelita. PCR reakcija prikazana je u Tabeli 5.

Tabela 5. Komponente PCR smeše

Komponente	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Zapremina jedne reakcije
Pufer	10x	1x	1,5 μl
dNTPs	10 mM	0,2 μM	0,30 μl
MgCl ₂	25 mM	3 mM	1,8 μl
Prajmer (f+r)	10 pmol/ μl	0,3 μM	0,45 μl
Taq polimeraza	5 U/ μl	1,5 U	0,15 μl
BSA	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2,5 μg	0,75 μl
DNK	20 ng/ μl	40 ng	2 μl
Voda	-	-	8,05 μl
			= 15 μl

Za preliminarno istraživanje korišćen je "touchdown" program kao kod Dimitrijević i sar. (2010), dok je za dalje istraživanja korišćen program prikazan u Tabeli 6. Pre mapiranja gena, uslovi PCR programa optimizovani su tako što su varirane temperature vezivanja prajmera i testirane su polimeraze različite preciznosti. Optimalni uslovi reakcije, odabrani na osnovu veličine i jasnoće traka na elektroforegramu kao i odsustva nespecifičnih fragmenata, prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. PCR program

Korak	Temperatura	Trajanje (min)	Broj ciklusa
1. Početna denaturacija	95 °C	2	1
2. Denaturacija	95 °C	0,30	1
3. Vezivanje	63 °C	0,30	1
4. Elongacija	72 °C	1	1
5. Ponovi korake 2-4			29
6. Finalna elongacija	72 °C	10	1

PCR produkti su razdvojeni na 3% agaroznim gelovima, a kao pufer je korišćen 1xTBE. Gelovi su obojeni etidijum bromidom koncentracije 10 mg/ml i fragmenti su vizualizovani uz pomoć kamere BIO-Print system (Vilber Lourmat, Marne la Veele, France). Veličina fragmenata ocenjena je pomoću programa BIO-CAPT V.97 (Vilber Lourmat).

5.6. MOLEKULARNE ANALIZE POLULACIJE RHA 419 x RHA-N-49

Na osnovu literaturnih podataka izabrano je dvanaest SSR markera sa LG1 genetičke mape suncokreta koji okružuju gen *Plarg* (Dušle i sar. 2004; Wieckhorst i sar. 2010) (Tabela 7). Izabrani markeri su preliminarno testirani na roditeljskim linijama (RHA 419 i RHA-N-49), grupnom F₁ uzorku i pet nasumično izabranih F₂

uzorka. Na osnovu tih rezultata, markeri ORS543, ORS662, ORS716 i ORS675 su izabrani za dalju analizu mapirajuće populacije.

Tabela 7. Sekvence SSR markera korišćenih u preliminarnom istraživanju

Marker	Sekvence forward prajmera (5'-3')	Sekvence reverse prajmera (5'-3')
ORS1128	GGCGATAATAGATGGGACACTC	TCTGTGCCATACCACTTTATTCG
ORS509	CAACGAAAAGACAGAATCGAAA	CCGGGAATTTTACAAGGTGA
ORS710	TGGAAAGTGAATGGTGATATGG	CCCACAACCACAACCTACAA
ORS371	CACACCACCAAACATCAACC	GGTGCCTTCTCTTCCTTGTG
ORS675	CGGCTAAGAGAAAGGGAGAGA	CGTCGCTGAACCAACAGTTAT
ORS610	AGGAAGCGAAACGAGGAAGT	TTGTGACCTTCTCCCTGCTC
ORS543	CCAAGTTTCAGTTACAATCCATGA	GGTCATTAGGAGTTTGGGATCA
ORS1039	AGAAATGCTCTTTGAGGAGATG	TGTCAACTTCCTTTCTTCATCTTT
ORS1182	TCTTCTGATTGTAAGCGGTGTTT	TGTCATGTTCTCTACCGAGCTTT
ORS662	CCTTTACAAACGAAGCACAATTC	CGGGTTGGATATGGAGTCAA
ORS053	GCTGGCAATTTCTGATACACGAT	CATCTAGACAACGACAGAAGATG
ORS716	CCCCACAACCCATAGCCTAA	GAACCTAACCGCCATCCAAGA

Marker ORS543, koji je lociran u proksimalnom regionu LG1 (Yu i sar. 2003), odabran je zato što je pokazao jasan polimorfizam između testiranih uzoraka. Markeri ORS662 i ORS716 su u preliminarnom skriningu bili polimorfni između ispitivanih uzoraka, a u istraživanjima Dušle i sar. (2004) i Wieckhorst i sar. (2010) su se pokazali kao markeri najbliže vezani za gen od interesa. ORS675 je marker koji nije korišćen u istraživanjima drugih autora, ali se u preliminarnom istraživanju pokazao kao polimorfan između ispitivanih uzoraka. Ovaj marker je na referentnoj genetičkoj mapi suncokreta mapiran u istom lokusu sa ORS662 i ORS716, te je izabran jer se pošlo od pretpostavke da se nalazi u neposrednoj blizini gena *Plarg*.

5.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA MAPIRAJUĆE POPULACIJE

Za sve testirane lokuse urađen je χ^2 test, kako bi se utvrdilo odstupanje od teorijski očekivanog razdvajanja za kodominantne (1:2:1) i dominantne (3:1) markere.

Genetička mapa je konstruisana za F_2 populaciju iz ukrštanja RHA 419 x RHA-N-49 uz pomoć programa Joinmap Version 4.1 (Van Ooijen 2006) sa LOD vrednošću od 4.0. Za prevođenje frekvencije rekombinacija između markera u udaljenost na mapi korišćena je mapirajuća funkcija Kosambi (1944).

Polimorfnost svakog prajmera procenjena je na osnovu PIC vrednosti (Smith i sar. 1997). Na osnovu molekularnih profila 44 linije suncokreta, napravljena je binarna matrica gde je sa "0" ocenjeno odsustvo a sa "1" prisustvo alelne forme svakog od markera. Uz pomoć UPGMA metode (*eng.* un-weighted pair group arithmetic mean method) napravljen je klaster u programu STATISTICA 10 (StatSoft, 2011).

5.8. POTVRDA MARKERA

Kako bi se potvrdila veza između markera i gena, kosegregirajući markeri ORS662, ORS716 i ORS675 testirani su na linijama RHA 443, RHA 464 i RH 1-20 koje imaju gen Pl_{arg} ali imaju različite genetske osnove (*eng.* genetic background).

Pored različitih otpornih linija sa genom Pl_{arg} , u istraživanje su bile uključene i linije HA-R4 i HA-R5, koje prema literaturnim podacima (Mulpuri i sar. 2009; Bachlava i sar. 2011; Liu i sar. 2011) na LG1 imaju druge Pl gene (Pl_{14} odnosno Pl_{13}).

5.9. MARKER-ASISTIRANO POV RATNO UKRŠTANJE

Gen otpornosti *Pl_{arg}* unošen je u devetnaest elitnih komercijalnih inbred linija suncokreta Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Pre ukrštanja, sve linije su testirane markerima ORS662, ORS716 i ORS662 kako bi se utvrdili njihovi haplotipovi.

Kao izvori otpornosti gena *Pl_{arg}* korišćene su linije RHA 419 i RHA 443. Linija RHA 419 je ukrštena sa linijama RHA-N-49, PC-GR-252, RHA-UK, RHA-M-72, RHA-ANN-65, RHA-ŠP, SU-RF-49, SU-RF-252, HA-26-OR, BT-VL-17 i HA-26-OL-SOL. Linija RHA 443 je ukrštena sa NIMI-RF-27, NIMI-RF-UK, NIMI-RF-65, NIMI-RF-SES, NIMI-RF-72, NIMI-RF-168, NIMI-RF-49 i NIMI-RF-92.

Svaka BC populacija sastojala se od 24 biljke, kako je opisano u Jocić (2002). Prilikom ukrštanja, potomstvo je testirano jednim od dva kodminantna markera (ORS716 ili ORS662). S obzirom na to da ova dva markera pripadaju istom lokusu i daju istu ocenu otpornosti, izbor markera za konkretno ukrštanje zavisio je od razlike u dužini alela otpornog i neotpornog roditelja. Radi lakšeg i preciznijeg očitavanja, biran je onaj marker kod kojeg je alelna razlika između otpornog i neotpornog genotipa bila veća i samim tim lakše uočljiva.

Sve biljke iz povratnog ukrštanja ocenjene su odgovarajućim markerom, a otporno potomstvo je korišćeno za dalja povratna ukrštanja.

6. REZULTATI

6.1. FITOPATOLOŠKA OCENA

Laboratorijskim testom je ocenjena je otpornost linija RHA 419, RHA 443, RHA 464 i RHA-N-49 na rasu patogena 730 kao i na smešu rasa koja prevazilazi gen *Pl₆*. Linija RHA-N-49, koja je korišćena kao osetljivi roditelj u mapirajućoj populaciji, pokazala se kao 100% osetljiva i na rasu 730 i na smešu rasa patogena. Na kotiledonim listovima i prvom pravom paru listova uočena je sporulacija i klijanci su se slabije razvijali (Slika 6a). Kod linije RHA 419, koja je bila donor otpornosti u mapirajućoj populaciji, kao i kod linija RHA 443 i RHA 464, sporulacija nije uočena, tj. ovi genotipovi su bili 100% otporni na rasu 730 kao i na smešu rasa prouzrokičača plamenjače (Slika 6b).



Slika 6. Izgled obolelog kotiledona sa uočljivom sporulacijom (a) i zdravog kotiledona suncokreta (b)

Od ukupno 83 testirane F_4 familije, koje su razvijene od odgovarajućih F_2 biljaka iz ukrštanja RHA 419 x RHA-N-49, 20 je bilo homozigotno otpornih, kod 39 familija je uočeno razdavajanje na osetljive i otporne tj. bile su heterozigotne, a 24

su bile homozigotno osetljive. Rezultat χ^2 testa je pokazao da je odnos razdvajanje homozigotno otpornih, heterozigotno otpornih i homozigotno osetljivih F_4 familija bio 1:2:1 ($\chi^2 = 0.71$; $P=0.70$), što odgovara dominantnom modelu nasleđivanja monogenskog svojstva (Hadživuković 1973).

Otpornost tipa II, koju karakteriše prisustvo atipične sporulacije niskog intenziteta koja ne prelazi u sistemičnu infekciju (Mouzeyar i sar. 1994) nije uočena kod otpornog roditelja RHA 419, kao ni kod linija RHA 443 i RHA 464. Kod manjeg broja testiranih biljaka u fitopatološkom testu je primećeno prisustvo slabe sporulacije koja nije uticala na razvoj kotiledona. Takve biljke su ponovo testirane i pokazale su se kao otporne. Otpornost tipa II kao generalni mehanizam odbrane otpornih biljaka sa genom Pl_{arg} nije uočena.

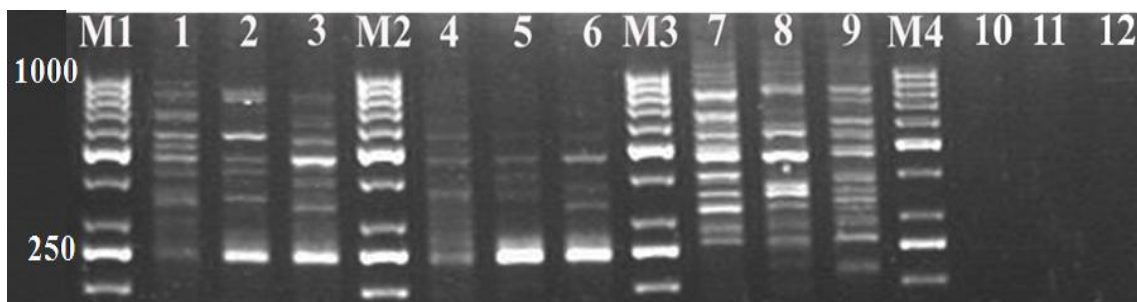
6.2. PRELIMINARNO MOLEKULARNO ISTRAŽIVANJE

6.2.1. Optimizacija PCR uslova

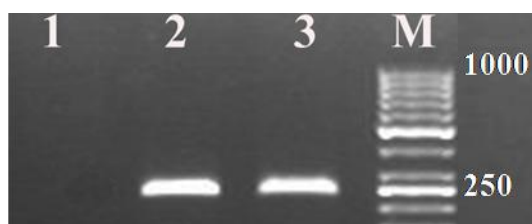
Dvanaest prajmera je testirano u preliminarnom istraživanju na "touchdown" PCR programu prema Dimitrijević i sar. (2010). Kod prajmera ORS675 i ORS662 neophodno je bilo optimizovati uslove reakcije.

ORS675 je amplifikovao velik broj nespecifičnih produkata u rasponu od 250 bp do 1000 bp. Testirane su linije RHA419, RH-N-49 i F_1 uzorak dobijen njihovim ukrštanjem, pri čemu su nespecifični produkti zapaženi kod sva tri uzorka. Ispitan je uticaj preciznosti polimeraze i urađen je amplifikacija sa Dream Taq Polymerase (Fermentas) i True Hot Start Polymerase (Fermentas) (Slika 8). Utvrđeno je da se upotrebom preciznijih polimeraza ne smanjuje količina nespecifičnih produkata.

Uticaj samokomplementarnosti prajmera ispitan je tako što je u jedan miksa sa matricom dodat samo "forward" prajmer, a u drugi miksa samo "reverse" prajmer. Utvrđeno je da je su nespecifični produkti posledica autokomplementarnosti reverse prajmera zbog čega su dobijeni produkti umnožavanjem jednog prajmera (*eng.* single-primer amplification) (Slika 7).



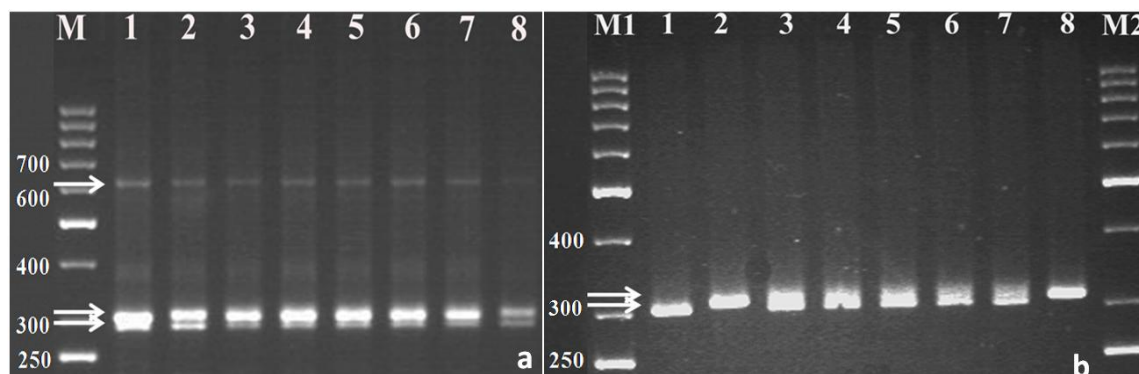
Slika 7. Nespecifična amplifikacija dobijena prajmerom ORS675: 1-3 linije RHA 419, RH-N-49 i F₁ uzorak sa forward i reverse prajmerom i Dream taq polimerazom; 4-6 linije RHA 419, RHA-N-49 i F₁ uzorak sa forward i reverse prajmerom i Hot strat polimerazom; 7-9 linije RHA 419, RHA-N-49 i F1 uzorak samo sa forwar prajmerom; 10-12 linije RHA 419, RHA-N-49 i F1 uzorak samo sa reverse prajmerom. M1-M4: DNK lestvica 50 bp(Fermentas).



Slika 8. Profili linija RHA 419 (1), RHA-N-49 (2) i F₁ uzorka (3) iz ukrštanja RHA 419 x RHA-N-49 dobijeni uz pomoć ORS675 na optimizovanom programu. M: DNK lestvica 50 bp (Fermentas).

Nespecifična amplifikacija neutralisana je povećanjem temperature elongacije sa 60 °C na 72 °C (Slika 8), i za mapirajuću populaciju je korišćen PCR program prikazan u Tabeli 6.

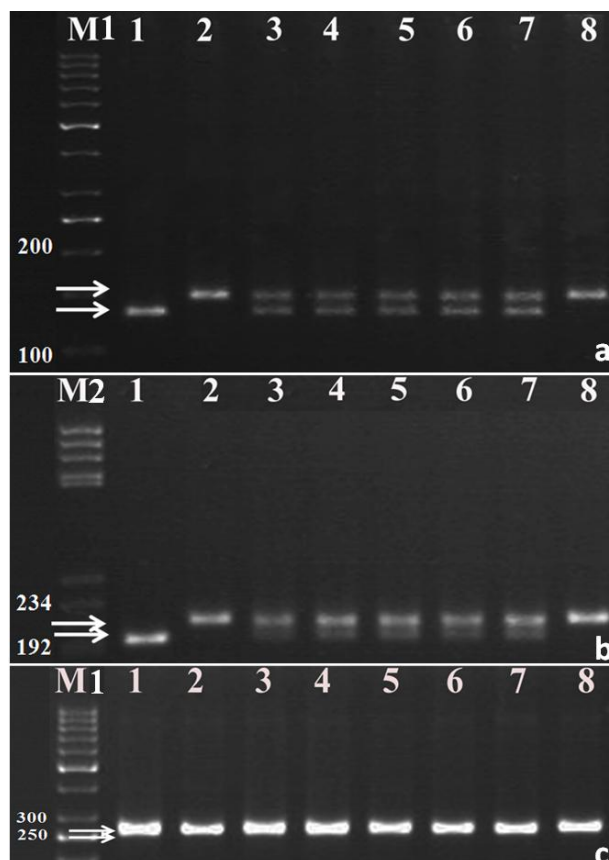
Kod prajmera ORS662, nespecifični fragmenti dužine 620 bp i 298 bp javili su se kod svih testiranih uzoraka. Prisustvo fragmenta od 298 bp uticalo je na migraciju specifičnih fragmenata (Slika 9a). Kao i u slučaju prajmera ORS675, i kod ORS662 je povećanje temperature elongacije imalo pozitivan efekat i na višoj temperaturi nespecifični fragmenti se nisu umnožili (Slika 9b).



Slika 9. Nespecifična amplifikacija uočena kod linije RHA 419 (1), RHA-N-49 (2), F₁ uzoraka (3) i F₂ biljke (4-8) sa prajmerom ORS662 (a) i uticaj povećanja temperature elongacije (b). M: DNK lestvica 50 bp (Fermentas).

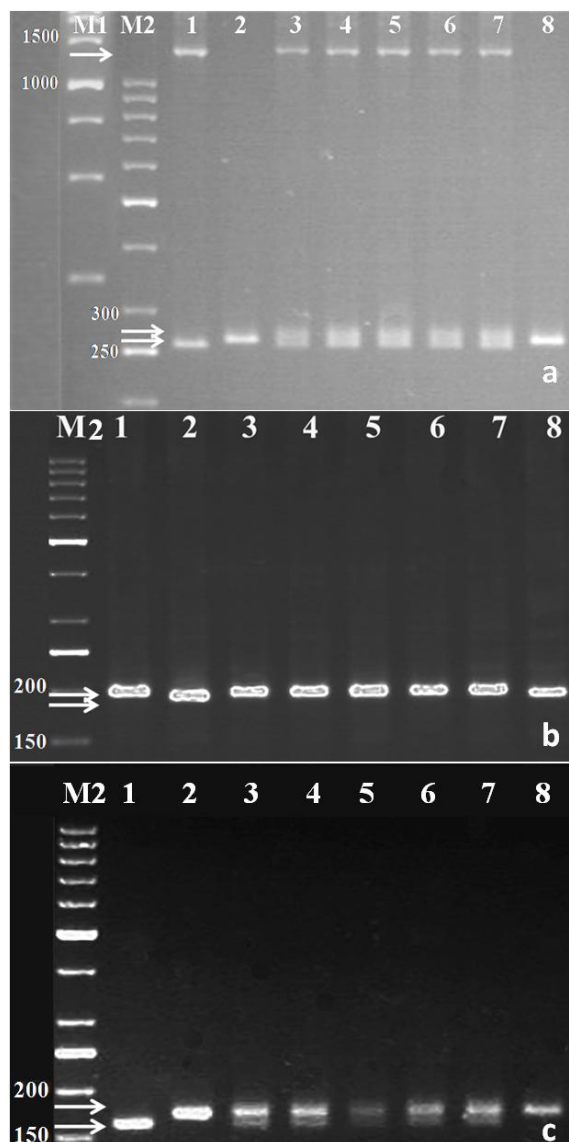
6.2.2. Tetsiranje markera sa LG1

Pre genotipizacije celokupne mapirajuće populacije, molekularne analize su izvršene na probnom uzorku koji se sastojao od roditeljskih linija RHA 419 i RHA-N-49, dva heterozigotna uzoraka iz F₁ i četiri nasumično izabrana uzorka iz F₂. Dvanaest markera je izabrano sa LG1 genetičke mape suncokreta iz regiona u kojem se nalazi gen otpornosti *Plarg*. Svi prajmeri sa LG1 bili su polimorfni između roditeljskih linija RHA 419 i RHA-N-49.



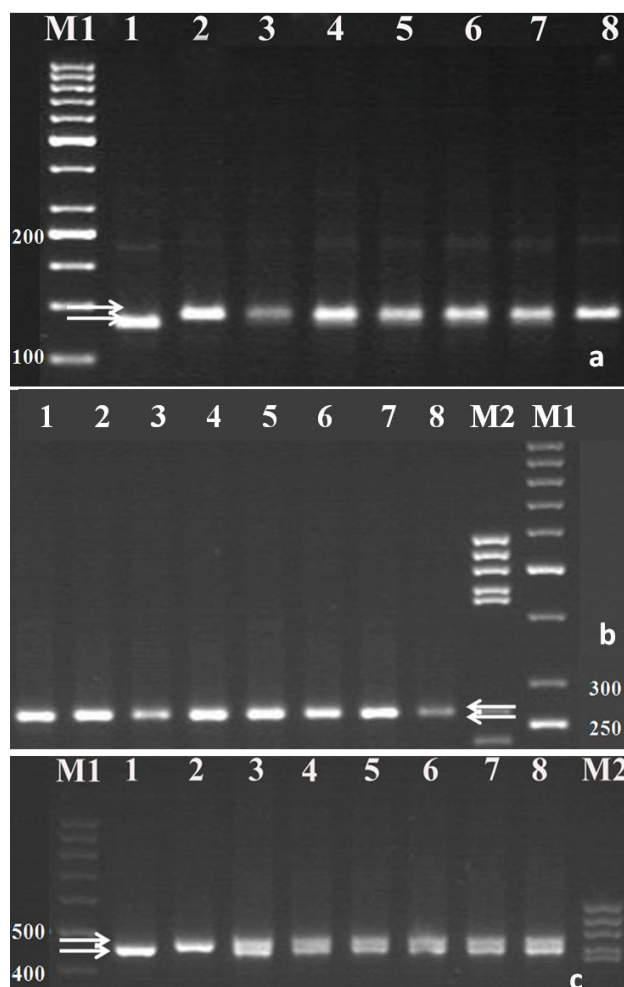
Slika 10. Profili linija RHA 419 (1) i RHA-N-49 (2), F₁ uzoraka (3) i F₂ biljke (4-8) biljaka dobijeni markerima ORS610(a), ORS1039 (b) i ORS1128 (c). M1: DNK lestvica 50 bp; M2: pBR322 (Fermentas).

Upotrebom prajmera ORS610 kod otpornog genotipa dobijen je fragment dužine 135 bp, dok je kod osetljivog umnožen fragment dužine 150 bp (Slika 10a). Uz pomoć markera ORS1039 kod RHA419 amplifikovan je fragment dužine 200 bp, dok je kod RHA-N-49 dobijen produkt od 215 bp (Slika 10b). Marker OR1128 umnožio je fragment od 251 bp kod osetljivog genotipa i 254 kod otpornog genotipa (Slika 10c).



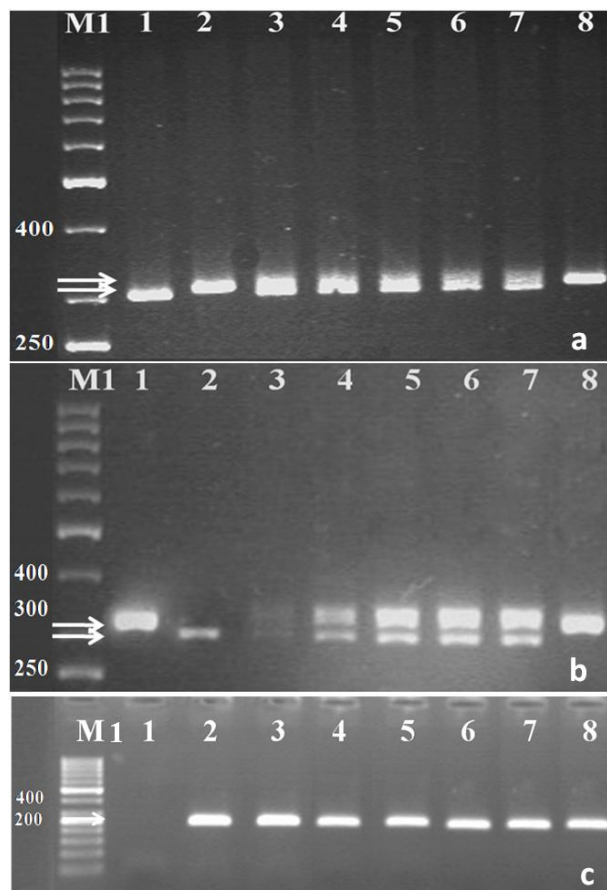
Slika 11. Profili linija RHA 419 (1) i RHA-N-49 (2), F₁ uzoraka (3) i F₂ biljke (4-8) dobijeni markerom ORS543 (a), ORS509 (b) i ORS1182 (c). M1: DNK lestvica 1kb (Fermentas); M2: DNK lestvica 50 bp (Fermentas).

Upotrebom prajmera ORS543 kod otporne linije su dobijena dva fragmenta, dužine 1400 bp i 260 bp. Kod osetljivog genotipa umnožen je samo jedan fragment dužine 265 bp (Slika 11a). Uz pomoć markera ORS1182 kod otpornog genotipa dobijena je traka od 165 bp. Kod osetljivog genotipa umnožen je fragment dužine 175 bp (Slika 11b). Uz pomoć markera ORS509 kod otpornog genotipa amplifikovan je fragment dužine 200 bp, dok je kod neotpornog genotipa RHA-N-49 umnožen fragment dužine 195 bp (Slika 11c).



Slika 12. Profili linija RHA 419 (1) i RHA-N-49 (2), F₁ uzoraka (3) i F₂ biljke (4-8) dobijeni markerima ORS710 (a), ORS371 (b), ORS053 (c). M1: DNK lestvica 50bp (Fermentas); M2: DNK lestvica pBR322 (Fermentas).

ORS710 je umnožio fragment dužine 137 bp kod otporne linije i od 142 bp kod osetljive linije (Slika 12a). Upotrebom prajmera ORS053 kod otporne linije je dobijen fragment od 450bp, a kod osetljivog genotipa od 455bp (Slika 12b). ORS371 umnožio je fragment dužine 267 bp kod RHA419, dok je kod linije RHA-N-49 detektovan fragment dužine 270 bp (Slika 12c).



Slika13. Profili linija RHA 419 (1) i RHA-N-49 (2), F₁ uzoraka (3) i F₂ biljke (4-8) dobijeni markerima ORS662 (a), ORS716 (b) i ORS675 (c). M1: DNK lestvica 50bp (Fermentas)

Uz pomoć markera ORS662 kod otpornog genotipa amplifikovan je fragment dužine 302 bp, dok je kod neotpornog genotipa RHA-N-49 umnožen fragment dužine 310 bp (Slika 13a). ORS716 je umnožio fragment dužine 303 bp kod otporne linije, a kod neotporne linije je detektovan fragment dužine 325bp (Slika 13b). Sa markerom ORS675 kod otpornog genotipa uočeno postojanje nultog alela, a kod osetljivog genotipa je detektovan fragment od 250 bp (Slika 13c).

Na osnovu profila F₁ individua, markeri su ocenjeni kao dominantni ili kodominantni (Tabela 8).

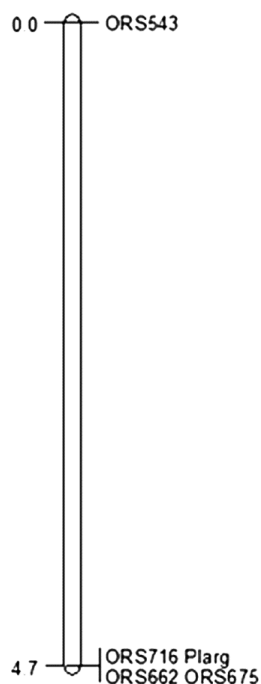
Tabela 8. Način nasleđivanja markera korišćenih za preliminarno ispitivanje

	Marker	Način nasleđivanja
1.	ORS1128	dominantan
2.	ORS509	dominantan
3.	ORS710	dominantan
4.	ORS371	dominantan
5.	ORS675	dominantan
6.	ORS610	kodominantan
7.	ORS543	kodominantan
8.	ORS1039	kodominantan
9.	ORS1182	kodominantan
10.	ORS662	kodominantan
11.	ORS053	kodominantan
12.	ORS716	kodominantan

6.3. MOLEKULARNE ANALIZE MAPIRAJUĆE POPULACIJE RHA 419 x RHA-N-49. KONSTRUKCIJA GENETIČKE MAPE.

Na osnovu položaja na genetičkoj mapi (Dušle i sar. 2004; Wieckhorst i sar. 2010) i rezultata preliminarnog istraživanja, četiri najbliža markera sa jasno uočljivim polimorfizmom (ORS543, ORS662, ORS716 i ORS675) su izabrana za mapiranje gena Pl_{arg} na populaciji RHA 419 x RHA-N-49. Mapirajuća populacija sastojala se od 103 F_2 individue.

Markeri ORS543, ORS662 i ORS716 pokazali su razdvajanje 1:2:1, kakvo se očekuje za kodominantan marker. Sa markerom ORS675 razdvajanje je bilo 1:3 (Tabela 9). Na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je genetička mapa za region koji okružuje Pl_{arg} (Slika 14).



Slika 14. Delimična genetička mapa LG1 sa Pl_{arg} lokusom

Sa markerom ORS543 kod osam uzoraka ocena molekularnim markerom je odstupala od fitopatološke ocene, tj. primećeno je osam rekombinacija. Postojanje rekombinanta potvrđeno je ponovnim testiranjem F_2 uzoraka. ORS543 je mapiran proksimalno od gena Pl_{arg} , na udaljenosti od 4,7 cM (Slika 14).

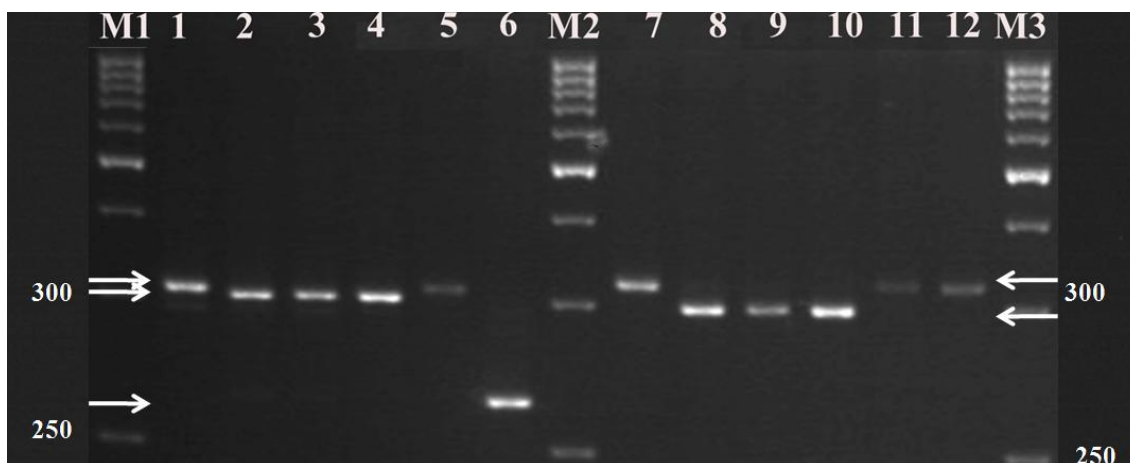
Tabela 9. Razdvajanje molekularnih markera u F_2 populaciji iz ukrštanja RHA 419 x RHA-N-49

DNK marker	Očekivan odnos razdvajanja	Zabeleženo razdvajanje	χ^2
ORS543	1:2:1	23:57:27	1.17
ORS662	1:2:1	24:52:27	0.18
ORS716	1:2:1	24:52:27	0.18
ORS675	1:3	24:79	0.16

Rezultati dobijeni uz pomoć markera ORS716, ORS662 i ORS675 nisu odstupali od rezultata fitopatološkog testa. S obzirom na to da rekombinanti nisu detektovani, može se reći da su ova tri SSR markera kosegregirala sa genom Pl_{arg} .

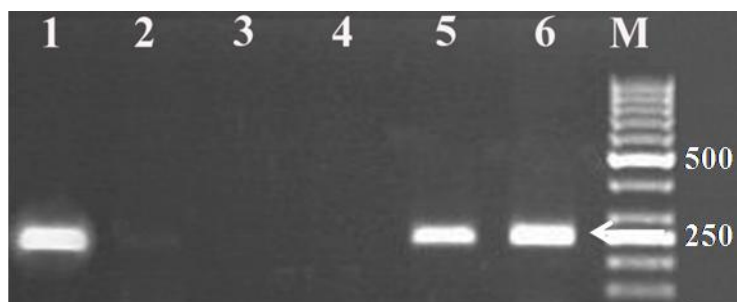
6.4. VALIDACIJA MARKERA

Kako bi se potvrdilo da su dobijeni amplifikacioni profili specifični za gen *Plarg*, tri kosegregirajuća markera su testirana na linijama RHA 443 i RHA 464 (Slika 15), kao i na linijama RH 1-20. Kod svih testiranih linija uočeni su profili karakteristični za liniju suncokreta koja je korišćena kao izvor otpornosti u mapirajućoj populaciji (RHA 419): sa markerom ORS662 umnožen je fragment od 302bp, sa markerom ORS716 fragment od 303bp, dok je sa ORS675 potvrđeno prisustvo nultog alela (Slika 16).



Slika 15. Profili linija RHA-N-49 (1), RHA 419 (2), RHA 443 (3), RHA 464 (4), HA-R4 (5) i HA-R5 (6) sa markerom ORS662; 7-12 profili istih linija sa markerom ORS716. M1, M2, M3: DNK lestvica 50bp (Fermentas).

Markeri su testirani i na linijama koji na LG1 imaju druge *Pl* gene, gde se nalazi i gen *Plarg*. Kod linije HA-R4, upotrebom prajmera ORS662 umnožen je fragment veličine 312 bp, sa ORS716 dobijen je fragment od 325 bp, a sa prajmerom ORS675 fragment od 235 bp. Kod linije HA-R5 sa prajmerom ORS662 uočen je fragment od 233bp, sa ORS716 fragment od 325bp, dok je ORS675 umnožio fragment dužine 235 bp. Haplotipovi ovih linija razlikovali su se od haplotipova linija sa genom *Plarg*.

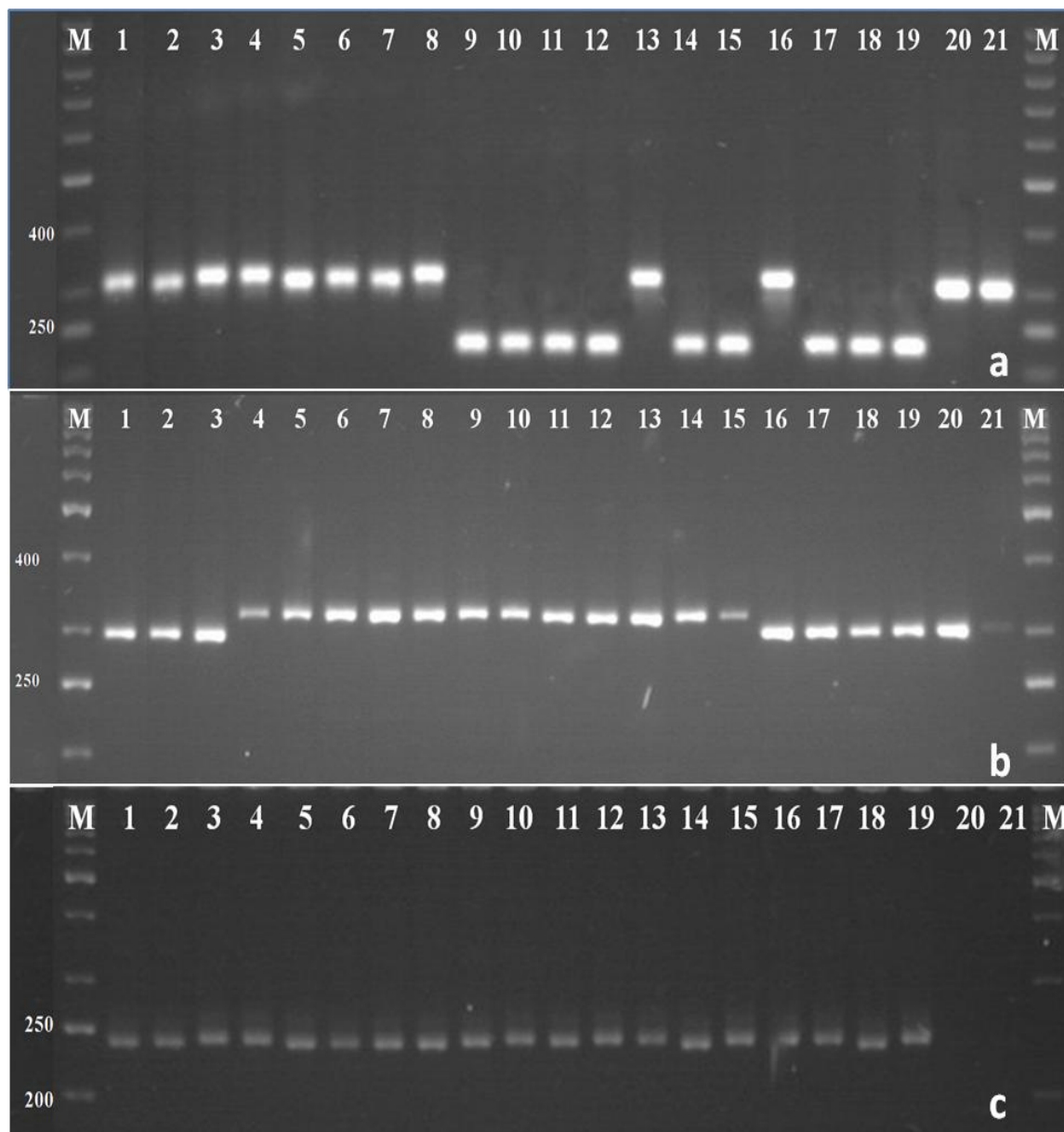


Slika 16. Profili linija RHA-N-49 (1), RHA 419 (2), RHA 443 (3), RHA 464 (4), HA-R4 (5) i HA-R5 (6) sa ORS675. M: DNK lestvica 50bp (Fermentas).

6.5. MAS

6.5.1. Testiranje osetljivih linija

Gen otpornosti *Pl_{arg}* unosen je u linije suncokreta koje nisu otporne na plamenjaču, ali se odlikuju drugim poželjnim agronomskim osobinama. Pre primene markera za marker asistirana povratna ukrštanja, svi osetljivi genotipovi su testirani sa ORS662 (Slika 17a), ORS716 (Slika 17b) i ORS675 (Slika 17c), kako bi se utvrdilo da li je razlika između otpornih i različitih neotpornih alela dovoljno velika da bi mogla da se detektuje na agaroznim gelovima.



Slika 17. Profili komercijalnih linija suncokreta (1-19) u koje je unošen *Plarg* i otpornih linije RHA 419 (20) i RHA 443 (21) sa prajmerima ORS662 (a), ORS716 (b) i ORS675 (c). M: DNK lestvica 50bp (Fermentas).

Sa prajmerom ORS716 majčinske linije imale su jedinstven profil - kod linija HA-26-OR, BT-VL-17 i HA-26-OL-SOL detektovan je alel od 323 bp, dok se kod restorera javljao profil od 325 bp i 305 bp.

Tabela 10. Profili linija suncokreta u koje je unošena otpornost i linija donora otpornosti

Oznaka na gelu	Gen otpornosti	Linija	ORS662	ORS716	ORS675
1	-	RHA-N-49	310	325	235
2	-	PC-GR-252	310	325	235
3	-	RHA-UK	317	325	237
4	-	RHA-M-72	317	325	237
5	-	RHA-ANN-65	310	325	236
6	-	RHA-ŠP	310	325	236
7	-	SU-RF-49	310	325	236
8	-	SU-RF-252	325	325	236
9	-	Ha-26-OR	280	323	237
10	-	BT-VL-17	280	323	243
11	-	HA-26-OL-SOL	280	323	241
12	-	NIMI-RF-27	280	305	243
13	-	NIMI-RF-UK	325	325	241
14	-	NIMI-RF-65	280	305	237
15	-	NIMI-RF-SES	280	305	243
16	-	NIMI-RF-72	325	325	243
17	-	NIMI-RF-168	280	305	243
18	-	NIMI-RF-49	280	305	241

19	-	NIMI-RF- 92	280	305	243
20	<i>Plarg</i>	RHA 419	302	303	-
21	<i>Plarg</i>	RHA 443	302	303	-

Upotrebom drugih prajmera kod majčinskih linija nije dobijen jedinstveni profil. Restorer linije su imale različite profile koji se nisu mogli dovesti u korelaciju sa osobinama koje ih karakterišu kao što su tolerantnost na herbicide ili otpornost na volovod. Dužina fragmenata dobijena kod osteljivih linija kao i kod izvora otpornosti (RHA 419 i RHA 443) prikazana je u Tabeli 10.

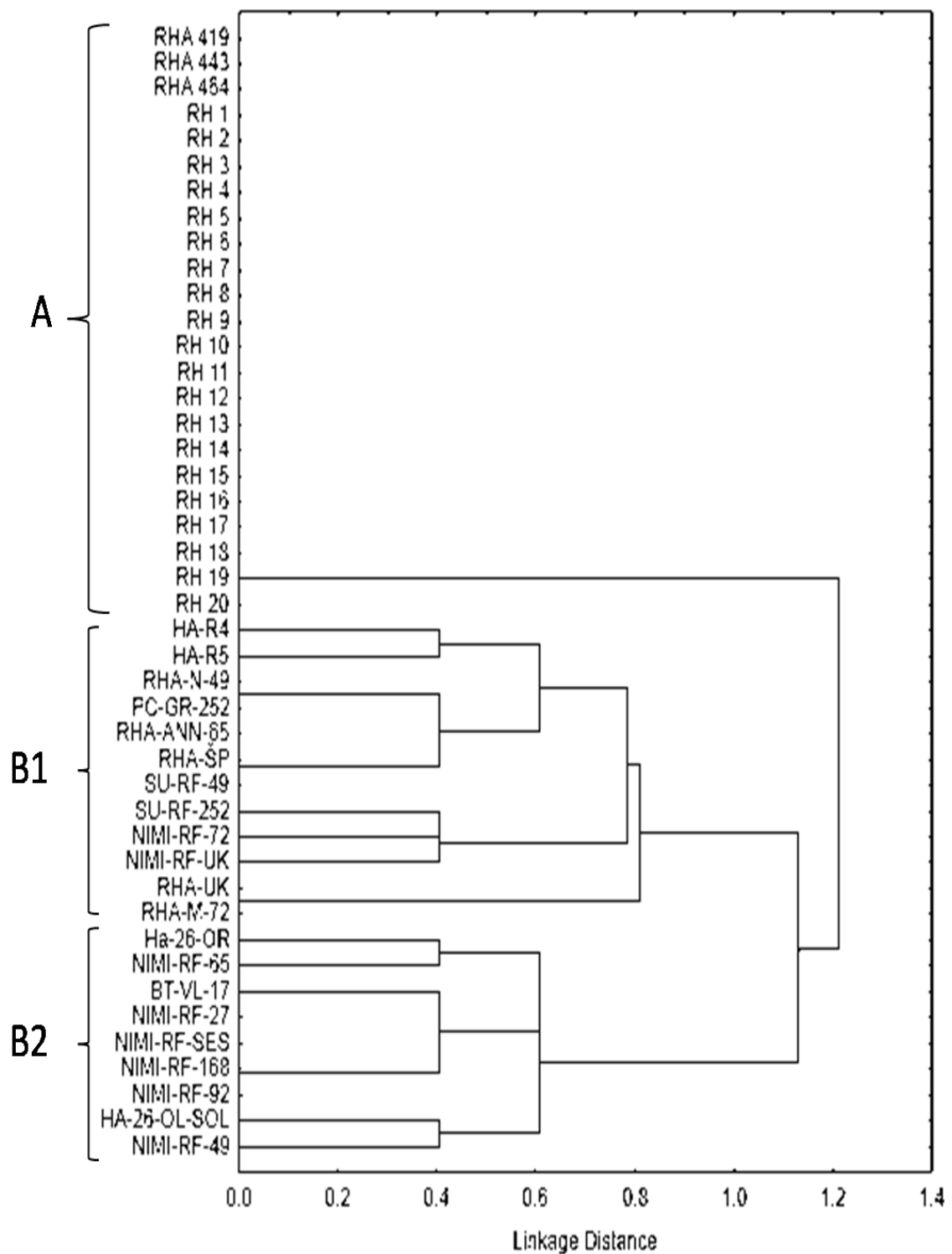
Markeri su bili visoko polimorfni među neotpornim linijama. Na osnovu broja detektovanih alela, za svaki SSR izračunata je PIC vrednost (Tabela 11)

Tabela 11. PIC vrednosti za markere korišćene u MAB

Marker	PIC vrednost
ORS662	0,66
ORS716	0,63
ORS675	0,70

6.5.2. Konstrukcija klastera

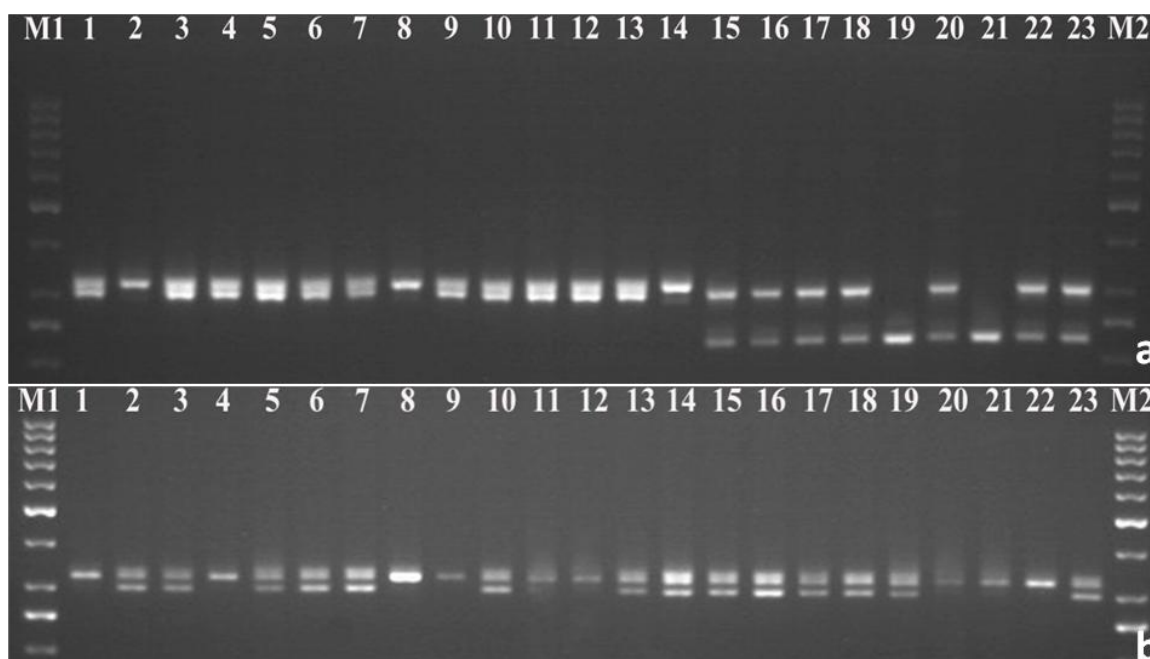
Na osnovu molekularnih profila 44 korišćene linije dobijenih sa markerima ORS662, ORS716 i ORS675, napravljen je klaster uz pomoć UPGMA metode. Unutar klastera inbred linije su bile podeljene u dve velike grupe, označene sa A i B (Slika 18). U grupu A izdvojile su se sve linije sa genom *Plarg*, dok su sve linije bez gena *Plarg* formirale klaster B. Linije su se dodatno grupisale unutar klastera B i formirale subklaster B1 i B2. U klasteru B1 nalazile su se linije kod kojih je za MAS pogodniji bio marker ORS716, dok su se u B2 izdvojile linije kod kojih je za marker asistiranu selekciju bio pogodniji ORS662.



Slika 18. Grupisanje linija suncokreta na osnovu rezultata dobijenih markerima
ORS662, ORS716 i ORS675

6.5.3. Upotreba markera u povratnim ukrštanjima

Prilikom marker-asistirane selekcije, genotipizacija uzoraka je rađena na agaroznim gelovima. Kriterijum za izbora prajmera za testiranje potomstva iz svakog ukrštanja bio je da je razlika između profila otpornog i neotornog genotipa dovoljno velika kako bi se mogla očitati. Tako se, zbog veće razlike u dužini alela, ORS662 pokazao kao pogodniji za genotipizaciju na agaroznim gelovima BC potomstva gde su rekurentni roditelji bile linije HA-26-OR, BT-VL-17, HA-26-OL-SOL, NIMI-RF-27, NIMI-RF-65, NIMI-RF-SES, NIMI-RF-168, NIMI-RF-49 i NIMI-RF-92, dok je ORS716 bio pogodniji u slučaju linija SU-RF-252, RHA-N-49, PC-GR-252, RHA-UK, RHA-M-72, RHA-ANN-65, RHA-ŠP, SU-RF-49, NIMI-RF-UK, NIMI-RF-72.



Slika 19. Profili potomstva iz ukrštanja SU-RF-252x RHA 419 (1-14) i HA-26-ORx RHA 419 (15-23) dobijeni sa markerom ORS662 (a) i ORS716 (b)

U BC populacijama su identifikovani profili koji odgovaraju osetljivom roditelju i profili koji se očekuju kod heterozigotnih uzoraka, što je očekivan rezultat u povratnom ukrštanju (Slika 19).

7. DISKUSIJA

7.1. OTPORNOST ŠIROKOG SPEKTRA UNEŠENA IZ DIVLJIH SRODNIKA

Divlji srodnici se koriste u oplemenjivanju suncokreta kako bi se proširila njegova genetska osnova i dobio veći prinos (Singh i Ocampo 1997), povećala količina i kvalitet ulja (Seiler 2007), tolerantnost na biotički i abiotički stres (Miller i Seiler 2003), tolerantnost na herbicide (Al-Khatiba i sar. 1998) ili kako bi se dobili novi izvori muške sterilnosti (Leclercq 1969). Divlje vrste takođe predstavljaju veoma važan izvor gena otpornosti na različite bolesti suncokreta (Jan i sar. 2002, 2004a,b; Kuhl i sar. 2001; Ling i sar. 2004). Tako su *Or* geni, koj daju otpornost suncokreta na volovod, mahom poreklom iz divljih srodnika suncokreta (Fernandez-Martinez i sar. 2000) kao i geni otpornosti za rđu (Quresh i sar. 1993). Divlji srodnici pokazali su se i kao dobar izvor gena otpornost na plamenjaču: *Pl₅* poreklom je iz *H. tuberosus* (Vranceanui sar. 1981), *Pl₇* iz *H. praecox* (Miller i Gulya 1991), dok su *Pl₈* i *Pl_{arg}* u gajeni suncokret unešeni iz *H. argophyllus* (Miller i Gulya 1991; Seiler i sar. 1991).

Kao i u slučaju gena za otpornost na volovod, čest je slučaj da *Pl* geni pružaju otpornost širokog spektra, tj. da jedan gen obezbeđuje otpornost na veći broj rasa plamenjače. Gen *Pl_{arg}* i *Pl₈* su jedini za sada opisani *Pl*geni koji daju otpornost na sve identifikovane rase plamenjače. Prema Miller i sar. (2002), *Pl_{arg}* obezbeđuje otpornost na američke rase 300, 330, 700, 730 i 770. Nadalje, Vear i sar. (2003) prijavljuju da je *Pl_{arg}* efikasan i u slučaju francuskih rasa 100, 300, 304, 307, 314, 700, 704, 710 i 714. U ovom radu, otpornost linija RHA 419 (*Pl_{arg}*), RHA 443 (*Pl_{arg}*) i RHA 464 (*Pl_{arg}*) testirana je na rasu 730, koja je dominantna u Srbiji i koju uspešno kontroliše gen *Pl₆*. Pored rase 730, u istraživanju je korišćena i smeša rasa prouzrokivača plamenjače koja prevazilazi gen *Pl₆*. Sve testirane linije sa genom *Pl_{arg}* pokazale su se kao potpuno otporne na korišćene rase prouzrokivača

plamenjače, što je u skladu sa drugim dostupnim rezultatima. Dobijeni rezultat podupire hipotezu da Pl_{arg} daje otpornost širokog spektra.

7.2. GEN ILI GENSKI KLASTER?

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je Pl_{arg} pojedinačan dominantan gen. Razdvajanje F_4 familija koje je uočeno pratilo je model 1:2:1. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima Dušle i sar. (2004) i Wieckhorst i sar. (2010), koji su takođe detektovali jedan dominantan gen. Vear i sar. (2003) su, prilikom ocenjivanja otpornost potomstva iz test ukrštanja linije RHA 419 sa potpuno osetljivom linijom, dobili razdvajanje 1R:1S, čime je potvrđeno da je za otpornost odgovoran jedan dominantan gen. Slično njima, razdvajanje 128 F_2 individua iz ukrštanja CmsHA342 × Arg1575-2 u istraživanju Brahm i sar. (2000) je pratilo model 3:1, karakteristično za jedan dominantan gen.

S obzirom na to da Pl_{arg} daje otpornost prema svim do sada poznatim rasama plamenjače, uključujući i rase otporne na fungicid metalaksil (Miller i sar. 2002), ne može se isključiti mogućnost da je u pitanju zapravo klaster veoma blisko vezanih gena, kao što se pokazalo u slučaju drugih Pl gena. Prema Vear i sar. (1997), gen Pl_6 , za koji se dugo smatralo da je pojedinačan dominantan gen koji pruža otpornost na veliki broj rasa plamenjače, nije "jak" gen već je u pitanju genski klaster. Izučavajući razdvajanje u F_3 i F_4 generaciji nakon infekcije sa pet različitih rasa plamenjače (100, 300, 700, 703, 710), izveden je zaključak da se lokus Pl_6 sastoji iz najmanje dva dela, od kojih jedan daje otpornost na rasu 100 i 300, a drugi na rase 700, 703 i 710. Vear i sar. (2012) sugerišu da je lokus još kompleksniji nego što se inicijalno smatralo, te da u tom klasteru postoje dva Pl_2 gena (Pl_{2a} i Pl_{2b}) od kojih jedan daje otpornost na rase 304 i 314, a drugi na rase 304, 307 i 334. Jedan od dva gena (Pl_{2a}) nalazi se u klasteru sa genima Pl_1 i $Pl_{6/7}$, dok se Pl_{2b} nalazi van tog klastera i segregira nezavisno od gena Pl_{2a} i $Pl_{6/7}$. Slično njima, Tourvieille de Labrouhe i sar. (2012) smatraju da je deo klastera odgovoran za otpornost na rasu 330 (US) jače povezan sa delom klastera koji daje otpornost na rase 710 i 703 nego sa delom koji daje otpornost na rasu 304, dok se gen za

otpornost na rasu 300 nalazi u intermedijarnom položaju. Prema Bouzidi i sar.(2002), Pl_6 lokus bi morao da se sastoji iz 11 pojedinačnih gena.

Klaster Pl gena uočen je i na LG13 suncokreta, gde su mapirani Pl_5 i Pl_8 . Grupisanje gena otpornosti na plamenjaču u samostalne klasterne je primećeno ne samo kod suncokreta, već i kod zelene salate (Michelmore i Meyers 1998). Prema Bouzidi i sar. (2002), mehanizam delovanja "jakih" gena koji daju otpornost na veliki broj rasa plamenjače, kao što je i Pl_{arg} , može se objasniti ili postojanjem klastera pojedinačnih veoma blisko vezanih gena od kojih svaki daje otpornost na pojedinačnu rasu plamenjače, ili postojanjem vrste potpune otpornosti koja nije specifična za rasu (*eng.* non-race-specific, complete resistance). Iako naši rezultati, kao i rezultati drugih autora, pokazuju da je Pl_{arg} pojedinačan gen, imajući u vidu kompleksnu arhitekturu drugih sličnih lokusa, potrebno je sprovesti detaljna molekularna istraživanja kako bi se isključila mogućnost da se i u slučaju Pl_{arg} ne radi o grupi gena koji su fizički veoma blisko vazani. Kako bi se utvrdilo da li je u pitanju genski klaster, potrebno je razviti veću populaciju za mapiranje visoke rezolucije, i saturirati regiona drugim markerima kao što su SNP markeri i kao i markeri razvijeni za RGC na LG1. Dalja molekularna istraživanja uključila bi i sekvenciranje region u koje se nalazi Pl_{arg} kao i identifikaciju kandidat gena koji kotroliše otpornost.

7.3. OTPORNOST TIP A II

Između suncokreta i prouzročivača plamenjače *Plasmopara halstedii* postoji dva tipa reakcije inkompatibilnosti, tj. dva mehanizma otpornosti. Kod otpornosti tipa I, rast patogena se zaustavlja u ranom stadijumu, dok kod otpornosti tipa II patogen raste kroz hipokotil i tek tada se javlja reakcija hipersenzitivnosti (Radwan i sar. 2011).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da se u slučaju nekih *Pl* gena kod otpornih biljaka na kotiledonima opaža sporulacija, ali se ne razvija sistemična infekcija, dakle javlja se otpornost II tipa (*eng.* type 2 resistance, RII). Stoga se ocenjivanje ne može podvesti pod princip "prisustvo spora = neotpornost biljke" (Vear i sar. 2012). Prema literaturnim podacima, otpornost tipa II uočena je kod gena *Pl₅* i *Pl₈* (Bert i sar. 2001; Radwan i sar. 2003) kao i kod gena *Pl₁₄* (Radwan i sar. 2011) i *Pl_{arg}* (Vear i sar. 2003). Zbog mogućnosti pojave otpornosti tipa II, fenotipska ocena je rađena i na F₄ familijama. Ispitivanje koje se radi na F₄ familijama umesto na F₂ biljkama traje duže i zahteva više testova, ali pruža mogućnost provere upitne sporulacije i samim tim dobijena ocena je znatno pouzdanija (Vear i sar. 2012). Prilikom zaražavanja rasom 730 i smešom rasa koja prevazilazi gen *Pl₆*, kod otpornih linija RHA 419, RHA 443 i RHA 464 uočena je potpuna otpornost (otpornost tipa I), bez sporulacije na kotiledonima. Slično tome, kod potomstva je u većini slučajeva uočena ili infekcija jakog intenziteta ili potpuna otpornost. U pojedinim slučajevima unutar familije koja nije pokazivala simptome kao što su jaka sporulacija, prestanak rasta, nekroza i hloroza listova i stabla, uočena je sporulacija niskog intenziteta koja nije uticala na njihov rast. Takve biljke su ponovo testirane i pokazale su se kao odporne. Ipak, u našem radu atipična sporulacija javljala se pre kao izuzetak nego kao mehanizam otpornosti karakterističan za gen *Pl_{arg}*.

7.4. LOKACIJA GENA I BLISKO VEZANI MARKERI. SUPRESOVANA REKOMBINACIJA U POPULACIJI RHA 419 x RHA-N-49.

Svih dvanaest markera sa LG1 koji su korišćeni u preliminarnom testu pokazali su se polimofnim između otporne linije RHA 419 i neotporne linije RHA-N-49. Konstruisana je genetička mapa na osnovu 5 lokusa, od kojih su četiri bila SSR markeri a jedan fenotipski marker. Identifikovan je novi kosegregirajući marker ORS675 i potvrđena kosegregacija markera ORS716 i ORS662 sa genom *Plarg*, a što je u skladu sa rezultatima Dušle i sar. (2004) i Wieckhorst i sar. (2010).

Ukoliko se uporedi genetička mapa LG1, koja je u našem radu konstruisana na osnovu F₂ populacije iz ukrštanja RHA 419 x RHA-N-49, sa referentnim genetičkim mapama (Tang i sar. 2002; Yu i sar. 2003), uočava se da je redosled markera istovetan ali postoje znatna odstupanja u genetičkoj udaljenosti markera. Prema referentnoj genetičkoj mapi suncokreta, udaljenost između ORS716 i ORS543 je 22,4 cM i 22,8 cM, u odgovarajućem redosledu navođenja, dok su u našem radu markeri bili udaljeni 4,75 cM. Ovaj rezultat ukazuje na visoko supresovanu rekombinaciju u populaciji RHA 419 x RHA-N-49.

Supresovana rekombinacija kao posledica smanjenja homologije među hromozomima je uočena i od strane drugih autora, a često se javlja prilikom introgresije lokusa za otpornost na bolesti iz divljih srodnika. Kod ječma je pokazano da je rekombinacija potisnuta u intervalu od 240 kb oko *Mla* klastera, introgresovanog iz *Hordeum spontaneum*, divljeg srodnika *H. vulgare* (Wei i sar. 1999). Genski klaster *Mla* ima položaj ispod telomere hromozoma 5 (1H), sličan položaju koji *Plarg* zauzima na LG1 suncokreta (Dušle i sar. 2004). Supresovana rekombinacija uočena je i kod paradajza, u slučaju *Mi* gena za otpornost na nematode (van Daelen i sar. 1993) i *Tm-2a* gen za otpornost na viruse (Ganal i sar. 1989). Oba lokusa su poreklom iz divljeg srodnika paradajza, *L. peruvianum*. Fenomen supresovane rekombinacije prilikom ukrštanja sa divljim srodnicima je zabeležen i kod kukuruza (McMullen i sar. 2009) i pšenice (Gupta i sar. 2006). Kod suncokreta, u istraživanju sprovedenom na više mapirajućih populacija, Bowers i sar. (2012) su utvrdili da je rekombinacija najviše bila supresovana kada je jedna roditeljska linija bila ANN1238, koja vodi poreklo od divljeg srodnika suncokreta.

Supresovana rekombinacija je uočena i u ukrštanjima CmsHA342 × Arg1575-2 (Dušle i sar. 2004), i (cms) HA342 × ARG1575-2 (Wieckhorst i sar. 2010), kod kojih je otporan roditelj posedovao gen *Pl_{arg}*. Prema mišljenu Wieckhorst i sar. (2010), smanjena stopa verovatno je uzrokovana smanjanjem homologije između hromozoma gajenog suncokreta i hromozoma sa introgresijom gena *Pl_{arg}* i nije posledica hromozomske reorganizacije.

Ipak, udaljenost između markera ORS716 i ORS543 koja je u našem istraživanju iznosila 4,75 cM, veća je od 2,4 cM (Dušle i sar. 2004), odnosno 0,3 cM (Wieckhorst i sar. 2010). Povećana rekombinacija može se objasniti smanjenim udelom introgresovanog genoma u liniji RHA 419 u poređenju sa ARG1575-2, linijom korišćenom u istraživanju Dušle i sar. (2004) i Wieckhorst i sar. (2010). Veća homologija između hromozoma kod linija RHA 419 i RHA-N-49, rezultovala je većom rekombinacijom, zbog čega je udaljenost između markera na genetičkoj mapi bliža onoj od 22,8 cM mapiranoj na javnoj genetičkoj mapi suncokreta. Sve navedeno može biti objašnjeno time da, iako introgresije delova genoma iz divljih srodnika smanjuju rekombinaciju u tom delu genoma primaoca, ipak se hromozomski blokovi poreklom iz divljih srodnika smanjuju tokom samooplodnje i ukrštanja u srodstvu (Riesberg i sar. 2000), te se postiže veća homologija, kakav je uočena između RHA 419 i RHA-N-49.

7.5. VALIDACIJA MARKERA

Ključne komponente potrebne za efikasan sistem za molekularno oplemenjivanje su identifikacija i karakterizacija odgovarajućih genetičkih markera, i potvrda vezanosti molekularnog markera i osobine od agronomskog značaja (Perez-Vich i Berry 2010). Genotipovi različitog genetskog porekla sa genom *Pl_{arg}*, kao i genotipovi sa drugim *Pl* genima, korišćeni su u ovom radu kako bi se utvrdila reproducibilnost markera i potvrdila veza markera ORS716, ORS662 i ORS675 i gena *Pl_{arg}*. Čest je slučaj da markeri identifikovani na jednoj mapirajućoj populaciji ne budu polimorfni kada se primene na drugoj populaciji, te je stoga validacija markera pre njihove upotrebe u marker-asistiranoj selekciji neophodna

(Perez-Vich i Berry 2010). Validacija markera vezanih za otpornost na bolesti u različitim genotipovima rađena je na suncokretu u slučaju markera za gen *Pl₂* (Brahm i sar. 2000) i gena otpornosti na rđu *R1* i *R_{adv}* (Lawson i sar. 1998). Potvrdu markera na različitim genotipovima su radili i Gupta i sar. (2006) na pšenici, koji su testirali markere za gen *Lr19* na različitim otpornim i osjetljivim genotipovima. Perović i sar. (2009) ispitali su dijagnostičku vrednost markera Xgwm469-5D za gen otpornosti na mozaični virus kod pšenice koristeći kolekciju koju je činilo 99 sorti ocenjenih na otpornost prema ovom virusu. Slično njima, Fesenko i sar. (2012) vršili su komparativnu analizu nukleotidne sekvence I2 lokusa na genotipovima koji su osjetljivi i otporni na *Fusarium*.

Svi genotipovi sa genom *Pl_{arg}* imali su identične haplotipove - isti amplifikacioni profil uočeni su kod linija RHA 443, RHA 464 i RH 1-20, kao kod linije RHA 419, koja je korišćena kao otporni roditelj u mapirajućoj populaciji. Genotipizacija gena otpornosti u liniji RHA 419 i RHA 443 je prethodno urađena u Wieckhorst i sar. (2010), dok su linije RHA 464 i RH 1-20 prvi put korišćene u ovom istraživanju. Sve linije su se pokazale kao homozigotno otporne, i stoga se mogu koristiti kao izvori otpornosti u oplemenjivanju.

Prilikom testiranja markera vezanih za gen *Pl_{arg}* na linijama koje na LG1 imaju druge *Pl* gene, haplotipovi linija HA-R4 (*Pl₁₄*, *Pl₁₆*) i HA-R5 (*Pl₁₅*) značajno su se razlikovali od haplotipova linija sa genom *Pl_{arg}*. Ovaj rezultat sugerise da se *Pl_{arg}* ne nalazi u istom lokusu sa genima *Pl₁₄*, *Pl₁₅* i *Pl₁₆*, što je u skladu sa opažanjima drugih autora. Prema Mulupi i sar. (2009), *Pl₁₃* se nalazi proksimalno od ORS 371 dok je *Pl_{arg}* mapiran distalno u odnosu na taj isti marker. Bachlava i sar. (2011) su marker RGC203 mapirali 1,6 cM nizvodno od *Pl₁₄* i 48,7 cM od RGC52, NBS-LRR lokusa koji je vezna za gen *Pl_{arg}*. Sve ovo ukazuje na to da je *Pl_{arg}* nezavisan od dugih gena mapiranih na LG1. Ipak, kako bi se potvrdilo da su *Pl* geni sa LG1 blisko vezani geni a ne aleli istog gena, u daljem istraživanju je neophodno uraditi test alelnosti.

7.6. POLIMORFNOST MARKERA SA LG1. KORELACIJA IZMEĐU PROFILA DOBIJENIH MARKERIMA SA LG1 I POREKLA LINIJA.

Molekularni profili ukupno 44 linije dobijeni su pomoću markera ORS716, ORS662 i ORS675. Markeri sa LG1 pokazali su veliki polimorfizam prilikom testiranja neotponih komercijalnih linija suncokreta.

Prema Hu (2010) među elitnim inbred linijama dinukleotidni, trinukleotidni i četvoronukleotidni SSR markeri prosečno detektuju 3,7, 3,6, i 9,5 alela po lokusu u odgovarajućem redosledu navođenja, sa PIC vrednostima od 0,53 za dinukleotide, 0,53 za trinukleotide, i 0,83 za tetrenukleotidne ponovke. ORS662, ORS716 i ORS675 predstavljaju dinukleotidne ponovke, i dobijene PIC vrednosti od 0,66, 0,63 i 0,70 više su od vrednosti 0,53 koja je prosečna za dinukleotidne ponovke, dakle predstavljaju visoko informativne markere.

Različiti marker sistemi, kao što su RAPD (Vasić i sar. 2003, Iqbal i sar. 2008), RFLP (Berry i sar. 1994, Gentzbittel i sar. 1994) i SSR (Dimitrijević i sar. 2010; Imerovski i sar. 2013; Panković i sar. 2004a), korišteni su kod suncokreta za klaster analizu. Korišćenje UPGMA radi grupisanja genotipova po određenom svojstvu urađeno je u radu Panković i sar. (2004a), gde je klaster ukazao na grupisanje restorer linija nezavisno od B fertilnih analoga linija majki, dok je u radu Imerovski i sar. (2013) klaster pokazao da se linije sa otpornošću na iste rase volovoda grupišu po poreklu.

U ovom radu, UPGMA analiza korištena je kako bi se utvrdilo da li se linije mogu grupisati po još nekom svojstvu osim po prisustvu *Pl_{arg}* gena. UPGMA analiza izdvojila je otporne linije u poseban klaster A1, dok su se neotporne linije razdvojile u dve grupe. Kod linija iz grupe B1 za MAS se kao pogodniji pokazao ORS716, a kod linija iz grupe B2 marker ORS662. Restoreri se nisu grupisali u skladu sa drugim zajedničkim svojstvima kao što su tolerantnost na imidazoline ili otpornost na volovod, navodeći na zaključak da je detektovana polimorfnost posledica razlika koje nisu bile predmet ovog istraživanja.

7.7. NULTI ALELI U INTERSPECIES UKRŠTANJIMA

Većina SSR markera koja je razvijena na gajenom suncokreta može da amplifikuje i alele srodnika gajenog suncokreta, te su zato ovi markeri našli primenu u komparativnom mapiranju u rodu *Helianthus* (Heesacker i sar. 2008; Pashley i sar. 2006). Ipak, u našem istraživanju blisko vezan marker ORS675 nije amplifikovao fragment u linijama sa genom *Pl_{arg}*, tj. nulti alel je bio prisutan u linijama RHA 419, RHA 443, RHA 464 i RH 1-20. Nulti alel se verovatno javio usled varijacije u nukleotidnoj sekvenci u genomskom regionu koji je introgresovan iz *Helianthus argophyllus* zajedno sa genom *Pl_{arg}*. Varijacija u sekvenci koja okružuje mikrosatelitni ponovak sprečila je vezivanje prajmera tokom amplifikacije, što je rezultovalo odsustvom amplifikacionog produkta. Ovaj fenomen je primećen i kod drugih ukrštanja sa divljim vrstama (Gupta i sar. 2006; Doebley i sar. 2006; Muller i sar. 2011).

Marker ORS675, kao marker sa nultim alelom u otpornim genotipovima, može da bude od značaja za testiranje genetske čistoće inberd linija. Prilikom komercijalne proizvodnje roditeljskih linija, velika pažnja se posvećuje osiguravanju dobijanja maksimalne čistoće linija (Daniel i sar. 2012). Glavni izvor kontaminacije u baznom semenarstvu je polen sa drugih polja suncokreta, kao i polen sa samoniklog i divljeg suncokreta. Testiranjem genetske čistoće molekularnim markerima rizik od kontaminacije se značajno smanjuje. Marker ORS675, koji amplifikuje samo alel kod osetljivih genotipova, može da bude veoma korisan za detekciju kontaminenata čak i u tragovima u smeši uzoraka.

7.8. MARKER ASISTIRANA SELEKCIJA. MARKER ASISTIRANO POVRATNO UKRŠTANJE

MAS kao metod je razvijen kako bi se izbegli problemi koji se javljaju prilikom klasičnog oplemenjivanja usled nesigurne fenotipske ocene. Upotrebom markera, kriterijum za selekciju postaje genotip umesto fenotipa. Genetička konstitucija biljke se može utvrditi dok je u stadijumu klijanca, čime se omogućava ranija selekcija kao i smanjenje veličine populacije tokom selekcije (Varshney i sar. 2005).

U oplemenjivanju suncokreta, MAS se najčešće koristi u povratim ukrštanjima prilikom introgresije gena. Uz pomoć markera, postiže se veća efikasnost, smanjuju se troškovi i vreme potrebno za povratno ukrštanje (Kaya i sar. 2011)

Unošenje gena otpornosti u selekcionu materijal je najefikasniji, ekonomski najisplativiji i u ekološkom smislu najsigurniji način kontrole bolesti. Molekularni markeri blisko vezani za gene koji pružaju otpornost na ekonomski najvažnije patogene se koriste za MAS kod ratarskih useve kao što su pšenica, pirinač, kukuruz, soja i šećerna repa (pregled dat u Francia i sar. (2005) i Varshney i sar. (2005)). Markeri smanjuju vreme koje je potrebno da se proizvedu komercijalne sorte ili hibridi i redukuje se rizik od unosa nepoželjanih gena iz divljih vrsta (Perez-Vich i Berry 2010).

Imajući u vidu ekonomske štete do kojih bolesti dovode, kod suncokreta je unošenje gena za otpornost na bolesti je jedan od primarnih ciljeva u selekcionim programima. Do danas su identifikovani markeri za više dominantnih gena koji konotrolišu otpornost na plamenjaču (markeri vezani za gene Pl_1 , Pl_2 , Pl_6 , Pl_5/Pl_8), rđu (markeri vezani za gene R_1 i R_{adv}) i hlorotični virus ($Rcmo-1$) (Hahn i Wieckhorst 2010).

Da bi se otpornost unela u elitne komercijalne linije suncokreta, one se ukrštaju sa donorima otpornosti. Inbred linije koje se koriste kao donorske odlikuju često se veoma lošim agronomskim svojstvima (Jocić i sar. 2009). Zbog toga se ove donorske linije ne mogu direktno koristiti u oplemenjivačkim programima za stvaranje novih inbred linija, popucija i hibrida. Iz ovih linija se u

elitne komercijalne inbred linije metodom povratih ukrštanja unosi željeni gen. Prilikom klasičnog povratnog ukrštanja, moguće su dve vrste greške. Prva greška nastaje usled pogrešne fenotipske ocene zbog neuspele infekcije. U ovom slučaju, homozigotno osetljive biljke koje ne pokažu simptome bolesti se kategorišu kao otporne biljke i koriste se za dalja ukrštanja. Druga greška se javlja ukoliko dođe do samooplodnje, te se umesto heterozigotno otpornih biljaka za dalja ukrštanja koriste homozigotno otporne biljke. U ovom slučaju, da bi se dobio očekivani ishod potrebno je više vremena.

Kodominantni markeri omogućavaju da se prilikom svakog ciklusa povratnog ukrštanja u potomstvu identifikuju heterozigotno otporne biljke, koje zadržavaju otpornost poreklom iz genoma roditelja donora, dok po drugim osobinama u svakoj generaciji povratnog ukrštanja u sve većoj meri nalikuju na roditelja recipijenta. Na kraju povratnog ukrštanja, uz pomoć markera je moguće izdvojiti biljke koje su pouzdano homozigotno otporne. U našem radu, markeri ORS716 i ORS675 vezani za gen *Pl_{arg}* su pokazali kao veoma efikasni prilikom ocenjivanja otpornosti selekcionog materijala na otpornost na plamenjaču. Markeri su imali visoku reproducibilnost u više različitih genotipova i pokazali su se kao stabilni u različitim ukrštanjima i veoma pogodnim za MAS. Slično markeru HAP3 za gen *Pl₆* (Panković i sar. 2007), koji je niz godina korišćen na Institutu za ratarstvo i povrtarstvo za identifikaciju biljaka otpornih na rasu plamenjače 730 (Jocić i sar. 2009, 2010), ORS716 i ORS675 će omogućiti transfer gena *Pl_{arg}* u komercijalne linije suncokreta.

7.9. PIRAMIDIZACIJA GENA OTPORNOSTI

Dosadašnja oplemenjivačka praksa pokazuju da sa pojavom novih virulentnijih rasa prouzrokivača plamenjače postojeći geni otpornosti postaju neefikasni (Jocić i sar. 2012). *Pl* geni su rasno specifični i obezbeđuju vertikalnu otpornost, pa je velika verovatnoće da u relativno kratkom veremenskom roku budu prevaziđeni novim rasama plamenjače (Jocić i sar. 2009). Radi postizanja dugotrajne i efektivne otpornosti, predlaže se kombinovanje više različitih *Pl* gena u jednoj liniji, tj. njihovu piramidizaciju. Verovatnoća da će patogen simultano mutirati u pogledu virulentnosti na 2 ili više efektivnih gena otpornosti značajno je manja nego u slučaju jednog gena (Singh i sar. 2001).

Piramidizacija gena se teško može uspešno izvesti uz pomoć klasičnih metoda selekcije. Dominantan odnos među genima ili nepostojanje odgovarajućeg laboratorijskog testa specifičnog za svaki *Pl* gen čine nemogućim utvrditi prisustvo 2 ili više gena otpornosti putem fenotipskog ocenjivanja - i u slučaju da je prisutan jedan gen kao kada ih je prisutno više, biljka će imati fenotip otporne biljke. S druge strane, molekularni markeri blisko vezani za gene čine ovaj proces mogućim. MAS omogućava unošenje gena iz različite germplazme u komercijalne linije, piramidizaciju poželjnih gena unutar jednog genoma kao i selekciju individua sa retkim rekombinacijama (Michelmore 2003). Upotreba markera za piramidizaciju gena otpornosti uspešno je urađena kod pirinča. Uz pomoć RFLP i PCR markera, Hittalmani i sar. (2000) su izvršili piramidizaciju tri major gena za plamenjaču pirinča (Pi1, Piz-5 i Pita). Linije kod kojih su bila prisutna sva tri gena su pokazale veći stepen otpornosti, ukazujući na komplementarni odnos R gena kada su prisutni u istom genomu. Piramidizacija gena uz pomoć markera je urađena i kod genotipa pirinča PR106, kod kojeg su kombinovana tri gena za otpornost na *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Xa21, xa13 i xa5) (Singh i sar. 2001).

Genetska istraživanja *Pl* gena su pokazala da se oni nalaze u najmanje tri klastera gena (Vear, 2004). U radu Jocić i sar. (2009) prikazano je kombinovanje gena različitog porekla i iz različitih klastera, radi postizanja dugotrajnije otpornosti. Intodukcijom gena *Pl₆*, *Pl₇* i *Pl₆₊* u linije majki i gena *Pl₈* i *Pl_{arg}* u linije oca

omogućava se stvaranje hibrida suncokreta otpornih na sve rase plamenjače u dužem vremenskom periodu.

SSR markeri prikazani u radu nezavisni su od drugih *Pl* gena, uključujući i gene sa LG1. Zahvaljujući činjenici da linije sa *Pl_{arg}* imaju jedinstven molekularni profil, moguće je markere ORS662, ORS716 i ORS675 koristiti u kombinaciji sa drugim do sada razvijenim markerima za *Pl* gene za piramidizaciju različitih gena otpornosti na plamenjaču.

Iako do sada nisu pronađene rase plamenjače koje prevazilaze *Pl_{arg}*, izvesna je pojava novih rasa patogena koje će biti virulentnije od postojećih. Kombinovanjem gena *Pl_{arg}* sa drugim *Pl* genima omogućiće se dobijanje dugotrajnije otpornosti, a markeri prikazani u ovom radu značajno će olakšati taj proces.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

Gen Pl_{arg} je pojedinačan dominantan gen koji daje otpornost širokog spektra na plamenjaču.

Prilikom zaražavanja rasom 730 i smešom rasa koja prevazilazi gen Pl_6 , kod otpornih linija RHA 419, RHA 443 i RHA 464 uočena je potpuna otpornost, bez sporulacije na kotiledonima. Kod potomstva je uočena ili infekcija jakog intenziteta ili potpuna otpornost, dok otpornost tipa II nije primećena.

SSR markeri ORS662, ORS675 i ORS716 kosegregirali su sa genom otpornosti Pl_{arg} , dok je ORS543 mapiran na udaljenosti od 4,7 cM. Kosegregirajući markeri ORS662, ORS675 i ORS716 pokazali se stabilnim u svim ispitivanim genotipovi sa genom Pl_{arg} (RHA 419, RHA 443, RHA 464 i RH 1-20).

Prilikom testiranja ORS662, ORS675 i ORS716 na linijama HA-R4 (Pl_{14} , Pl_{16}) i HA-R5 (Pl_{15}) koje na LG1 imaju druge Pl gene, haplotipovi linija HA-R4 (Pl_{14} , Pl_{16}) i HA-R5 (Pl_{15}) značajno su se razlikovali od haplotipova linija sa genom Pl_{arg} , čime je pokazano da se Pl_{arg} ne nalazi u istom lokusu sa genima Pl_{14} , Pl_{15} i Pl_{16} .

Markeri sa LG1 pokazali su veliki polimorfizam između neotponih komercijalnih linija suncokreta. PIC vrednost za markere ORS662, ORS716 i ORS675 iznosila je 0,66, 0,63 i 0,70, u odgovarajućem redosledu navođenja. UPGMA analiza izdvojila je otporne linije u poseban klaster A1, dok su se neotporne linije idvojile u grupu B koja je bila raydvojena na podklaster B1 i B2. Kod linija iz grupe B1 za MAS se kao pogodniji pokazao ORS716, a kod linija iz grupe B2 marker ORS662. Restoreri se nisu grupisali u skladu sa osobinama kao što su tolerantnost na imidazoline ili otpornost na volovod, navodeći na zaključak

da je detektovana polimorfnost posledica razlika koje nisu bile predmet ovog istraživanja.

Molekularni markeri su pokazali da su linije RHA 419, RHA 443, RHA 464 i RH 1-20 homozigotno otporne linije, te se kao takve mogu koristiti kao donori otpornosti u oplemenjivačkim programima.

Markeri ORS662, ORS675 i ORS716 se mogu koristiti za MAS i piramidizaciju gena otpornosti.

9. LITERATURA

- Aćimović M (1998) Bolesti suncokreta, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija, str 13-89.
- Agarwal M, Shrivastva N, Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617-631.
- Albourie JM, Tourvieille J, Tourvieille de Labrouhe D (1998) Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. *Eur J Plant Pathol* 104: 235-242.
- Al-Khatiba K, Baumgartner JR, Peterson DE, Currie RS (1998) Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Sci* 46: 403-407.
- Atlagić J, Panković D, Pekanović A (2003) Backcrosses in interspecific hybridization in sunflower. *Genetika* 35: 187-197.
- Bachlava E, Radwan OE, Abratti G, Tang S, Gao W, Heesacker AF, Bazzalo ME, Zambelli A, Leon AJ, Knapp SJ (2011) Downy mildew *Pl8* and *Pl14* and rust *R_{Adv}* resistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13. *Theor Appl Genet* 122: 1211-1221.
- Berry ST, Allen RJ, Barnes SR, Caligari PDS (1994) Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. 1. Restriction fragment length polymorphism between inbred lines of cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 89: 435-441.
- Berry ST, Leon AJ, Hanfrey CC, Challis P, Burkholz A, Barness S, Rufener GK, Lee M, Caligari PDS (1995) Molecular recombinant marker analysis of *Helianthus annuus* L.: 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 91: 195-199.
- Bert PF, Tourvieille de Labrouhe D, Philippon J, Mouzeyar S, Jouan I, Nicolas P, Vear F (2001) Identification of a second linkage group carrying genes controlling resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 103: 992-997.

- Bouzidi MF, Badaoui S, Cambon F, Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Mouzeyar S (2002) Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor Appl Genet* 104: 592–600.
- Bowers JE, Bachlava E, Brunick RL, Rieseberg LH, Knapp SJ, Burke JM (2012) Development of a 10,000 locus genetic map of the sunflower genome based on multiple crosses. *G3* 2: 721-729.
- Brahm L, Hahn V, Rocher T, Friedt W (2000) Molecular markers as a tool in breeding for resistance against sunflower downy mildew. *Int. Sunflower Association, Paris*, p J43-J48.
- Burke JM, Knapp SJ, Rieseberg LH (2005) Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics* 171: 1933-1940.
- Chamnanpant J, Shan W-X, Tyler BM (2001) High frequency mitotic gene conversion in genetic hybrids of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Proc National Academy of Science* 98: 14530-14535.
- Crites GD (1993) Domesticated Sunflower in Fifth Millennium B.P. Temporal Context: New Evidence From Middle Tennessee. *American Antiquity* 58: 146-148.
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826–833.
- Daniel IO, Adetumbi JA, Oyelakin OO, Olakojo SA, Ajala MO, Onagbesan SO (2012) Application of SSR markers for genetic purity analysis of parental inbred lines and some commercial hybrid maize (*Zea mays* L.). *Am J Exp Agric* 2: 597-606.
- de Romano A, Romano C, Bulos M, Altieri E, Sala C (2010) A new gene for resistance to downy mildew in sunflower. *Proc 8th European Sunflower Biotechnology Conference, Antalya*, pp 141–146.
- Dehmer KJ, Friedt W (1998) Evaluation of different microsatellite motifs for analysing genetic relationships in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breed* 117: 45-48.
- Delmotte F, Giresse X, Richard-Cerver S, M'Baya J, Vear F, Tourvieille J, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D (2008) Single nucleotide polymorphisms reveal

- multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infect Genet Evol* 8: 534–540.
- Dimitrijević A, Imerovski I, Miladinović D, Tančić S, Dušanić N, Jocić S, Miklič V (2010) Use of SSR markers in identification of sunflower isogenic lines in late generations of backcrossing. *Helia* 33: 191-198.
- Doebley JF, Gaut BS, Smith BD (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1321.
- Dužle CM, Hahn V, Knapp SJ, Bauer E (2004) *Pl_{arg}* from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower. *Theor Appl Genet* 109: 1083-1086.
- EPPO/CABI (1997) *Plasmopara halstedii*. In: Smith I, McNamara D, Scott P, Holderness M (eds) Quarantine pests for Europe, vol 2. CABI International, Wallingford, 1425.
- Érsek T, English JT, Scholz JE (1995) Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology* 85: 1343-1347.
- Érsek T, Nagy ZA (2008) Species hybrids in the genus *Phytophthora* with emphasis on the alder pathogen *Phytophthora alni*: a review. *Eur J Plant Pathol* 122: 31-39.
- Fernández-Martínez J, Melero-Vara J, Muñoz-Ruz J, Ruso J, Domínguez J (2000) Selection of wild and cultivated sunflower for resistance to a new broomrape race that overcomes resistance of the gene. *Crop Sci* 40: 550-555.
- Fesenko IA, Kuklev MY, Karlov GI (2012) Development of a breeder-friendly functional codominant DNA marker for the *I₂* locus covering resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Mol Breed* 31: 495–499.
- Fick GN, Miller JF (1997) Sunflower Breeding. In: Schneiter AA (ed) *Sunflower Technology and Sunflower Production*. Madison, Wisconsin, USA, pp 395-441.
- Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.

- Francia E, Tacconi G, Crosatti C, Barabaschi D, Bulgarelli D, Dall'Aglio E, Vale G (2005) Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tiss Org* 82: 317-342.
- Friskop A, Markell S, Gulya T (2009) Downy Mildew. <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/rowcrops/pp1402.pdf>
- Fusari CM, Lia VV, Nishinakamasu V, Zubrzycki JE, Puebla AF, Maligne AE, Paniego NB (2011). Single nucleotide polymorphism genotyping by heteroduplex analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Mol Breed* 28: 73-89.
- Ganal MW, Young ND, Tanksley SD (1989) Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the Tm-2a region of chromosome 9 in tomato. *Mol Gen Genet* 215: 395-400.
- Gedil MA, Slabaugh MB, Berry S, Johnson R, Michelmore R, Miller J, Gulya T, Knapp SJ (2001) Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene *Pl₁*. *Genome* 44: 205-212.
- Gentzbittel L, Mouzeyar S, Badaoui S, Mestries E, Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P (1998) Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower *Helianthus annuus* L. *Theor Appl Genet* 96: 519-525.
- Gentzbittel L, Vear F, Zhang YX, Berville' A, Nicolas P (1995) Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 90: 1079-1086.
- Gentzbittel LX, Zhang Y, Vear F, Griveau B, Nicolas P (1994) RFLP studies of genetic relationships among inbred lines of the cultivated sunflower, *Helianthus annuus* L.: evidence for distinct restorer and maintainer germplasm pools. *Theor Appl Genet* 89: 419-425.
- Gulya TJ (1992) Native American variety may provide sunflower crop with crucial resistance. *NPGS Network News* 8: 29-30.
- Gulya TJ (2007) Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world: Advances in downy mildew research. Palacky University and JOLA Publishers 3: 121-134.
- Gulya TJ, Markell S, McMullen M, Harveson B, Osborne L (2011) New virulent races of downy mildew: distribution, status of DM-resistant hybrids, and USDA

- sources of resistance. Proc 33th Sunflower Research Forum, Fargo ND, http://www.sunflowernsa.com/uploads/resources/575/gulya_virulentrac esdownymildew.pdf
- Gulya TJ, Sacksston WE, Virany F, Mašierević S, Rashid KY (1991) New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. J Phytopathol 132: 303-311.
- Gulya TJ, Tourvieille LD, Maširević S, Penaud A, Rashid K, Viranyi F (1998) Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). ISA Symposium III Sunflower Downy mildew, Fargo ND, pp 130-136.
- Gupta SK, Charpe A, Prabhu KV, Haque QMR (2006) Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. Theor Appl Genet 113: 1027-1036.
- Hadživuković S (1973) Statistički metodi s primenom u poljoprivredi i biološkim istraživanjima. Radnički univerzitet „Radivoj Ćirpanov“, Novi Sad.
- Hahn V, Wieckhorst S, Hu J, Seiler G, Kole C (2010) Mapping and tagging of simply inherited traits. Genetics, Genomics and Breeding Series: Sunflower. In: Hu J, Seiler G, Kole C (eds) Genetics, genomics and breeding of sunflower. Science Publishers, Enfield, NH, pp 111-133.
- Heesacker A, Kishore VK, Gao W, Tang S, Kolkman JM, Gingle A, Matvienko M, Kozik A, Michelmore RM, Lai Z, Rieseberg LH, Knapp SJ (2008) SSRs and INDELS mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility. Theor Appl Genet 117: 1021-1029.
- Herbette S, Lenne C, de Labrouhe DT, Drevet JR, Roeckel-Drevet P (2003) Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase. Physiol Plant 119: 418-428.
- Hermanns M, Slusarenko AJ, Schlaich NL (2003) Organ specificity in a plant disease is determined independently of R gene signalling. Mol Plant Microbe In 16: 752-759.

- Hittalmani S, Parco A, Mew TV, Zeigler RS, Huang N (2000) Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. *Theor Appl Genet* 100: 1121-1128.
- Hu J (2010) Genetic Linkage Maps: Strategies, Resources and Achievements. Genetics, Genomics and Breeding Series: Sunflower. In: Hu J, Seiler G, Kole C (eds) Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. Science Publishers, Enfield, NH, pp 79-109.
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q (2001) Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Ann Rev Phytopathol* 39:285-312.
- Hulke BS, Miller JF, Gulya TJ, Vick BA (2010) Registration of the oilseed sunflower genetic stocks HA 458, HA 459, and HA 460 possessing genes for resistance to downy mildew. *J Plant Reg* 4: 93.
- Imerovski I, Dimitrijević A, Miladinović D, Dedić B, Jocić S, Kovačević B, Obreht D (2013) Identification of PCR markers linked to different *Or* genes in sunflower. *Plant Breed* 132: 115-120.
- Iqbal MA, Sadaqat HA, Khan IA (2008) Estimation of genetic diversity among sunflower genotypes through random amplified polymorphic DNA analysis. *Gen Mol Res* 7: 1408-1413.
- Jan CC, Fernandez-Martinez JM, Ruso J, Munoz-Ruz J (2002) Registration of four sunflower germplasms with resistance to *Orobanche cumana* race F. *Crop Sci* 42: 2217-2218.
- Jan CC, Quresh Z, Gulya TJ (2004a) Registration of seven rust resistant sunflower germplasms. *Crop Sci* 44: 1887-1888.
- Jan CC, Seiler GJ (2007) Sunflower. In: Singh RJ (ed) Genetics Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, vol 4, Oilseed Crops. CRC Press, NY, USA, pp 103-165.
- Jan CC, Tan AS, Gulya TJ (2004b) Registration of four downy mildew resistant sunflower germplasms. *Crop Sci* 44: 1887.
- Jasnić S, Maširević S (2006) Plamenjača suncokreta (*Plasmopara halstedii*). *Biljni lekar* 34: 315-318.
- Jocić S (2002) Nasleđivanje komponenti prinosa kod suncokreta (*Heliantus annuus* L.). Doktorska teza, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

- Jocić S, Cvejić S, Hladni N, Miladinović D, Miklič V (2010) Development of sunflower genotypes resistant to downy mildew. *Helia* 33: 173-180.
- Jocić S, Miladinović D, Imerovski I, Dimitrijević A, Cvejić S, Nagl N, Kondić-Špika A (2012) Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower. *Helia* 35: 61-72.
- Jocić S, Saftić-Panković D, Hladni N, Cvejić S, Radeka I, Miklič V (2009) Oplemenjivanje na otpornost prema plamenjači suncokreta. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo 46: 181-188.
- Kamoun S (2003) Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* 2: 191-199.
- Kinman ML (1970) New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. In: Proceedings of the 4th International Sunflower Conference, Memphis, pp 23-25.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.
- Krizmanić M, Mijić A, Liović I, Bilandžić M, Duvnjak T (2006) Sunflower breeding at the Agricultural Institute Osijek. *Helia* 29: 153-158.
- Kuhl JC, Hanneman RE, Havey MJ (2001) Characterization and mapping of *Rpi1*, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol Genet Genomics* 265: 977-985.
- Lafon S, Delos M, Raulic I, Tourvieille de Labrouhe D (2000) Bilan de dix années de surveillance du mildiou du tournesol en France. 15th Int Sunflower Conf Toulouse, France, pp 149-154.
- Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG (1995) The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *The Plant Cell Online* 7: 1195-1206.
- Lawson WR, Goulter KC, Henry RJ, Kong GA, Kochman JK (1998) Marker-assisted selection for two rust resistance genes in sunflower. *Mol Breed* 4: 227-234.
- Leclercq P (1969) Cytoplasmic male sterility in sunflower. *Ann Amelior Plant* 19: 99-106.

- Ling HQ, Qiu JW, Singh RP, Keller B (2004) Identification and genetic characterization of an *Aegilops tauschii* ortholog of the wheat leaf rust disease resistance gene *Lr1*. *Theor Appl Genet* 109: 1133-1138.
- Liu Z, Gulya TJ, Seiler GJ, Vick BA, Jan C-C (2012) Molecular mapping of the *Pl₁₆* downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-assisted selection in sunflower. *Theor Appl Genet* 125: 121-131.
- Marinković R, Dozet B, Vasić D (2003) Oplemenjivanje suncokreta. Školska knjiga, Novi Sad, str 367.
- Mauch-Mani B (2002) Host resistance to downy mildew diseases. *Advances in downy mildew research*. Springer Netherlands, 1-57.
- McMullen MD, Kresovich S, Villeda HS, Bradbury P, Li HH, Sun Q, Flint-Garcia S, Thornsberry J, Acharya C, Bottoms C, Brown P, Browne C, Eller M, Guill K, Harjes C, Kroon D, Lepak N, Mitchell SE, Peterson B, Pressoir G, Romero S, Rosas MO, Salvo S, Yates H, Hanson M, Jones E, Smith S, Glaubitz JC, Goodman M, Ware D, Holland JB, Buckler ES (2009) Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science* 325: 737-740.
- Michelmore R (2003) The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* 6: 1-8.
- Michelmore RW (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Nat Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- Michelmore RW (2003) The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* 6: 397-404.
- Michelmore RW, Meyers BC (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res* 8: 1113-1130.
- Miklić V, Hladni N, Jocić S, Marinković R, Atlagić J, Saftić-Panković D, Miladinović D, Dušanić N, Gvozdenović S. (2008) Oplemenjivanje suncokreta u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 45(1): 31-63.

- Miller JF (1992) Update on inheritance of sunflower characteristics. 13th Int Sunflower Conf, vol 2, Pisa, Italy, pp 905-945.
- Miller JF, Gulya TJ (1991) Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower. *Crop Sci* 31: 40-43.
- Miller JF, Gulya TJ, (1987) Inheritance of resistance to race 3 downy mildew in Sunflower. *Crop Sci* 27: 210-212.
- Miller JF, Gulya TJ, Seiler GJ (2002) Registration of five fertility restorer sunflower germplasms. *Crop Sci* 42: 989-991.
- Miller JF, Gulya TJ, Vick BA (2006) Registration of imidazolinone herbicide-resistant maintainer (HA 442) and fertility restorer (RHA 443) oilseed sunflower germplasms. *Crop Sci* 46: 483.
- Miller JF, Seiler GJ (2003) Registration of five oilseed maintainer (HA 429-HA 433) sunflower germplasm lines. *Crop Sci* 43: 2313-2314.
- Molinero-Ruiz ML, Dominguez J, Gulya TJ, Melero-Vara JM (2005) Reaction of field populations of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) to metalaxyl and mefenoxam. *Helia* 28: 65-74.
- Mouzeyar S, Delabrouhe DT, Vear F (1993) Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *J of Phytopathol* 139: 289-297.
- Mouzeyar S, Roeckel-Drevet P, Gentzbittel L, Philippon J, Tourvieille de Labroughe D, Vear F (1995) RFLP and RAPD mapping of the sunflower *Pl₁* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1. *Theor Appl Genet* 91: 733-737.
- Mouzeyar S, Tourvieille de Labroughe D, Vear F (1994) Effect of host-race combination on resistance of sunflower, *Helianthus annuus* L., to downy mildew *Plasmopara halstedii*. *J Phytopathol* 141: 249-258.
- Muller MH, Latreille M, Tollon C (2011) The origin and evolution of a recent agricultural weed: population genetic diversity of weedy populations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Spain and France. *Evol Appl* 4: 499-514.
- Mulpuri S, Liu Z, Feng J, Gulya TJ, Jan C-C (2009) Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, Pl13 in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 119: 795-803.

- Obreht D, Đan M, Tanurdžić M (2008) Molekularna genetika. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Panigo N, Echaide M, Muñoz M, Fernández L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Carrera M, Zandomeni R, Suárez EY, Hopp HE (2002) Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34-43.
- Panigo N, Heinz R, Fernandez P, Talia P, Nishinakamasu V, Hopp EH (2007) Genome mapping and molecular breeding in plants. vol 2, ch 4, In: Kole C (ed) Sunflower. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp 153 – 177.
- Panković D, Jocić S, Lačok N, Sakač Z, Škorić D (2004a) The use of PCR-based markers in the evaluation of resistance to downy mildew in NS-breeding material. *Helia* 27: 149-158.
- Panković D, Radovanović N, Jocić S, Satovic Z, Škorić D (2007) Development of co-dominant amplified polymorphic sequence markers for resistance of sunflower to downy mildew race 730. *Plant Breed* 126: 440-444.
- Panković D, Sakač Z, Jocić S, Škorić D. (2004b) Molekularni markeri u oplemenjivanju suncokreta, Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo 40: 301-311.
- Pashley CH, Ellis JR, McCauley DE, Burke JM (2006) EST databases as a source for molecular markers: lessons from *Helianthus*. *J Hered* 97: 381-388.
- Perez-Vich B, Berry ST (2010) Molecular breeding. Genetics, Genomics and Breeding Series: Sunflower. In: Hu J, Seiler G, Kole C (eds) Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. Science Publishers, Enfield, NH, pp 221-251.
- Pérez-Vich B, Velasco L, Fernández-Martínez JM (2004) QTL mapping of resistance to races E and F of broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in sunflower. Parasitic Plant Management in Sustainable Agriculture Meeting on Breeding for Orobanche Resistance in Sunflower, Bucharest, Romania, p 6.
- Perovic D, Förster J, Devaux P, Hariri D, Guilleroux M, Kanyuka K, Lyons R, Weyen J, Feuerhelm D, Kastirr U, Sourdille P, Roder M, Ordon F (2009) Mapping and diagnostic marker development for Soil-borne cereal mosaic virus resistance in bread wheat. *Mol Breeding* 23: 641-653.

- Permingeat HR, Romagnoli MV, Vallejos RH (1998) A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Plant Mol Biol Rep* 16: 1-6.
- Pierce BA (2010) *Genetics: A conceptual approach*. Macmillan. pp 1-400.
- Quresh Z, Jan CC, Gulya TJ (1993) Resistance to sunflower rust and its inheritance in wild sunflower species. *Plant Breed* 110: 297-306.
- Rachid Al-Chaarani G, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A (2002) A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor Appl Genet* 104: 490-496.
- Radwan O, Bouzidi MF, Mouzeyar S (2011) Molecular characterization of two types of resistance in sunflower to *Plasmopara halstedii*, the causal agent of downy mildew. *Phytopathology* 101: 970-979.
- Radwan O, Bouzidi MF, Nicolas P, Mouzeyar S (2004) Development of PCR markers for *Pl5/Pl8* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequence. *Theor Appl Genet* 109: 176-185.
- Radwan O, Bouzidi MF, Vear F, Philippon J, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Mouzeyar S (2003) Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to *Pl5/Pl8* locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theor Appl Genet* 106: 1438-1446.
- Radwan O, Gandhi S, Heesacker A, Whitaker B, Taylor C, Plocik A, Kesseli R, Kozik A, Michelmore RW, Knapp SJ (2008) Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBSLRR disease resistance proteins in sunflower. *Mol Genet Genomics* 280: 111-125.
- Radwan O, Mouzeyar S, Venisse JS, Nicolas P, Bouzidi MF (2005) Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyl. *J Exp Bot* 56: 2683-2693.
- Radwan O, Bouzidi MF, Nicolas P, Mouzeyar S (2004) Development of PCR markers for *Pl5/Pl8* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower,

- Helianthus annuus* L. From complete CC-NBS-LRR sequence. Theor Appl Genet 109:176-185.
- Radwan O, Bouzidi MF, Vear F, Philippon J, Tourvieille de Labrouh D, Nicolas P, Mouzeyar S (2003) Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to *Pl5/Pl8* locus for resistance to downy mildew in sunflower. Theor Appl Genet 106: 1438-1446.
- Radwan O, Gandhi S, Heesacker A, Whitaker B, Taylor C, Ploick A, Kesseli R, Kozik A, Michelmore RW, Knapp SJ (2008) Genetic diversity and genomic distribution of homologues encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. Mol Genet Genomics 280:111-125.
- Rahim M, Jan C-C, Gulya TJ (2002) Inheritance of resistance to sunflower downy mildew races 1, 2 and 3 in cultivated sunflower. Plant Breed 121: 57-60.
- Rieseberg LH, Baird SJE, Gardner KA (2000) Hybridization, introgression, and linkage evolution. Plant Mol Biol 42: 205-224.
- Roeckel-Drevet P, Gagne G, Mouzeyar S, Gentzbittel L, Philippon J, Nicolas P, Tourvieille de Labrouhe D, Vear F (1996) Colocation of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) resistance genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica 91: 225-228.
- Roeckel-Drevet P, Tourvieille J, Gulya TJ, Charmet G, Nicolas P, Tourvieille de Labrouhe D (2003) Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. Can J Microbiol 49: 492-502.
- Sackston WE (1990) A proposed international system for designating races of *Plasmopara halstedii*. Plant Dis 74: 721-723.
- Sakr N (2010) Studies on pathogenicity in *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). Int J Life Sci 4: 48-59.
- Seiler GJ (2007) Wild annual *Helianthus anomalus* and *H. deserticola* for improving oil content and quality in sunflower. Ind Crop Prod 25: 95-100.
- Seiler GJ, Christie BR, Choo TM (1991) Registration of 13 downy mildew tolerant interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species. Crop Sci 31: 1714-1716.

- Singh KB, Ocampo B (1997) Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. *Theor Appl Genet* 95: 418-423.
- Singh S, Sidhu JS, Huang N, Vikal Y, Li Z, Brar DS, Dhaliwal HS, Khush GS (2001) Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor Appl Genet* 102: 1011-1015.
- Slabaugh MB, Yu J-K, Tang S, Heesacker A, Hu X, Lu G, Bidney D, Han F, Knapp SJ (2003) Haplotyping and mapping a large cluster of downy mildew resistance gene candidates in sunflower using multilocus intron fragment length polymorphisms. *Plant Biotechnol J* 1:167-85.
- Spring O, Bachofer M, Thines M, Riethmüller A, Göker M, Oberwinkler F (2006) Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity. *Eur J Plant Pathol* 114: 309-315.
- Spring O, Zipper R (2000) Isolation of oospores of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, and microscopical studies on oospore germination. *J Phytopathol* 148: 227-231.
- Stojanović DS (2004) Poljoprivredna fitopatologija, Srpsko biološko društvo „Stevan Jakovljević“, Kragujevac, str 1-777.
- Škorić D (1988) Sunflower breeding. *Uljarstvo* 25: 1-90.
- Škorić D, Jocić S, Jovanović D, Marinković R, Hladni N, Atlagić J, Panković D, Vasić D, Miladinović F, Gvozdenović S, Terzić S, Sakač Z (2006) Dostignuća u oplemenjivanju suncokreta, Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo 42: 131-172.
- Tang S, Yu J-K, Slabaugh B, Shintani K, Knapp J (2002) Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor Appl Genet* 105: 1124-1136.
- Tourvieille de Labrouhe D, Gulya TJ, Maširević S, Penaud A, Rashid KY, Viranyi F (2000) New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). Proceedings, International Sunflower Conference, Toulouse, vol II, I-61-66.
- van Daelen RA, Gerbens F, van Ruissen F, Aarts J, Hontelez J, Zabel P (1993) Long-range physical maps of two loci (*Aps-1* and *GP79*) flanking the root-knot

- nematode resistance gene (Mi) near the centromere of tomato chromosome 6. *Plant Mol Biol* 23: 185-192.
- Van Ooijen JW (2006) JoinMap_ 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen.
- Varshney A, Mohapatra T, Sharma RP (2005) Molecular mapping and marker assisted selection of traits for crop improvement. In: *Plant biotechnology and molecular markers*. Srivastava PS, Narula A, Srivastava (eds), Springer, Netherlands, pp 289-330.
- Vasić D, Miladinović J, Berville A, Škorić D (2003) Variability of *Helianthus maximiliani* Schrader revealed by RAPD analysis. *Plant Gen Resour Newsl* 133: 13-15.
- Vear F (2010) Classic genetics and Breeding. In: *Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower*. Jinguo, H, Seiler, G, Kole, C. (eds), Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp 51-78.
- Vear F, Gentzbittel L, Philippon J, Mouzeyar S, Mestries E, Roedel-Drevet P, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P (1997) The genetics of resistance to five races of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 95: 584-589.
- Vear F, Serre F, Jouan-Dufournel I, Bert PF, Roche S, Walser P, Tourvieille de Labrouhe D, Vincourt P (2008) Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 64: 561-570.
- Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, Miller J (2003) Inheritance of the wide-range downy mildew resistance in the sunflower line RHA 419. *Helia* 26: 19-24.
- Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, Roche S, Boniface MC, Bordat A, Vincourt P (2012) Genetic analysis of the sunflower downy mildew resistance gene *Pl₂*. http://www.asagir.org.ar/asagir2008/buscar_congreso_indice_4_1.asp
- Virányi F (2002) The sunflower-*Plasmopara halstedii* pathosystem: natural and artificially induced coevolution. *Advances in Downy Mildew Research* 1: 167-172.
- Viranyi F, Spring O (2011) Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology* 129: 207-220.

- Vranceanu V, Stoenescu F (1970) Immunity to sunflower downy mildew due to a single dominant gene. *Probl Agric* 22: 34–40.
- Vranceanu VL, Pirvu N, Stoenescu FM (1981) New sunflower downy mildew resistance genes and their management. *Helia* 4: 23-27.
- Wei F, Gobelman-Werner K, Morroll SM, Kurth J, Mao L, Wing R, Leister D, Schulze-Lefert P, Wise RP (1999) The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* 153: 1929–1948.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115.
- Wieckhorst S, Bachlava E, Dußle CM, Tang S, Gao W, Sasaki C, Knapp SJ, Schön CC, Hahn V, Bauer E (2010) Fine mapping of the sunflower resistance locus *Pl_{arg}* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus*. *Theor Appl Genet* 121: 1633–1644.
- Yu J-K, Tang S, Slabaugh MB, Heesacker A, Cole G, Herring M, Soper J, Han F, Chu W, Webb DM, Thompson L, Edwards KJ, Berry S, Leon AJ, Grondona M, Olungu C, Maes N, Knapp SJ (2003) Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci* 43: 367–387.
- Zimmer DE, Kinman ML (1972) Downy mildew resistance in cultivated sunflower and its inheritance. *Crop Sci* 12: 749–751.

PRILOG 1 - 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 2 - 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 3 - Pufferi za elektroforetsko razdvajanje

5xTBE puffer:

- 50 ml 0.2 M EDTA
- 54 g Tris (Trizma base Sigma 7-9)
- 27,5 g borne kiseline
- H₂O do 1l zapremine

1xTBE puffer:

Puffer za elektroforetsko razdvajanje razblažiti 5 x do radne koncentracije od 1x.

BIOGRAFIJA

Ivana Imerovski je rođena u Kilhbergu u Švajcarskoj, 26.03.1987. godine. Nakon završene gimnazije „Jovan Jovanović Zmaj“, 2005. godine je upisala Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer Molekularna biologija. Osnovne studije završila je sa prosečnom ocenom 9,54 i diplomski rad na temu „Biljni hormoni i molekularni mehanizam njihovog delovanja“ odbranila je 2009. godine sa ocenom 10.

Školske 2009/2010 godine, upisala je master studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, smer Molekularna biologija. Ispite je položila sa prosečnom ocenom 9,62, a master rad pod naslovom „Primena mikrosatelita u detekciji otpornosti suncokreta prema volovodu“ odbranila 09.10.2010. godine sa ocenom 10.

Odmah po završetku master studija upisuje doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu. Sve ispite predviđene planom i programom prve godine položila je sa prosečnom ocenom 9,50.

Tokom studija je bila stipendista Ministarstva prosvete i sporta, Fonda za mlade talente Republike Srbije, kao i fondacije DAAD. Dobitnik je Fakultetske i Univerzitetske nagrade za uspeh tokom studiranja. Leta 2007. boravila je na stručnoj praksi u Bernu, u kompaniji za biobezbednost i sigurnost “Teckrisk” gde je učestvovala na istraživačkom projektu razvoja mera biosigurnosti u mikrobiološkim laboratorijama visokog rizika pod rukovodstvom dr Peter Manija. Četvrtu godinu studija završila je na Univerzitetu u Aveiru u Portugalu, kao stipendista Pokrajnskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj, a u okviru programa „Campus Europae“.

Od novembra 2009. godine Ivana Imerovski je zaposlena u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo kao istraživač-pripravnik, a od februara 2011. kao istraživač-saradnik za naučnu oblast Genetika i oplemenjivanje biljaka. Angažovana je na projektu Ministrastva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom „Razvoj novih sorti i poboljšanja novih tehnologija proizvodnje uljanih biljnih vrsta za različite namene“, TR 31025.

Član je FESPB (The Federation of European Societies of Plant Biology).

Tečno govori engleski i nemački jezik, a služi se portugalskim i španiskim.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Имеровски

Број индекса или пријаве докторске дисертације Број индекса 10/24

Изјављујем

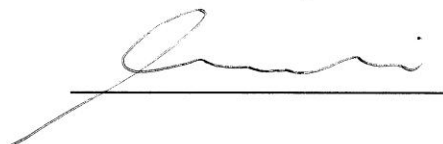
да је докторска дисертација под насловом:

„Употреба молекуларних маркера у детекцији гена отпорности Plarg на пламењачу код сунцокрета“

- 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.

Потпис докторанта

У Београду, 02.12.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Ивана Имеровски

Број индекса или пријаве докторске дисертације Број индекса 10/24

Студијски програм Пољопривредне науке, Ратарство и повртарство

Наслов докторске дисертације „Употреба молекуларних маркера у детекцији гена
отпорности Plarg на пламењачу код сунцокрета“

Ментор проф. др Гордана Шурлан - Момировић

Потписани/а Ивана Имеровски

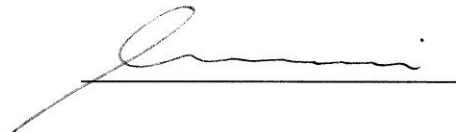
Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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.

Потпис докторанта

У Београду, 02.12.2013.



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 у детекцији гена отпорности Plarg на пламењачу код сунцокрета“

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).

Потпис докторанта

У Београду, 02.12.2013.

