

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Наташа Ж. Турчић

**НАСЛЕЂИВАЊЕ И ЕКСПРЕСИЈА
ГЕНА УКЉУЧЕНИХ У ОТПОРНОСТ
СУНЦОКРЕТА (*Helianthus annuus* L.)
ПРЕМА ПЛАМЕЊАЧИ**

докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nataša Ž. Ćurčić

**INHERITANCE AND EXPRESSION OF
GENES INVOLVED IN RESISTANCE OF
SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) TO
DOWNY MILDEW**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Ментор:

др Светлана Радовић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Чланови комисије:

др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Весна Максимовић, научни саветник
Универзитет у Београду-Институт за молекуларну генетику и
генетичко инжењерство

др Дејана Панковић, редовни професор
Универзитет Едуконс, Факултет заштите животне средине,
Сремска Каменица

Датум одбране:

Ова докторска дисертација једним делом је урађена у Лабораторији за молекуларне маркере и физиологију стреса као и у Фитопатолошкој лабораторији Института за ратарство и повртарство из Новог Сада. Други део докторске дисертације урађен је у биотехнолошкој лабораторији Abiotech у Сремској Каменици и у лабораторији Факултета заштите животне средине Универзитета Едуконс у Сремској Каменици. Захваљујем се свим запосленим у наведеним лабораторијама који су ми на било који начин пружили подршку и помоћ у току израде ове дисертације.

Велику захвалност дугујем проф. др Дејани Панковић која ми је преносила своје научно знање и искуство. Захвална сам јој на несебичној помоћи у свакој фази израде овог рада.

Захвалност дугујем ментору проф. др Светлани Радовић као и члановима комисије проф. др Марини Стаменковић-Радак и др Весни Максимовић на ефикасности и корисним сугестијама које су допринеле квалитету ове дисертације.

Неизмерно сам захвална и породицама Радовановић и Ђурчић, које су у различитим фазама израде ове дисертације биле уз мене.

Мојој деци Новаку и Николи и мом супругу који су моја инспирација, охрабрење и ослонац, дугујем захвалност на стрпљивости и подршци.

НАСЛЕЂИВАЊЕ И ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА УКЉУЧЕНИХ У ОТПОРНОСТ СУНЦОКРЕТА (*Helianthus annuus* L.) ПРЕМА ПЛАМЕЊАЧИ

Резиме

У раду је испитан начин наслеђивања отпорности према патотипу пламењаче 730 код три популације сунцокрета. Инбред линија сунцокрета На26S, која је осетљива на патотип пламењаче 730, је укрштена са линијама ЈМ8, На338 и На26R које су донори гена *Pl* за отпорност према пламењачи. Након укрштања (На26SxЈМ8) произведене су 73 F₃ фамилије које су у овом испитивању коришћене као прва популација на којој је испитан начин наслеђивања отпорности према патотипу 730 пламењаче. Другу популацију чини 75 F₃ фамилија које су добијене из укрштања (На26SxНа338) а трећу популацију чине 73 F₃ фамилије добијене из укрштања (На26SxНа26R). Отпорност линија и њиховог F₃ потомства на пламењачу су анализирани на нивоу: процене отпорности користећи технику инокулације целог семена (примарна инфекција), као и процене отпорности на молекуларном нивоу.

Све биљке на којима није дошло до спорулације оцењене су као отпорне. У првој популацији, од свих оцењених F₃ фамилија 52 фамилије су биле отпорне, док је 21 фамилија била осетљива. Резултати теста отпорности у другој популацији показали су да је од свих оцењених F₃ фамилија, 56 фамилија било отпорно а 19 фамилија су осетљиве према патотипу 730 пламењаче. У трећој популацији 54 F₃ фамилије оцењене су као отпорне а 19 као осетљиве. Резултати теста су потврдили да однос раздвајања отпорних и осетљивих F₃ фамилија одговара односу 3 : 1 у све три испитиване популације. На основу добијених резултата потврђено је да је отпорност на патотип пламењаче 730 контролисана једним геном.

F₃ фамилије су анализирани и на молекуларном нивоу користећи неколико PCR маркер система. Начин наслеђивања, тј однос раздвајања за неколико маркера за аналоге гена отпорности (Resistance Gene Analogues) и маркера CAPS, у три испитиване популације сунцокрета тестиран је χ^2 тестом. Тестирана је хипотеза да је однос RGA маркера у наслеђивању доминантно рецесиван, односно да је однос добијених фенотипова 3:1. Према добијеним резултатима ова хипотеза је прихватљива за све маркере RGA осим за НаP1R и то само у случају популације у којој је коришћена ЈМ8 линија сунцокрета као донор гена *Pl6*. У све три испитиване популације сви остали маркери се уклапају у доминантно – рецесиви тип наслеђивања, односно раздвајали су се у односу 3:1, без обзира на родитељске линије које су биле извори гена *Pl*. Маркери CAPS су се увек раздвајали у односу 1:2:1, односно наслеђују се кодоминантно.

Један од циљева овог рада је био да се утврди распоред доминантних хаплотипова RGA и кодоминантних CAPS маркера на „линкејџ” мапама *Pl6* региона сунцокрета у популацијама сунцокрета које су коришћене за мапирање. На „линкејџ” мапама добијеним на три испитиване популације за мапирање доминантних хаплотипова RGA и кодоминантних CAPS маркера, испитивани маркери су распоређени на генетичкој дистанци од ~5 до ~12 cM. Упркос разликама које постоје између мапа, распоред локуса и "линкиџ" раздаљине анализираних маркера су добро одржаване између мапа добијеним за три

различите мапирајуће популације. На основу добијених резултата може се закључити да кододоминантни CAPS маркери за отпорност сунцокрета према патотипу пламењаче 730 могу бити коришћени у маркер асистираној селекцији за ову особину, без обзира на родитељске линије које су коришћене као извори гена за отпорност. Међутим, резултати добијени у испитивању популације састављене од 37 RIL (Recombinant Inbred Lines) указују на то да се у *Pl6* геномском региону ипак јављају промене чак и у касним генерацијама самооплодне у току стварања биљака отпорних на пламењачу. У раду је показано да употреба једног доминантног и кододоминантних CAPS маркера ипак обезбеђује ефикасну идентификацију биљака отпорних на патотип пламењаче 730, без обзира на родитељске линије које се у почетном укрштању користе као извори или примаоци *Pl* гена.

Један од циљева овог рада је био да се испита експресија гена кандидата за отпорност испитиваног у првом делу, као и гена Насаох, Наохох, HaSODc, HaSODp, HaSOD1, Nchi, HaPR5, HaEDS1, HaEDR1 који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *Plasmopara halstedii*. У листовима младих биљака две линије сунцокрета, од којих је једна отпорна а друга осетљива према патотипу 730 пламењаче, праћена је експресија ових гена, у периоду 2-96 сати након секундарне инфекције спорама *P. halstedii*, односно након прскања водом у случају контролних биљака. Резултати добијени са Ha26R и Ha26S линијама сунцокрета указују да ген за отпорност који је проучаван у овом раду, има конститутивну експресију и у контролном и у третману инокулисаном суспензијом спора *P. halstedii*. Након анализе са рестрикционим ензимима показано је да у отпорној линији сунцокрета Ha26R, поред фрагмента који је конститутивно присутан код обе линије сунцокрета (~800bp), постоји још један додатни фрагмент који је исте величине, али му се секвенца разликује у неколико SNP-ова (Single Nucleotide Polymorphism) у односу на конститутивно присутан фрагмент. Претпоставка је да овај додатни фрагмент који је присутан само у отпорној линији Ha26R, обезбеђује овој линији отпорност на патотип 730 пламењаче.

Анализом експресије гена Насаох, Наохох, HaSODc, HaSODp, HaSOD1, chi, HaPR5, HaEDS1, HaEDR1 установљено је да је већина испитиваних гена имала конститутивну експресију која је израженија у отпорној линији сунцокрета. Експресија HaEDS1, Nchi, HaPR5, HaSODp, Насаох и Наохох код отпорне линије сунцокрета је сукцесивно повећана у раним фазама након инфекције. Највећа квантитативна разлика у експресији гена између отпорне и осетљиве линије сунцокрета након инфекције суспензијом спора *P. halstedii*, је индукција експресије HaPR5 гена у раним фазама након инфекције код отпорне линије. Добијени резултати показују да рани одговор биљака након секундарне инфекције узрочником пламењаче, одговара хиперсензитивном одговору.

Кључне речи: сунцокрет, *Plasmopara halstedii*, молекуларни маркери, *Pl6* геномски регион, секундарна инфекција, експресија гена

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Молекуларна физиологија биљака

УДК број: [582.998.16:665.347.8]:632.482.99(043.3)

INHERITANCE AND EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN RESISTANCE OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) TO DOWNY MILDEW

Abstract

The inheritance of resistance to race 730 of sunflower downy mildew, in three mapping populations, was investigated in this thesis. Sunflower inbred line Ha26S, who is susceptible to sunflower downy mildew race 730 was crossed with lines JM8, Ha338 and Ha26R donors of *Pl* resistance genes for resistance to downy mildew. After crosses (Ha26SxJM8) 73 F₃ families produced. These families were used as the first population for evaluation the inheritance of resistance to race 730 of sunflower downy mildew. The second populations represents 75 F₃ families that were produced from the initial cross (Ha26SxHa338), and third population consists of 73 F₃ families that were produced from the initial cross (Ha26SxHa26R). Resistance of lines and their F₃ progeny to downy mildew were analyzed using the whole seedling inoculation technique (primary infection) as well as on a molecular level.

All the plants who did not have symptoms of sporulation were evaluated as resistant. In the first population of all estimated F₃ families 52 families were resistant, while 21 families were susceptible. In the second population results of the test of resistance have shown that of all the estimated F₃ families, 56 families were resistant while 19 families are susceptible to downy mildew race 730. In the third population 54 F₃ families were evaluated as resistant and 19 as susceptible. The results of the χ^2 test confirmed that the segregation ratio of resistant to susceptible F₃ families fit a 3:1 ratio in all examined mapping populations. The data confirm that the resistance to downy mildew race 730 is controlled by a single gene.

The same material was studied on a molecular level by several PCR marker system. The inheritance of resistance i.e. the segregation of several RGA markers and CAPS markers in three mapping populations was tested by χ^2 test. We tested the hypothesis that the ratio of RGA markers in inheritance is dominant / recessive, or that the obtained ratio of phenotypes fit a 3: 1. According to the results, this hypothesis is acceptable for all markers except for the HaP1R, only in the case of the mapping population who containing JM8 sunflower line as the donor of *Pl6* gene. In all of three examined populations all other markers fit into the dominant - recessive type of inheritance, segregated in a 3:1 ratio, without regardless of the parental lines that were the sources of *Pl* genes. CAPS markers always segregated in a 1:2:1 ratio, i.e. have kodominant type of inheritance.

One of the goals of this study was to determine the distribution of dominant haplotypes RGA and codominant CAPS markers on linkage maps of *Pl6* genomic region in three sunflower mapping population. On linkage mapps determined in three sunflower mapping population, dominant haplotypes RGA and codominant CAPS markers are arranged on the genetic distance of ~ 5 to ~ 12 cM. Despite the differences that exist between maps, the loci order and linkage distances are well maintained between maps obtained for three different mapping population. Based on obtained results it can be concluded that codominant CAPS markers for the resistance of sunflower to downy mildew race 730 can be used in marker assisted selection for this trait, regardless of the parental lines used as sources of resistance genes. However, the results obtained in the sunflower population of 37 RIL (Recombinant Inbred Lines)

indicate that changes in the genomic *Pl6* region occur in the advanced generations in the course of breeding process. In this paper shown that the use of one dominant and codominant CAPS markers provide efficient identification of plants resistant to downy mildew race 730, regardless of the parental lines used as sources or acceptors of resistance genes.

One of the objective of this study was to investigate the expression of *Pl* gene candidate for resistance, as well as genes Hacaox, Haoxox, HaSODc, HaSODp, HaSOD1, Hachi, HaPR5, HaEDS1, HaEDR1 that are important in plant response to biotic stress caused by *Plasmopara halstedii* infection. The expression of TIR-NBS-LRR gene in the leaves of young plants was examined in response to secondary downy mildew infection. Changes in gene expression, in response to secondary infection with suspension of spore of *Plasmopara halstedii* (pathotype 730), were investigated in two sunflower lines in the time interval 2-96h after infection, in order to follow the early response of these genes to the infection with this pathogen. In the young leaves of two sunflower lines, where one is susceptible and the other resistant to sunflower downy mildew race 730, the expression of these genes was examined in the range 2-96 hours after secondary infection with spores of *P. halstedii*, or treatment with wather. The results obtained on sunflower line Ha26S and Ha26R indicate that gene for resistance was expressed in both healthy and infected susceptible and resistant line. It was shown that after the treatment with the restriction enzymes, in the resistant sunflower line Ha26R, in addition to the fragment that is constitutively present in both sunflower lines (~ 800bp), there is the additional transcript of the same size differing in few SNPs. This additional fragment which is present only in the resistant line Ha26R probably provides resistance to pathotype 730 of sunflower downy mildew. The analysis of gene expression Hacaox, Haoxox, HaSODc, HaSODp, HaSOD1, chi, HaPR5, HaEDS1, HaEDR1 was shown that most examined genes were constitutive with higher expression in resistant line. The expression of genes HaEDS1, Hachi, HaPR5, HaSODp, Hacaox Haoxox were sequentially upregulated in the early stages after infection in resistant line. The highest quantitative differences between resistant and susceptible line upon infection was early induction of HaPR5 gene in resistant line. Obtained results indicate that the early response of defense related genes to secondary downy mildew infection, resembles to hypersensitive-like reaction.

Key words: sunflower, *Plasmopara halstedii*, molecular markers, *Pl6* locus, secondary infection, gene expression

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Molecular physiology of plants

UDC number: [582.998.16:665.347.8]:632.482.99(043.3)

Садржај

1. Увод.....	1
1.1. <i>Helianthus annuus</i> L.	1
1.2. <i>Plasmopara halstedii</i>	2
1.3. Симптоми пламењаче.....	4
1.4. Патотипови пламењаче.....	6
1.5. Гени за отпорност на пламењачу (<i>Pl</i> гени).....	7
1.6. Типови популација које се користе за мапирање.....	11
1.7. Генетичке мапе сунцокрета.....	13
1.8. Молекуларни маркери и маркер асистирана селекција.....	13
1.8.1. CAPS маркери.....	14
1.9. Мапирани <i>Pl</i> гени.....	15
1.10. Гени за отпорност биљака према болестима (<i>R</i> гени).....	19
1.10.1. Аналоги гена за отпорност (RGA).....	20
1.11. Одговор биљака након инфекције узрочником пламењаче.....	21
1.11.1. Хиперсензитивна реакција и експресија гена након секундарне инфекције сунцокрета гљивом <i>P. halstedii</i>	22
2. Циљ рада.....	24
3. Материјал и методе.....	25
3.1. Биљни материјал коришћен у оцени наслеђивања отпорности и мапирање гена за отпорност према пламењачи.....	25
3.1.1. Гајење биљака и тест отпорности (примарна инфекција клијанаца сунцокрета).....	26
3.2. Биљни материјал коришћен за испитивање експресије гена важних у одговору биљака на стрес проузрокован инфекцијом гљивом <i>Plasmopara halstedii</i>	28
3.2.1. Секундарна инфекција сунцокрета.....	28
3.3. Изолација геномске ДНК и спектрофотометријско одређивање квалитета ДНК.....	29
3.4. Изолација и квантификација РНК.....	30

3.5. Услови умножавања фрагмената ДНК применом методе PCR.....	32
3.6. Дигестија PCR производа и мапирање RGA и CAPS маркера.....	33
3.7. Промене у <i>Pl6</i> геномском региону.....	34
3.8. Експресија гена важних у одговору биљака на стрес проузрокован инфекцијом патогеном <i>Plasmopara halstedii</i>	34
4. Резултати.....	37
4.1. Начин наслеђивања отпорности према пототипу 730 пламењаче.....	37
4.2. Наслеђивање маркера за аналоге гена отпорности на пламењачу у испитиваним мапирајућим популацијама сунцокрета.....	39
4.3. Скрининг RGA хаплотипова.....	46
4.3.1. Линкејд мапе <i>Pl6</i> региона сунцокрета	54
4.4. Промене у <i>Pl6</i> геномском региону у рекомбинантним инбред линијама сунцокрета.....	58
4.5. Оцена отпорности линија сунцокрета након секундарне инфекције суспензијом спора <i>Plasmopara halstedii</i>	63
4.6. Експресија гена за отпорност <i>Pl6</i> и гена важних у одбрамбеном одговору биљака на стрес у листовима две линије сунцокрета након секундарне инфекције.....	64
4.6.1. Испитивање присуства RGA за отпорност према патотипу пламењаче 730 у На26S и На26R линији сунцокрета.....	64
4.6.1.1. Експресија гена за отпорност <i>Pl6</i>	66
4.6.2. Експресија гена важних у одбрамбеном одговору биљака на стрес (секундарна инфекција суспензијом спора <i>Plasmopara halstedii</i>).....	69
5. Дискусија.....	74
5.1. Распрострањеност патотипова пламењаче.....	74
5.2. Начин наслеђивања отпорности према проузроковачу пламењаче.....	75
5.3. Аналоги гена за отпорност на пламењачу-поређење добијених резултата са резултатима аутора који су радили на истој проблематици.....	76
5.4. <i>Pl6</i> геномски регион сунцокрета.....	77
5.5. Експресија гена кандидата за отпорност према патотипу 730 пламењаче.....	79

5.6. Експресија гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом <i>P. halstedii</i>	81
6. Закључци.....	86
7. Литература.....	89
Прилог 1.....	101
Прилог 2.....	103
Биографија.....	105

СКРАЋЕНИЦЕ

A-апсорбанца

AFLP - (Amplified Fragment Length Polymorphism) – полиморфизам дужине амплификованих фрагмената

BC (backcross)- повратно укрштање

bp - базни пар

BSA - бовин серум албумин

CaOx – карбохидрат оксидаза

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) - сечене амплификоване полиморфне секвенце

cDNK - комплементарна ДНК

chi- хитиназа

CLI (Cotiledon Limited Infection) - инфекција лимитирана на котиледон

cM – центиморган

cms – цитоплазматска мушка стерилност

СТАВ - цетил-триметил-амонијум-бромид

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

DH (double haploids) - дупли хаплоиди

dNTP - дезоксирибонуклеотид трифосфат

EDTA - етилен-диамин-тетра сирћетна киселина

grx - глутатион пероксидаза

HR (Hypersensitive Response) -хиперсензитивни одговор

IFLP (Intron Fragment Length Polymorphism) - полиморфизам дужине интронских фрагмената

kb - кило база

LG (Linkage Group) - група везаних гена

MAS - маркер асистирана селекција

NIL (Near Izogenic Line) - изогене линије

NO - азот моноксид

Ox Ox - оксалат оксидаза

P - вероватноћа

PAL - фенилаланин амонијум лиаза

PCR (Polymerase Chain Reaction) - ланчана реакција полимеразе

PR (Pathogenesis-Related) - гени који се активирају у процесу патогенезе

PD (Programmed cell Death)-програмирана ћелијска смрт

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) - полиморфизам насумично амплификоване ДНК

ROS (Reactive Oxygen Species) - реактивне кисеоничне врсте

RGA (Resistance Gene Analogues) - аналози гена за отпорност

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) - полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената

RIL (Recombinant Inbred Lines) - рекомбинантне инбред линије

РНК - рибонуклеинска киселина

SAR (Systemical Acquired Resistance) - системска стечена отпорност

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)–варијација у једном нуклеотиду

SOD - супероксид дисмутаза

SSR (Simple Sequence Repeat)-поновци кратких секвенци ДНК

TBE - трис борат ЕДТА пуфер

Tm - температура топљења

Tris-HCl- трис (хидроксиметил) аминометан хидрохлорид

UV – ултравиолетна светлост

1. УВОД

1.1. Сунцокрет (*Helianthus annuus* L.)

Сунцокрет (*Helianthus annuus* L.) је једна од најважнијих уљаних култура. У XVI веку пренет је из Северне Америке у Европу. Први писани документ о сунцокрету у Европи потиче из 1567. године. Ботанички је први пут описан под називом "цвет сунца", и тај назив, уз мање измене, остао је до данас. Дуго је гајен као украсна и баштенска биљка, првенствено због веома декоративних цветова. У Србији, као ратарска уљана култура, прво се почео гајити у Војводини. Са открићем цитоплазматске мушке стерилности (cms) (Leclercq, 1969), са гајења сорти прешло се на гајење хибридног сунцокрета. У периоду од 1981. до 1984. године, површине на којима се гајио сунцокрет у нашој земљи, биле су у паду због појаве нових врста патогених обољења, првенствено болести коју проузрокује гљива *Phomopsis helianthi*. Увођењем у производњу нових хибрида који су високо толерантни према овом патогену и применом хемијске заштите фунгицидима у току вегетације, већ у 1985. години дошло је до повећања површина и приноса под сунцокретом (Škorić, 1992).

Све врсте сунцокрета спадају у род *Helianthus*, поткласу *Helianthinae*, фамилија *Asteraceae* (*Compositae*). У роду *Helianthus* постоји 49 врста и 19 подврста, са 12 једногодишњих и 37 вишегодишњих, изразито странооплодних врста. Овај род претставља полиплоидни комплекс који садржи диплоидне ($2n = 34$), тетраплоидне ($4n = 68$) и хексаплоидне ($6n = 102$) врсте, све са основним бројем хромозома $n = 17$. Анеуплоидија је такође примећена у овом роду, а најчешћи случајеви су са $2n = 28$ хромозома.

Први забележен покушај међуврсног укрштања гајеног сунцокрета са дивљим врстама у циљу повећања отпорности на болести је извршен почетком XX века. Због уочене међуврсне компатибилности у роду *Helianthus* и дивљих врста сунцокрета које су извори отпорности на патогене, приступило се међуврсном укрштању као најефикаснијем начину борбе против нових патогена.

Према подацима из литературе сунцокрет напада више од четрдесет разних проузроковача болести, али је њихов број и значај за производњу различит (Аџимовић, 1988). Одређен број патогена је од економског значаја у производњи ове уљарице. Највеће смањење приноса и квалитета сунцокрета проузрокује пламењача (проузроковач-*Plasmopara halstedii*), сиво-мрка пегавост (проузроковач-*Phomopsis helianthi*), бела трулеж (проузроковач-*Sclerotinia sclerotiorum*), вертицилиозно увенуће (проузроковач-*Verticillium sp.*), сива трулеж (проузроковач-*Botrytis cinerea*), мрка пегавост (проузроковач-*Alternaria helianthi*) и паразитне цветнице из рода *Orobanche*.

Пламењача сунцокрета је једна од најдеструктивнијих болести гајеног сунцокрета (*Helianthus annuus* L.). Проузроковач овог обољења је *Plasmopara halstedii*. Пламењача је болест која је од изузетног економског значаја у производњи ове уљарице, јер доводи до драстичног смањења приноса и квалитета сунцокрета. Ова болест може бити контролисана применом фунгицида или гајењем отпорних генотипова. Пошто примена фунгицида доприноси појави нових отпорних патотипова *Plasmopara halstedii*, повећава трошкове производње и загађује животну средину, гајење отпорних генотипова и уношење више гена отпорности (гена *Pl*) у генотипове гајеног сунцокрета су главни циљеви у програмима оплемењивања сунцокрета.

1.2. *Plasmopara halstedii*

Пламењача сунцокрета је веома опасно и раширено обољење. Проузроковач је *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni., са синонимом *Plasmopara helianthi* Novot. *Plasmopara halstedii* је облигатни паразит, који припада роду *Plasmopara*, фамилији *Peronosporaceae*, реду *Peronosporales*, класи *Oomycetes*.

Поред сунцокрета (*Helianthus annuus*), ова гљива може напасти и друге родове и врсте из субфамилије *Asteroideae* и *Cichorioideae* из фамилије *Compositae*. На основу многобројних фитопатолошких и морфолошких проучавања *Plasmopara halstedii*, дошло се до закључка да је ова гљива биолошки

комплекс који се састоји од три врсте: *Plasmopara helianthi* форма *helianthi*, која је специјализована само на једногодишњим врстама рода *Helianthus*; *Plasmopara helianthi* форма *perennis* и *Plasmopara helianthi* форма *ratens*, које егзистирају на вишегодишњим врстама рода *Helianthus*.

На инфицираним биљкама сунцокрета *Plasmopara halstedii* почиње и завршава свој циклус развића. Она у свом циклусу развића ствара вегетативне органе—мицелију, конидиофоре и конидије (зооспорангије). У зооспорангијама се формирају покретне зооспоре које обављају инфекцију биљака. У зони инфекције прво се формирају наведени вегетативни органи, а нешто касније и полни органи ооспоре. Ооспоре служе као органи за презимљавање и обављање примарне заразе младих биљака сунцокрета на пролеће наредне године. Ооспоре које су презимеле у земљишту, у зараженим остацима сунцокрета, клијају у пролеће у влажном земљишту ослобађајући више двотрепљастих зооспора које су неправилног облика. Оне обављају примарну заразу корена младих, тек изниклих биљака сунцокрета. Влажност и температура су најзначајнији фактори спољашње средине који утичу на инфекцију и њено ширење. Обилне падавине или интензивно наводњавање су предуслов за иницијацију примарне инфекције, нарочито за време прве 2-3 недеље након сетве (Zimmer и Hoes, 1978). Старост биљке је такође битна за успешност инфекције. Уколико се инфекција појави у раним фазама онтогенезе, симптоми болести у биљци ће бити израженији.

1.3. Симптоми изазвани патогеном *Plasmopara halstedii*

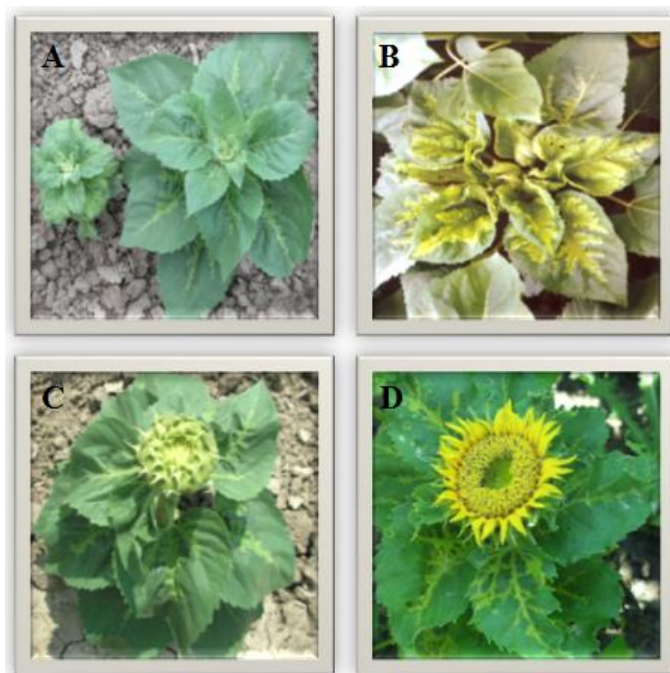
Симптоми обољења се јављају у два основна типа, тј. као системска и локализована зараза. Зараза корена, клијанаца или младих биљака сунцокрета испољава се системском заразом, док се локална зараза јавља код старијих биљака, као секундарна инфекција (Маширевић и Јаснић, 2006). Примарна инфекција се обавља приликом клијања семена у земљишту и ницања младих биљака сунцокрета. У случају примарне инфекције симптоми пламењаче јављају се на котиледонима одмах након ницања. Примарна инфекција може потицати од мицелије или ооспора гљиве које се налазе у засејаном зараженом семену, или од ооспора гљиве које се налазе у земљишту на коме је засејано здраво семе. Број оболелих биљака зависи од количине инфективног материјала на семену и земљишту. Највећи број оболелих биљака добија се ако се засеје заражено семе у заражено земљиште.

У раду Viranyi и Gulya (1996) аутори наводе постојање 3 типа отпорности на пламењачу. То су: имунитет (R), ограничена инфекција хипокотила - HLI (eng. hypocotyl limited infection) и ограничена инфекција котиледона - CLI (eng. cotyledon limited infection). У случају HLI, симптоми обољења се јављају у виду мањег пораста надземног дела и корена. За CLI је карактеристично да до спорулације долази само на котиледонима, док се симптоми болести не појављују на правим листовима (Ljubish и Gulya, 1988).

У радовима (Mouzeyar и сар., 1994; Radwan и сар., 2005, 2011; Gascuel и сар., 2015) се наводи да код сунцокрета постоје два типа отпорности према проузроковачу пламењаче. То су тип I и тип II отпорности. Код типа I отпорности раст патогена је ограничен и инфекција се задржава у базалном региону хипокотила, док у случају отпорности типа II патоген може доспети и до котиледона.

Биљке које су инфициране пламењачом су патуљастог раста, имају скраћене интернодије и насађене главице (Сл. 1). На инфицираним биљкама запажају се разне деформације на корену, стаблу, лишћу, глави, цветним деловима и семену. Симптоми ове болести се често манифестују на листу, у виду хлорозе на лицу листова, док се на наличју листова може запазити беличаста

навлака коју чине мицелија, конидиофоре и конидије гљиве (Dužle и сар., 2004). Гљива се у биљкама развија интерцелуларно на свим деловима изниклих биљака. Ова гљива, која је облигатни паразит, храни се на рачун инфицираних биљака одузимајући асимилате и воду од њих, па зато оне заостају у порасту у односу на здраве биљке (Аћимовић, 1998; Маринковић и сар., 2003; Јаснић и Маширевић, 2006). У оболелим биљкама долази до поремећаја циркулације воде и асимилата. Као резултат деловања паразита настају ензими који уништавају нормални метаболизам и протоплазму инфицираних биљака, чиме се смањује садржај воде у биљкама. Нагло се повећава транспирација и смањује ниво угљених хидрата, а повећава нагомилавање калијума и фосфора у лишћу оболелих биљака сунцокрета. У оболелим биљкама прво долази до поремећаја у њиховој физиологији, што се јасно манифестује на појединим деловима или целој биљци, у виду различитих, напред описаних симптома болести.



Слика 1. Симптоми пламењаче: А. инфициране младе биљке су закржљале, В. листови су хлоротични, С. инфициране биљке имају скраћене интернодије и насађене главице, Д. главе инфицираних биљака носе мање семена - (модификовано) према

https://www.google.rs/search?q=symptoms+of+downy+mildew+of+sunflower&rlz=1C1AVNC_enRS577RS596&espv=2&biw=1366&bih=599&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiAqt633ZPOAhWJ_ywKHTGEBJMQ_AUIBigB#tbm=isch&q=downy+mildew+sunflower

1.4. Патотипови пламењаче

Plasmopara halstedii је позната као паразит на сунцокрету већ више од 100 година. Иако је биологија овог патогена углавном проучена и позната, радикално решавање проблема које *Plasmopara halstedii* наноси на гајеном сунцокрету започело је тек пре тридесетак година, када су детерминисане прве физиолошке расе (патотипови) пламењаче. То је омогућило да данас имамо хибриде сунцокрета који су отпорни на већину познатих патотипова пламењаче. Са стварањем нових отпорних хибрида и њиховим гајењем, долази и до појаве нових патотипова пламењаче. У тежњи да савладају отпорност гајених генотипова сунцокрета, појављују се нови агресивнији и вирулентнији патотипови пламењаче. Успешна производња сунцокрета захтева сталну контролу патотипова ове гљиве у циљу благовремене идентификације појаве нових агресивнијих и вирулентнијих патотипова. Интернационална номенклатура патотипова пламењаче усвојена је 1998. године (Gulya и сар., 1998; Tourvieille и сар., 2000b). Упоредни преглед номенклатура патотипова пламењаче приказан је у Табели 1.

Табела 1. Упоредни преглед номенклатура патотипова пламењаче (интернационална, француска и америчка), (Tourvieille и сар., 2000b) модификовано

Интернационална номенклатура	100	300	310	330	700	703	710	711	730	770
Француска номенклатура	1	D			C	B	A			
Америчка номенклатура	1	2	6	7 и 9	3	10	8	11	4	5

Појава нових патотипова пламењаче је стална опасност за производњу сунцокрета. Описано је више од 35 патотипова пламењаче (Gulya и сар., 2007). У Србији је све до 1990. године био присутан само патотип 1(100). Међутим, изолат

из 1991. године под именом NS 912 је идентификован као патотип 4 (730), и те године је чинио око 10% свих изолата, да би у 1996. години овај патотип пламењаче чинио око 50% укупних изолата. У Србији је тренутно преобладајуће распрострањен патотип 4 (730).

1.5. Гени за отпорност на пламењачу (гени *Pl*)

Извори гена за отпорност према пламењачи налазе се пре свега у неким дивљим врстама сунцокрета и сортама које су створене укрштањем гајеног сунцокрета са неким дивљим врстама из рода *Helianthus*. После вишегодишњих испитивања дивљих врста сунцокрета дошло се до закључка да су неке од ових врста, као на пример *Helianthus tuberosus*, *Helianthus subcanescens*, *Helianthus rigidus* и *Helianthus macrophyllus*, отпорне према више проузроковача болести сунцокрета (Pustovoјt, 1975). Ове врсте су послужиле за стварање међуврсних хибрида отпорних према важнијим проузроковачима болести, односно за стварање хибрида са групним имунитетом. Укрштањем ових дивљих врста са гајеним сунцокретом (*Helianthus annuus*) добијени су хибриди отпорни према патогенима: *Plasmopara halstedii*, *Puccinia helianthi* и *Verticillium sp.* У многим земљама установљено је да се извори отпорности могу наћи и у старим архаичним сортама које су давно престале да се гаје и налазе се само у истраживачким центрима.

Што се тиче отпорности према *Plasmopara halstedii*, претпоставља се да постоји више од 20 гена који условљавају отпорност према једном, два или више патотипова пламењаче (Vranceanu и Stoenescu, 1970; Zimmer и Kinman, 1972; Vranceanu и сар., 1981; Miller и Gulya, 1987, 1991; Vear и сар., 1997; Molinero-Ruiz и сар., 2003; Mulpurі и сар., 2009; Bachlava и сар., 2011). Ови гени за отпорност према пламењачи означени су као *Pl* гени (Miller, 1992; Rahim и сар., 2002) и приказани су у Табели 2. Извори гена отпорности према пламењачи су дивље врсте сунцокрета (Miller и Gulya, 1991; Seiler и сар., 1991; Korell и сар., 1996). Неки од дивљих сродника сунцокрета показују отпорност према свим до сада познатим патотиповима пламењаче.

Табела 2. Гени за отпорност и извори отпорности на пламењачу сунцокрета,(Miller,1992; Bert и сар., 2001; Gulya и сар., 1991b; Mulpuri и сар., 2009; Vachlava и сар., 2011; Josić и сар., 2012; Gascuel и сар., 2016)

Ген	Отпорност на патотипове пламењаче									Извор отпорности
	304	310	330	700	703	710	730	731	770	
<i>PI1 (PI)</i>	-	-	-	-	-	-	-	?	?	AD66, RHA266, RHA265, PW3
<i>PI2(H1)</i>	+	-	+	-	-	-	-	?	?	HA61, PSC8, RHA274
<i>PI3(H2)</i>	-	-	-	-	-	-	-	?	?	Ha61
<i>PI 4</i>	+	+	+	-	-	-	-	?	?	HIR34, XK
<i>PI 5</i>	+	+	-	+	+	+	+	?	?	RF-5566-74, XRQ, YSQ
<i>PI 6</i>	-	+	+	+	+	+	+	?	?	HA335, HA336, YDQ
<i>PI 7</i>	-	+	+	+	+	+	+	?	?	HA337, HA 338, HA 339, YEQ
<i>PI 8</i>	+	+	+	+	+	+	+	?	?	RHA340; <i>H. argophyllus</i> 415
<i>PI 9</i>	-	+	-	-	-	-	-	?	?	RHA274
<i>PI 10</i>	-	-	+	-	-	-	-	?	?	RHA325, RHA274
<i>PIt(PI5)</i>	+	+	-	+	+	+	+			<i>H. tuberosus</i>
<i>PIArg</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	RHA-419, <i>H. argophyllus</i> 1575
<i>PII3</i>	?	+	+	+	-	+	+	+	+	HAR5
<i>PII4</i>	?	+	+	+	-	+	+	?	+	HAR4, 29004
<i>PII5</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	RNID, RF-S11-5566-74-10
<i>PII6</i>	?	?	?	+	-	+	+	?	?	HA-R4

Према Маринковић и сар., (2003) прва линија која је имала отпорност на пламењачу била је линија AD66, изведена из канадског хибрида Advent, који је настао интерспециес хибридизацијом. Отпорност је условљена једним геном који је означен као *Pl1* (Vranceanu и Stoanescu, 1970). У линији сунцокрета На61 пронађена је отпорност према новом америчком Red river патотипу пламењаче, а ген који обезбеђује отпорност према овом патотипу означен је као *Pl2*. Недавно је показано да се *Pl2* ген налази у комплексном *Pl6* локусу (Vear и сар., 1997; Bouzidi и сар., 2002). Brahm и сар., (2000), такође наводе да су гени *Pl1* и *Pl2* први откривени. Према овим ауторима *Pl1* пружа отпорност према патотипу 100, док ген *Pl2* пружа отпорност према патотиповима 100 и 300. У линији На61 је утврђено постојање два гена који су означени као *H1* (за Red river расу) и *H2* (за француску расу). Ген *H2* одговара гену *Pl3*. У материјалу који је настао међуврсним укрштањем пронађен је ген *Pl4* који обезбеђује отпорност према патотиповима пламењаче 100, 300, 304 и 330. У линији Rf-5566-74 Vranceanu и сар., (1981) су установили постојање гена *Pl5* који поседује отпорност на све патотипове пламењаче, изузев патотипа 330. Овај ген је такође пронађен у дивљој врсти сунцокрета *Helianthus tuberosus* (Leclercq и сар., 1970). Аутори (Miller и Gulya, 1991), су у линијама На335 и На336 утврдили постојање гена *Pl6*, у линијама На337, На338 и На339 присуство гена *Pl7*, док је у линији сунцокрета RHA340 пронађен ген *Pl8*. У раду Bouzidi и сар., (2002) наводи се да гени *Pl6* и *Pl7* пружају отпорност на чак 8 патотипова пламењаче (100, 300, 310, 330, 700, 710, 730, и 770). У линији RHA274 установљено је присуство гена *Pl9* који је носилац отпорности према патотипу 310 пламењаче.

Отпорност према патотиповима 100, 300, 700 и 730 је уведена из три дивље врсте сунцокрета; *Helianthus annuus* (*Pl6*), *Helianthus praecox* (*Pl7*) и *Helianthus argophyllus* (*Pl8*) (Miller и Gulya, 1988, 1991). У дивљој врсти сунцокрета *Helianthus tuberosus* пронађен је ген отпорности на пламењачу који је означен као *Plt*, али највероватније је ово ген *Pl5* јер обезбеђује отпорност према патотипу 700 (Pustovojt и Krokhin, 1977). Нови ген отпорности означен као *PlArg* је у инбред линију Arg 1575 интродукован из дивље врсте сунцокрета *Helianthus argophyllus* и обезбеђује отпорност на све до сада познате патотипове пламењаче (Seiler 1991; Gulya 2000). Без обзира што су и ген *Pl8* и *PlArg* интродуковани из дивље врсте

Helianthus argophyllus, ипак су у питању два различита гена јер Pl_{Arg} води порекло из популације *Helianthus argophyllus* 1575 (Seiler 1991), док ген $Pl8$ потиче из популације *Helianthus argophyllus* 415 (Miller и Gulya, 1991).

Недавно је описано још неколико гена Pl : ген $Pl13$ (Mulpuri и сар., 2009), чији извор је инбред линија HAR5, и ген означен као $Pl14$ (Bachlava и сар., 2011) који је откривен у линији сунцокрета HAR4. Ефикасност гена за отпорност $Pl6$ и $Pl7$ је превазиђена појавом нових патотипова пламењаче у Француској (Delmotte и сар., 2008) и у САД (Gulya и сар., 2010). Међутим, до данас не постоје подаци о патотиповима пламењаче који превазилазе ефикасност гена $Pl8$ и Pl_{Arg} , односно ова два гена обезбеђују сунцокрету отпорност према свим патотиповима пламењаче који су до сада описани (Gulya, 2007; Gulya и сар., 2010).

Нови ген означен као $Pl15$ је пронађен у аргентинској ресторер инбред линији сунцокрета. Овај ген обезбеђује отпорност не само на четири најдоминантнија патотипа пламењаче (300, 700, 730, 770), већ и на мање распрострањене патотипове, укључујући и оне недавно описане у САД (патотипови 714 и 734) и у Француској (304) (Gulya и сар., 2010). Још један ген који обезбеђује отпорност на пламењачу је недавно откривен и означен као $Pl16$. Овај ген је пронађен у америчкој сорти HAR4 и мапиран је на LG1 (енг. Linkage Group) SSR мапе (Liu и сар., 2012).

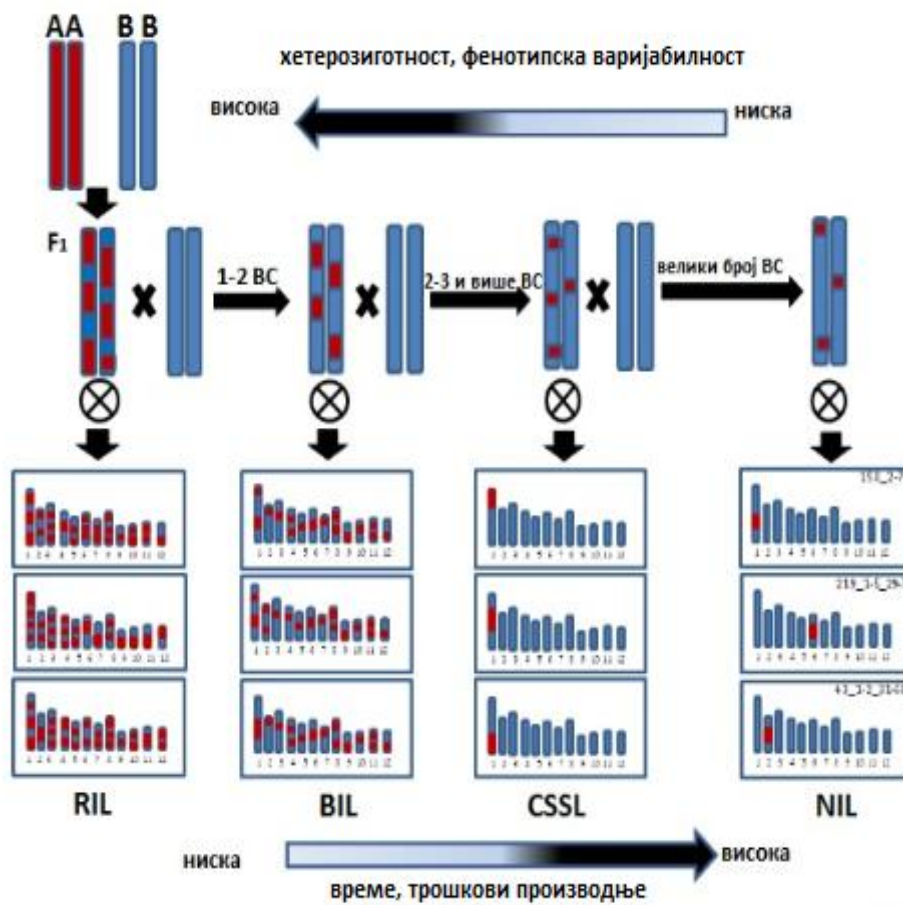
Недавно је мапиран ген који је означен као $Pl17$ (Qi и сар., 2015). Овај нови ген за отпорност према пламењачи је независан од свих до сада мапираних гена Pl и то је први ген који је мапиран на LG4 (linkage group) генома сунцокрета. Још један ген означен као $Pl18$ је најскорије мапиран ген (Qi и сар., 2016). Овај ген је унешен у генотипове гајеног сунцокрета из дивље врсте сунцокрета *Helianthus argophyllus* и први је Pl ген мапиран на LG2 генома сунцокрета.

Појава нових патотипова пламењаче намеће потребу за истраживање нових гена отпорности. Иако је до сада откривено више од 20 гена Pl , истраживање нових Pl гена се наставља.

1.6. Типови популација које се користе за мапирање

Први корак у добијању мапирајуће популације је одабирање два генетички дивергентна родитеља, који показују јасне генетичке разлике за једну или више особина од интереса (нпр. присуство гена за отпорност према некој болести). Поред тога што је битно да се родитељи који се бирају за добијање мапирајуће популације значајно разликују у једној или више особина од интереса, пожељно је и да имају што већи број хомозиготних локуса, као и што више полиморфних локуса који се користе за мапирање. Постоји више типова мапирајућих популација. Најзначајнији типови мапирајућих популација су F_2 , F_3 , популација повратног укрштања (енг. backcross-BC), рекомбинантне инбред линије (енг. recombinant inbred lines-RIL), дупли хаплоиди (енг. double haploids- DH) и популација скоро потпуно изогених линија (енг. near isogenic lines- NIL) (Doerge 2002). Изогене линије настају укрштањем између две инбред линије које се међусобно разликују у веома малом броју особина међу којима је и особина од интереса.

Подаци из литературе показују да се генетичке мапе могу конструисати коришћењем различитих врста и величина мапирајућих популација, различитих маркер система, статистичких метода и рачунарских програма (Ferreira и сар., 2006). Сваки тип мапирајуће популације има предности и недостатке (McCouch and Doerge, 1995) и истраживач треба да изабере одговарајућу популацију за линкеџ мапирање (мапирање везаности) у зависности од циља истраживања, расположивог времена за развој популације, и типа молекуларних маркера (доминантни или кододоминантни маркери) који ће се користити за генотипизацију. Најједноставнији типови мапирајућих популација су F_2 и BC јер се једноставно и за кратко време могу произвести. Међутим, F_2 и BC се сматрају привременим популацијама јер су изразито хетерозиготне и не могу се бесконачно одржавати путем семена.



Слика 2. Типови мапирајућих популација-модификовано према <http://www.intechopen.com/books/rice-germplasm-genetics-and-improvement/unraveling-the-secrets-of-rice-wild-species>

1.7. Генетичке мапе сунцокрета

Геноми многих биљних врста испитивани су уз помоћ молекуларних маркера. Геном сунцокрета је физички огроман (3,500 Mbp) и још увек није секвенциран (Вааск et al., 2005). Прве молекуларно генетичке мапе гајеног сунцокрета су развијене уз помоћ маркера RFLP (Berry и сар., 1995), RAPD (Rieseberg и сар., 1993) и AFLP (Gedil и сар., 2001). Tang и сар., (2002) су саставили прву генетичку мапу везаних гена која је била засићена великим бројем маркера SSR. Развитком неколико стотина маркера SSR (Yu и сар., 2003), састављена је консензус генетичка "линкејд" мапа на гајеном сунцокрету (*Helianthus annuus* L.). Линкејд мапе, засићене великим бројем маркера су омогућиле мапирање гена, како за квалитативне тако и за квантитативне особине. Стварањем мапа ДНК-маркера високе густине створен је предуслов за коришћење маркера који су повезани са особинама од интереса, односно за маркер-асистирани селекцију (MAS). Tang и сар., (2002) су саставили прву генетичку «линкејд» мапу која је била засићена са великим бројем SSR маркера, дужине 1368,3 cM, са просечном густином око 3,1 cM по локусу. Развитком неколико стотина SSR маркера Yu и сар., (2003) су саставили генетичку линкејд мапу на гајеном сунцокрету (*Helianthus annuus* L.). Линкејд мапе, засићене са великим бројем маркера су омогућиле мапирање гена, како за квалитативне тако и за квантитативне особине.

1.8. Молекуларни маркери и маркер асистирани селекција

Великим напретком на пољу молекуларне генетике дошло је до снажног развоја техника анализе генетичког материјала на нивоу ДНК. За разлику од морфолошких и биохемијских маркера (изоензима), неутрални молекуларни маркери се не налазе под утицајем фактора спољашње средине.

Молекуларни маркери омогућавају прецизније праћење генетичке варијабилности у популацији, а анализе могу да се раде у било ком стадијуму развића биљке, из врло мале количине биљног материјала. Већ у фази поника

може се направити генетичка карактеризација, те се на основу тога врло брзо могу издвојити пожељни, односно елиминисати непожељни генотипови из популације. Примена молекуларних маркера повећава ефикасност оплемењивања тј. временски скраћује поступак, а тиме и смањује трошкове производње.

Почетком осамдесетих година прошлог века започето је са идентификацијом великог броја маркера који су распоређени по целом геному различитих биљних врста. Стварањем мапа ДНК маркера високе густине створен је предуслов за коришћење маркера који су повезани са особинама од интереса, односно за маркер асистирани селекцију. Један од предуслова за успешност маркер асистирани селекције је дефинисање гена за које се предпоставља да регулишу особине од интереса, и тестирање статистичких односа између маркера и особине од интереса. Тек када је дефинисан маркер који је физички лоциран поред, или чак у геному од интереса, могућа је маркер асистирани селекција пожељне особине (Panković и сар., 2004). Случајно раздвајање маркера од особине током многих циклуса мејозе у програму оплемењивања, може да умањи ефикасност маркер асистирани селекције чак и у случају тесно везаних маркера. Идентификација гена кандидата за отпорност тј. ДНК секвенци са предвиђеном функцијом, и њихова употреба као молекуларних маркера је један од приступа да се превазиђе овај проблем.

Најповољнија ситуација за успешност МАС је уколико је молекуларни маркер лоциран у геному. У том случају праћењем наслеђивања маркера, уједно се прати и наслеђивање гена. Међутим, овакву врсту маркера је најтеже пронаћи.

1.8.1. CAPS маркери

CAPS (енг. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) или сечене амплификоване полиморфне секвенце су молекуларни маркери засновани на умножавању одређених сегмената ДНК методом PCR, који се секу рестрикционим ензимима. Рестрикциони ензими препознају кратке редоследе нуклеотида и секу ДНК у оквиру препознатих региона. Сваки ензим препознаје специфично место,

секвенце које се обично састоје од 4-6 нуклеотида, који се називају секвенце препознавања или рестрикциона места.

Развој CAPS маркера укључује следеће кораке:

1. Идентификацију полиморфних региона и рестрикционих ензима који препознају ове регионе
2. Дизајн прајмера и амплификацију жељеног региона
3. Дигестију PCR производа са једним или више рестрикционих ензима
4. Визуелизацију на агарозном гелу

Предност CAPS маркера у поређењу са осталим молекуларним маркерима је њихова кодоминантна природа која омогућује разликовање хомозиготних од хетерозиготних индивидуа. Релативно једноставна и поуздана техника рада са CAPS маркерима која омогућава анализирање великог броја узорака у јединици времена, омогућава успешну примену ових маркера у маркер асистираној селекцији код сунцокрета.

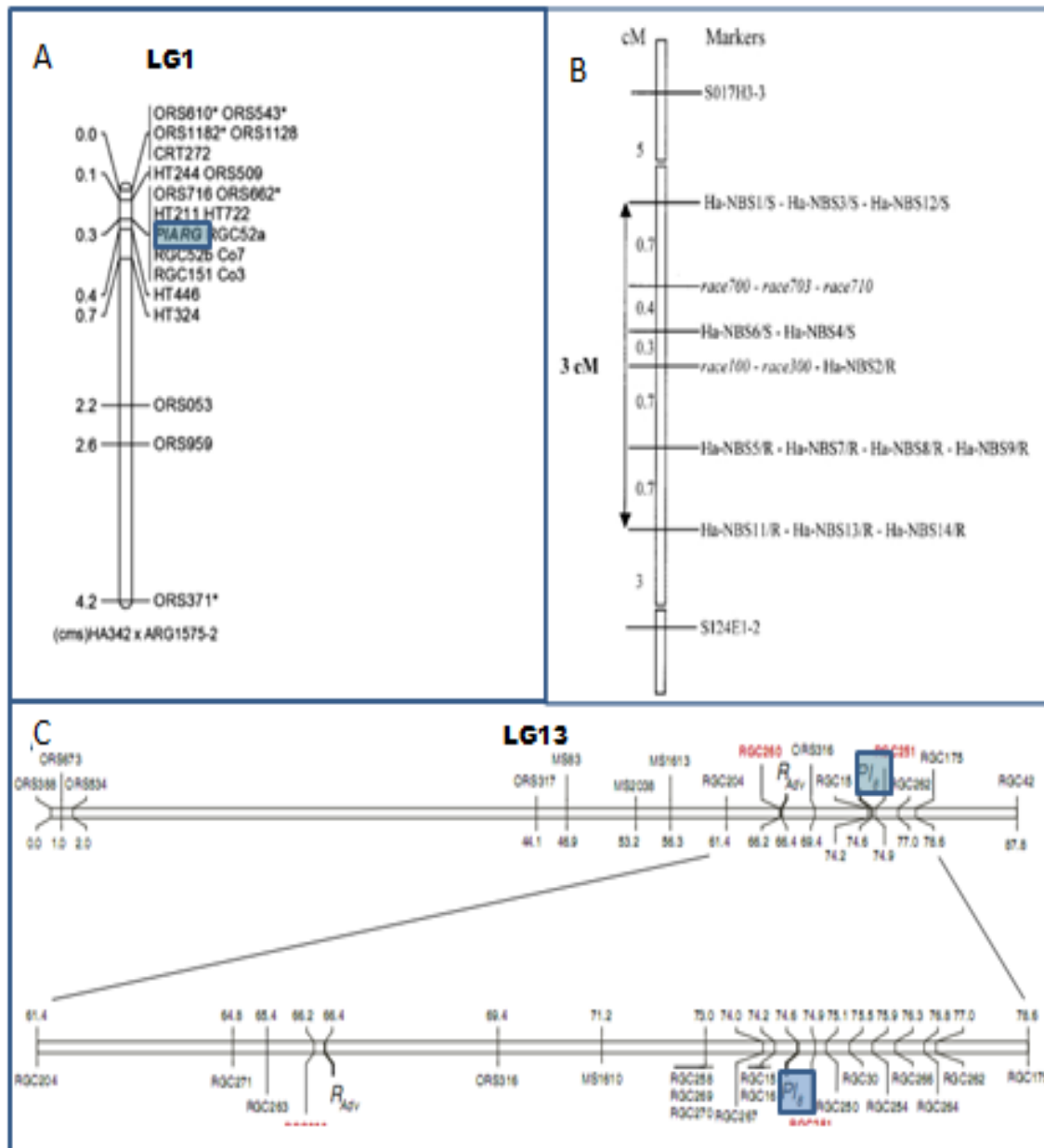
1.9. Мапирани *Pl*-гени

Идентификовано је више од 20 гена за отпорност сунцокрета према пламењачи (*Pl1-18*, *Plv*, *Plw*, *Plx-z*, *Mw*, *Mx* и *PlArg*) (Bachlava и сар., 2011; de Romano и сар., 2010; Rahim и сар., 2002; Mulpuri и сар., 2009). Међутим, само гени *Pl8*, *PlArg* и *Pl15* обезбеђују отпорност на све патотипове пламењаче који су идентификовани до сада. Применом молекуларних маркера мапирано је 11 *Pl*- гена (Таб. 3) (Bachlava и сар., 2011; Bert и сар., 2001; Bouzidi и сар., 2002; Brahm и сар., 2000; de Romano и сар., 2010; Dušle и сар., 2004; Gedil и сар., 2001; Gentzbittel и сар., 1998; Mouzeyar и сар., 1995; Mulpuri и сар., 2009; Radwan и сар., 2003, 2004; Roeckel-Drevet и сар., 1996; Vear и сар., 1997). *Pl*- гени показују тенденцију груписања на линкејд групама слично као и многи *R* гени за отпорност биљака према болестима. Три главне групе *Pl*- гена лоциране су на линкејд групама 1, 8 и 13 SSR мапе. Гени *Pl1*, *Pl2*, *Pl6*, *Pl7* и *Pl15* мапирани су на LG8 SSR линкејд мапе

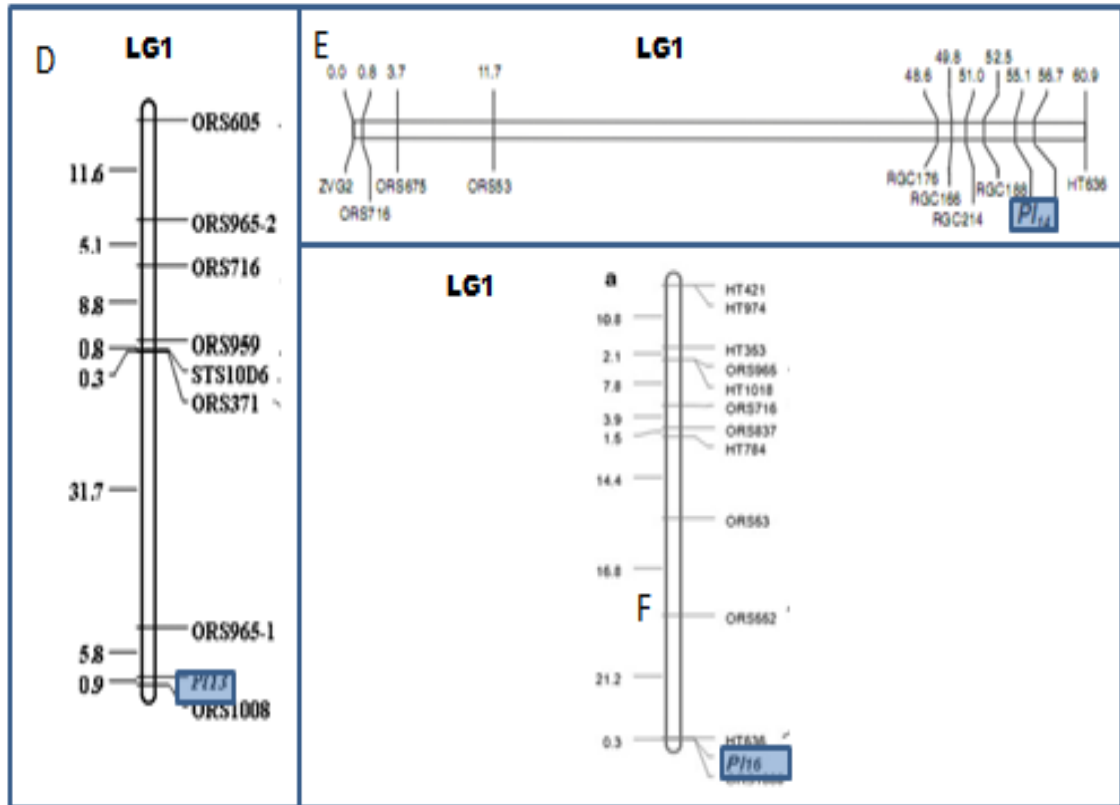
(Сл. 3) (Bert и сар., 2001; Bouzidi и сар., 2002; Gentzbittel и сар., 1998; Mouzeyar и сар., 1995; Roeckel-Drevet и сар., 1996; Vear и сар., 1997; Radwan и сар., 2008; Slabaugh и сар., 2003; de Romano и сар., 2010). На LG13 SSR мапе мапирани су гени *Pl5* и *Pl8* (Bert и сар., 2001; Radwan и сар., 2004) док су на LG1 мапирани гени *Pl_{Arg}*, *Pl13*, *Pl14* и *Pl16* (Сл. 3а) (Bachlava и сар., 2011; Dušle и сар., 2004; Radwan и сар., 2004; Mulpuri и сар., 2009; Liu и сар., 2012).

Табела 3. Мапирани *Pl*-гени сунцокрета

Гени	LG (RFLP и SSR мапа)	Литература
<i>Pl1, Pl2</i>	RFLP LG 1 SSR LG 8	Mouzeyar и сар., 1995; Roeckel-Drevet и сар., 1996; Vear и сар., 1997; Gedil и сар., 2001; de Romano и сар., 2010
<i>Pl6, Pl7</i>	RFLP LG 1 SSR LG 8	Gedil и сар., 2001; Bouzidi и сар., 2002; Yu и сар., 2003; Radwan и сар., 2008
<i>Pl5, Pl8</i>	RFLP LG6 SSR LG13	Gentzbittel и сар., 1999; Bert и сар., 2002; Yu и сар., 2003; Radwan и сар., 2003, 2004, 2008; Bachlava и сар., 2011
<i>Pl_{Arg}</i>	SSR LG1	Dušle и сар., 2004; Wieckhorst и сар., 2010
<i>Pl13, Pl14</i>	SSR LG1	Mulpuri и сар., 2009; Bachlava и сар., 2011;
<i>Pl15</i>	SSR LG8	de Romano и сар., 2010
<i>Pl16</i>	SSR LG1	Liu и сар., 2012
<i>Pl17</i>	SSR LG4	Qi и сар., 2015
<i>Pl18</i>	SSR LG2	Qi и сар., 2016



Слика 3. Локација мапираних *Pl* gena на генетичкој мапи генома сунцокрета: А) положај *Pl_{Arg}* gena на LG1 (Dužle и сар., 2004), В) положај *PI6* gena на LG8 (Bouzidi и сар., 2002), С) положај *PI8* gena на LG13 (Bachlava и сар., 2011)



Слика 3а. Локација мапираних *Pl* гена на генетичкој мапи генома сунцокрета: D) положај *Pl13* гена на LG1 (Mulrui и сар., 2009), E) положај *Pl14* гена на LG1 (Bachlava и сар., 2011), F) положај *Pl16* гена на LG1 (Liu и сар., 2012)

1.10. Гени за отпорност биљака према болестима (*R* гени)

Крајем деведесетих година прошлог века, многи гени за отпорност биљака према болестима, тзв. *R*-гени су клонирани и секвенцирани. Откриће ових гена је знатно унапредило разумевање молекуларно-генетичких механизма на којима почива отпорност биљака према болестима (Staskawiez и сар., 1995; Bent, 1996; Martin, 1999; Ellis и сар., 2000; Michelmore, 2000, 2003). *R* гени се могу сврстати у 5 група у зависности од њихових структурних особина (Dangl и Jones, 2001). Највећа група *R*- гена је она чије протеинске продукте карактерише LRR мотив, односно присуство леуцином богатог поновка. Успешним клонирањем великог броја *R*- гена, који пружају отпорност према различитим биљним патогенима откривен је висок ниво конзервативних секвенци ових региона (Gebhardt, 1997). Већина клонираних *R*- гена садржи конзервативна нуклеотидна места везивања (Nucleotide Binding Site-NBS) и поновке богате леуцином (Leucine Rich Repeat-LRR), и називају се NBS-LRR гени за отпорност (Meurers и сар., 1999). На основу разлике у N- структуралном домену, ови протеини се могу поделити у две супермамилије: TIR- -NBS-LRR и CC-NBS-LRR. У геномима многих биљних врста ови гени су често дуплирани и распоређени су као велики мултигенски кластери. Две трећине односно 75% гена за отпорност биљака који су клонирани до сада, кодирају NBS-LRR протеине (McInture и сар., 2005; Radwan и сар., 2008). *R* гени директно или индиректно препознају авирулентни фактор патогена, након чега покрећу низ сигналних реакција које доводе до активирања брзог одбрамбеног одговора домаћина. У раду (Dangl и Jones, 2001) наводи се да се одбрамбени одговор често манифестује као хиперсензитивни одговор (енг. Hypersensitive Response-HR) или програмирана ћелијска смрт (енг. Programmed cell death- PD). У биљкама које поседују отпорност која је специфична према одређеном патотипу неког патогена, *R* гени кодирају синтезу протеина који препознају продукте одговарајућих авирулентних гена у патогену. У том случају долази до активације одбрамбеног механизма биљке који се манифестује у виду хиперсензитивне реакције. Међутим, уколико патоген не поседује авирулентне гене које би биљка препознала долази до изостанка хиперсензитивне реакције.

1.10.1. **Аналози гена за отпорност (RGA)**

Постојање конзервативних секвенци међу *R* генима допринело је изоловању аналога гена за отпорност из многих биљних врста употребом дегенеративних прајмера. Bouzidi и сар., (2002) су тако секвенцирали клон који је мапиран близу кластера *Pl6* који се повезује са отпорношћу на неколико патотипова пламењаче. Анализом секвенце овог аналога гена за отпорност (RGA) установљена је значајна хомологија са “nucleotide binding“ доменима претходно клонираних гена за отпорност код других биљака. Исти аутори су, на основу парцијалног RGA производа (Gentzbittel и сар., 1998) клонирали и секвенцирали RGA целе дужине и развили специфичне прајмере који умножавају 13 STS (енг. Sequence Tagged Site) маркера који су везани на *Pl6* локусу, на линкиџ групи 1 (RFLP мапа). Ови маркери се групишу на генетичкој дистанци од око 3 сМ, и дају бољи увид у комплексност *Pl6* локуса. Према овим ауторима присуство RGA у рејону *Pl6* локуса генома сунцокрета обезбеђује отпорност на више патотипова пламењаче (100, 300, 700, 703 и 710). Значајност маркера које су пронашли (Bouzidi и сар., 2002), верификовали су Ranković и сар., (2004). Два SSR маркера, ORS 166 и ORS 1043, такође су лоцирана на комплексном *Pl6* геномском локусу (Slabaugh и сар., 2003). Неколико гена кандидата за отпорност су мапирани на LG8 и LG13. На основу секвенци два RGA, 14 STS маркера је развијено у оквиру *Pl5/Pl8* локуса (Radwan, 2003; 2004). Код сунцокрета, RGA који припадају класи TIR-NBS-LRR гена су идентификовани у близини гена *Pl1*, *Pl2*, *Pl6* и *Pl7* (Bouzidi и сар., 2002; Gedil и сар., 2001; Gentzbittel и сар., 1998; Slabaugh и сар., 2003), док су RGA који припадају класи CC-NBS-LRR идентификовани у близини *Pl5*, *Pl8* и *Pl14* гена (Radwan и сар., 2003; 2004; Bachlava и сар., 2010). Bachlava и сар., (2011) су идентификовали гене кандидате за отпорност који су уско повезани са *Pl5* и *Pl8* геном. Они су испитивали генетичку повезаност LG1 и LG13 у односу на 783 NBS-LRR кодирајућа гена кандидата за отпорност код сунцокрета, и поставили основу за мапирање гена *Pl8* и *Pl14*.

1.11. Одговор биљака након инфекције узрочником пламењаче

Познато је да као одговор на абиотички и биотички стрес, биљке акумулирају фенолна једињења која могу бити оксидована у сложеније форме помоћу фенол оксидаза и пероксидаза (Takahama и Oniki, 2000). Феноли из групе хидроксикумарина као што су скополетин, скополин и ајапин, за које је показано да се акумулирају у биљкама сунцокрета, поседују антигљивичну активност (Tal и Robeson, 1986a, b; Gomez-Vasquez и сар., 2004; Prats и сар., 2006). Сунцокрет који је инфициран *P. halstedii*, акумулира кумарин скополетин као главни фитоалексин (Tal и Robeson, 1986 b; Spring и сар., 1991), који је део одбрамбеног механизма сунцокрета према болестима. Интересантно је да скополетин вероватно има двоструку улогу у одбрамбеном одговору сунцокрета који је проузрокован биотичким стресом. Поред антигљивичне активности, он је инхибитор оксидазе индол сирћетне киселине, која се индукује након инфекције сунцокрета гљивом *P. halstedii* (Benc и Spring, 1995).

Saftić-Panković и сар., (2006) су показали да инфекција биљака узрочником пламењаче доводи до индукције пероксидазне активности и повећања акумулације фенолних једињења нарочито у осетљивој линији сунцокрета. Инфекција биљака узрочником пламењаче доводи до оксидативног стреса и до активације антиоксидативног одговора. Скополетин зависна пероксидазна активност која се индукује након инфекције само у отпорној линији сунцокрета Ha26 R (Saftić-Panković и сар., 2006), указује на специфичну улогу пероксидаза у метаболизму кумарина.

Микроскопска посматрања су показала да и осетљиве и отпорне линије сунцокрета могу бити нападнуте патогеном *P. halstedii* (Mouzeуаг и сар., 1993). Међутим, око 5 сати након инфекције корена, хиперсензитивна реакција је откривена само унутар отпорних хипокотила. У већини случајева паразит се задржава у нивоу хипокотила и не стиже до листова (Mouzeуаг и сар., 1993, 1994). Према Gulya и сар., (1991a) ова појава се назива котиледон ограничена инфекција, и представља генералну појаву пронађену у интеракцији сунцокрет-*P. halstedii*, али мало се зна о молекуларној основи ове појаве.

1.11.1. Хиперсензитивна реакција и експресија гена након секундарне инфекције сунцокрета узрочником пламењаче

Током интеракције биљке и патогена, код отпорних биљака долази до хиперсензитивне реакције која доводи до престанка развића патогена. Ћелије биљке домаћина које окружују паразита одумиру, тј. јавља се програмирана смрт ћелија које окружују паразита. Према Hermans и сар., (2003), програмирана смрт ћелија се углавном дешава 12-24 h након инокулације. Пошто је гљива *P. halstedii* облигатни паразит, у овом стадијуму, тј. у нивоу хипокотила се зауставља даљи раст гљиве. Radwan и сар., (2005), такође описују механизам отпорности сунцокрета према пламењачи као одложени хиперсензитивни одговор (HR) у доњем делу хипокотила, који иницира системску отпорност (енг. Systemic Acquired Resistance- SAR) у горњим деловима клијанаца. Хиперсензитивни одговор је праћен многобројним физиолошким и молекуларним променама, нпр. деполаризацијом плазмине мембране, променама у брзини респирације, оксидативним стресом, продукцијом азот монооксида (NO), производњом PR (енг. Pathogenesis-Related) протеина (Hammond-Kosack и Jones 1996; Delledonne и сар., 1998; Desikan и сар., 2001; Concetta de Pinto и сар., 2002). Хиперсензитивна реакција индукује SAR. Системска отпорност је повезана са локалним и системским повећањем нивоа салицилне киселине, као и са експресијом гена који кодирају синтезу протеина PR (Kombrink и Schmelzer, 2001). Отпорне биљке продуктима свог метаболизма (токсини, полифеноли, салицилна киселина итд.) спречавају даљи раст патогена.

Са почетком хиперсензитивне реакције долази и до транскрипционе активности гена одбране, који кодирају ензиме за биосинтезу фитоалексина и лигнина. Многи од ових гена, као што су Pal (Phenylalanine Ammonia-Lyase) (Mowton и сар., 1980) и хитиназа (Sahai и Monocha, 1993), кодирају ензиме укључене у синтезу продуката који успоравају или инхибирају инвазију патогена. Резултати које су добили Mazeurat и сар., (1999) сугеришу да Pal, хитиназа и убиквитин могу бити добри маркери за отпорност након секундарне инфекције сунцокрета узрочником пламењаче. Ови резултати могу помоћи да се

идентификују гени укључени у одбрамбени одговор, и да се ближе детерминишу молекуларне основе механизма отпорности сунцокрета према пламењачи.

Radwan и сар., (2011) сугеришу да код генотипова који имају тип I отпорности долази до хиперсензитивног одговора који је праћен конститутивном експресијом TIR-NBS-LRR гена. TIR-NBS-LRR протеини су рецептори који могу да ступе у интеракцију са ефекторима патогена и открију ефекторску акцију (Dangl and Jones 2001). Иако су према литературним подацима резултати о механизмима препознавања између TIR-NBS-LRR протеина и патогених ефектора код сунцокрета оскудни Gascuel и сар., (2015) сугеришу да су ефектори патогена вероватно главни играчи у интеракцији између *Plasmodium halstedii* и сунцокрета.

2. ЦИЉ РАДА

Циљ овог рада је да се испита начин наслеђивања гена отпорности према пламењачи у неколико мапирајућих популација, насталих укрштањем различитих линија сунцокрета које се разликују по отпорности према патотипу 730 пламењаче. У оквиру овог циља, начин наслеђивања гена отпорности према пламењачи биће процењен на основу теста отпорности (примарна инфекција клијанаца сунцокрета суспензијом спора *Plasmopara halstedii*), као и на молекуларном нивоу користећи PCR маркере који су лоцирани у региону *Pl6* локуса.

Да би се проценила употребљивост добијених PCR маркера у маркер асистираној селекцији за отпорност сунцокрета према проузроковачу пламењаче утврдиће се распоред RGA на линкејд мапама *Pl6* региона сунцокрета у три популације које су коришћене за мапирање.

Да би се детаљније објаснио механизам отпорности сунцокрета према пламењачи биће испитана експресија десет гена: гена отпорности *Pl6*, гена за сигнализацију (HaEDS1 и HaEDR1), гена укључених у синтезу H₂O₂ (Насаох и Наоох), гена укључених у антиоксидативни одговор (HaSODc и HaSODp) и гена везаних за одговор на патогене (Hachi, PAL, HaPR5).

Очекује се да резултати овог рада допринесу унапређењу процеса селекције биљака које ће имати трајнију отпорност према пламењачи.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Биљни материјал коришћен у оцени наслеђивања отпорности и мапирање гена за отпорност према пламењачи

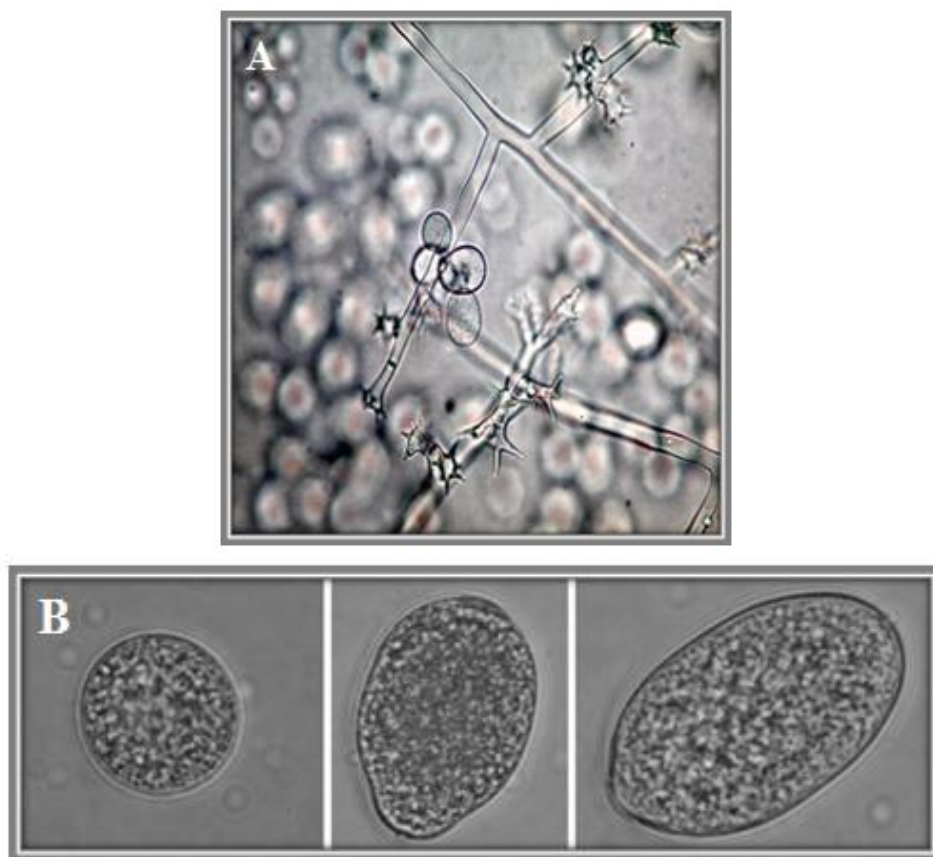
Инбред линија сунцокрета Ha26S, са високим општим комбинационим способностима за компоненте приноса, која је осетљива на патотип пламењаче 730, је укрштена са линијама JM8 и Ha338. Линија JM8 је извор *Pl6*, а линија Ha338 је извор *Pl7* гена за отпорност сунцокрета према пламењачи. Након укрштања (Ha26SxJM8) произведене су 73 F₃ фамилије које су у овом испитивању коришћене као прва мапирајућа популација. Другу мапирајућу популацију чини 75 F₃ фамилија које су добијене из укрштања (Ha26SxHa338).

Промене у *Pl6* геномском региону изучаване су на трећој популација која је састављена од 37 рекомбинантних инбред линија (RIL) које су произведене из укрштања JM8xHa19, где је линија JM8 била извор *Pl6* гена. Отпорност линија и њиховог F₃ потомства на пламењачу је анализирана на нивоу:

- а. Процене отпорности, помоћу методе инокулације целог семена (примарна инфекција)
- б. Процене отпорности на молекуларном нивоу

3.1.1. Гајење биљака и тест отпорности (примарна инфекција клијанаца сунцокрета)

Отпорност према проузроковачу пламењаче (патотип 730) је одређена методом инокулације целог семена (примарна инфекција). Семе испитиваних линија и F₃ фамилија је стерилисано у 10% натријум-хипохлориту у трајању од 5 минута, добро испрано у текућој води и распоређено у петри посуде на влажној филтер хартији. Наклијавање семена је извршено у мраку, у термостату на 25°C у трајању од 24-36h. Сетови униформних клијанаца са дужином радикуле од 0,5-1cm су потопљени у суспензију спора *Plasmopara halstedii* (40-70 x 10³ зооспорангија/милилитар), у трајању од 3-4h (Gulya и сар., 1991a). На Слици 4. приказане су зооспорангије и зооспоре *Plasmopara halstedii*.



Слика 4. Зооспорангије и зооспоре *Plasmopara halstedii* (А) облик зооспорангија (В): округли (лево), крушколик (центар), овалан (десно)

http://www.draaf.lorraine.agriculture.gouv.fr/spip.php?page=affiche_image&id_document=160389836

Инфицирани клијанци су посејани у пластичне посуде у смеши песка и перлита (3V:2V). Од сваке линије исваке F₃ фамилије посејано је по 50 семена. Биљке су гајене у климатизованим коморама при контролисаним условима (светлост 10000-12000 lux, температура 18-20°C, релативна влажност ваздуха 70%), у трајању од 10-14 дана (Tourvieille и сар., 2000a). У свакој посуди је сејан по један ред осетљиве OCMS44 линије као позитивна контрола за утврђивање успешности инфекције. У фази првог пара листова биљке су пренете у мрак у трајању од 24h и обезбеђена им је 100% релативна влажност, да би се изазвала спорулација на котиледонима осетљивих биљака. Отпорне биљке нису показале симптоме болести. Процент отпорности у свакој F₃ фамилији је одређен дељењем броја биљака на којима су присутни симптоми (спорулација на котиледонима), са укупним бројем инокулисаних биљака и множењем са 100. Уколико код осетљиве контролне линије која служи као позитивна контрола за одређивање успешности инфекције остане више од 40% биљака које не показују симптоме болести односно које су из неког разлога избегле инфекцију, тест отпорности треба поновити јер је инфекција била неуспешна. Уколико код осетљиве контролне линије остане само неколико биљака које су избегле инфекцију, успешност инфекције је већа од 90%. У том случају, да би израчунали кориговани број отпорних и осетљивих биљака у свакој F₃ фамилији, потребно је израчунати корекциони фактор (CF), (Molinero-Ruiz и сар., 2002).

$CF=T/S$ при чему је:

T-укупан број инокулисаних контролних биљака

S-број инокулисаних контролних биљака са симптомима болести

Кориговани број осетљивих биљака једнак је броју осетљивих биљака у одређеној F₃ фамилији, помножен са корекционим фактором CF.

Кориговани број отпорних биљака представља разлику између укупног броја инокулисаних биљака у једној F₃ фамилији, и коригованог броја осетљивих биљака.

3.2. Биљни материјал коришћен за испитивање експресије гена важних у одговору биљака на стрес проузрокован инфекцијом гљивом *Plasmopara halstedii*

Инбред линија сунцокрета На26, са високим општим комбинационим способностима за компоненте приноса (Škorić и сар., 2000) је укрштена са линијом На336, која је носилац *Pl6* гена (Miller и Gulya, 1991). После неколико повратних укрштања На26 је преведена у отпорну На26R линију (Panković и сар., 2004). На биљном материјалу линија сунцокрета На26S и На26R које се разликују по присуству *Pl6* гена за отпорност према пламењачи, проучаван је одбрамбени одговор сунцокрета изазван биотичким стресом.

3.2.1. Секундарна инфекција сунцокрета

Клијанци две линије сунцокрета На26S и На26R, су гајене у климатизованим коморама (Сл. 5.) при контролисаним условима: температура 18-20°C, интензитет светлости 10-12 000 lux, релативна влажност ваздуха 70% (Tourvieille и сар., 2000a).



Слика 5. Гајење биљака у климатизованим коморама при контролисаним условима

У фази првог пара листова (10-14 дана након сетве), биљке су инокулисане суспензијом спора *Plasmopara halstedii* (секундарна инфекција), или третиране водом (контрола). У циљу праћења експресије гена важних у одговору биљака на стрес проузрокован инфекцијом гљивом *P. halstedii*, узорци биљног материјала су узети у различитим временским интервалима након инокулације. Временска зависност интеракције биљке и патогена проучавана је на скали од 2-96 сати (2h, 4h, 24h, 48h, 72h и 96h након инокулације). У сваком временском интервалу након секундарне инфекције биљака узети су групни узорци контролних и инокулисаних биљака обе линије сунцокрета. Групни узорци су направљени спајањем по 4 биљке. Сваки групни узорак је имао по 4 репликата. Биљни материјал је чуван на -70°C до екстракције РНК.

3.3. Изолација геномске ДНК и спектрофотометријско одређивање квалитета ДНК

Биљни материјал испитиваних линија и њихових F_3 фамилија (поглавље 3.1) је гајен и у пољу. Листови од 10-15 биљака од сваке линије и F_3 фамилије су спојени у групне узорке. Узорци су замрзнути у течном азоту и чувани на -70°C до изолације геномске ДНК. Геномска ДНК је екстрахована према методи Permingeat и сар., (1998) и протокол је детаљно описан у Прилогу 1.

Одређивање квалитета ДНК је урађено спектрофотометријски (Spectrofotometar Ultrospec 2000) у UV области. Мерене су апсорбанце на 3 таласне дужине: A_{260} , A_{280} и A_{230} nm. Да би се одредила чистоћа екстрахованих узорака израчунати су односи апсорбанци A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . На основу апсорбанце измерене на 260nm, концентрација ДНК у узорцима је приближно одређена, и подешена на 100ng/ μl .

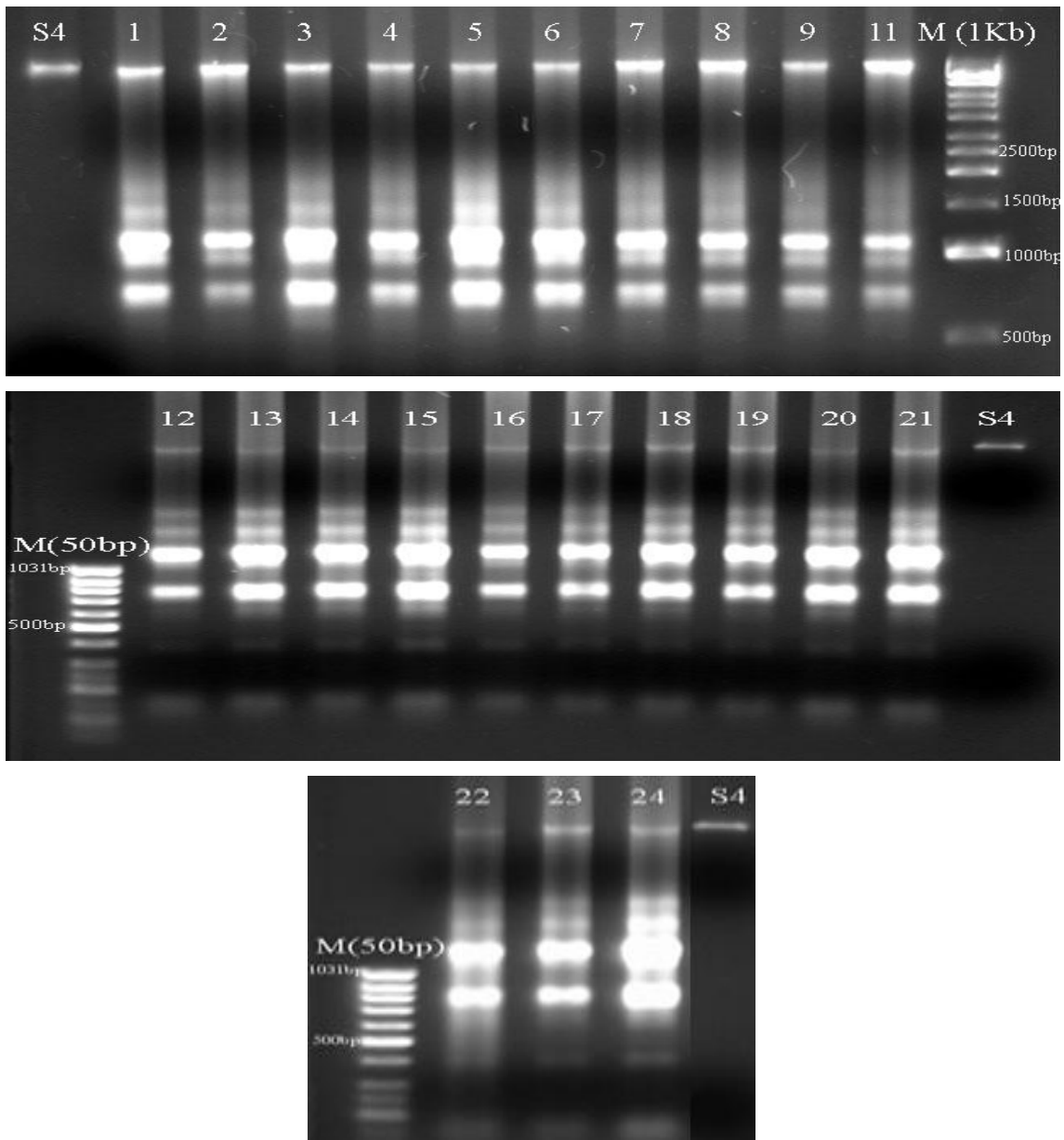
У овом раду су квалитет и концентрација ДНК испитиваних узорака проверени електрофорезом на агарозном гелу. Геномска ДНК која је екстрахована из свих F_3 групних узорака нанешена је у истој запремини на 0,7% агарозни гел који је обојен етидијум бромидом (0,05 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Поређењем са стандардима ДНК од 20 ng, 40 ng и 80 ng (λ DNA, Pharmacia Biotech) утврђено је да се концентрација у

испитиваним узорцима кретала од 20-40 ng/ μ l. На основу тога може се закључити да спектрофотометријски можемо само приближно одредити концентрацију ДНК у узорцима. Разлике у концентрацијама које се јављају између узорака, су последица интерференције ДНК са протеинима, који заостају у траговима у узорцима након завршене изолације, као и због присуства РНК.

3.4. Изолација и квантификација РНК

Из замрзнутих листова сунцокрета (групни узорци контролних и инокулисаних биљака На26S и На26R линије сунцокрета –Поглавље 3. 2. 1.) екстрахована је РНК. Протокол за екстракцију РНК (QIAQEN, RNeasy Mini Handbook, 52-55) детаљно је описан у Прилогу 2.

Одређивање квалитета РНК је урађено спектрофотометријски (Spectrofotometar Ultrospec 2000) у UV области. Мерене су апсорбанце на таласним дужинама од A_{260} и A_{280} nm. Да би се одредила чистоћа екстрахованих узорака израчунат је однос апсорбанци A_{260}/A_{280} . Однос A_{260}/A_{280} чисте РНК би требао да буде 1,9-2,1. Квалитет екстраховане РНК је проверен електрофорезом на 1% агарозном гелу који је обојен етидијум бромидом (0,05 μ l/ml) (Сл. 6).



Слика 6. Електрофореза РНК на 1% агарозном гелу. Бројевима 1-24 обележени су узорци РНК која је екстрахована из групних узорака контролних и инокулисаних биљака На26S и На26R линије сунцокрета. Узорци контролних и инокулисаних биљака су узети у временском интервалу 2-96h након секундарне инфекције суспензијом спора *Plasmopara halstedii*. S4(40ng) представља коришћени стандард (λ DNA, Pharmacia Biotech). Са М су означени стандарди 1kb ДНК лествица (Pharmacia Biosciences) и 50bp ДНК лествица (Fermentas).

3.5. Услови умножавања фрагмената ДНК применом методе PCR

За умножавање фрагмената ДНК методом PCR коришћена су 3 пара прајмера. Секвенце за прајмере HaP1, HaP2 и HaP3 који су коришћени за амплификацију маркера везаних на *P16* локусу приказане су у (Таб. 4).

Табела 4. Секвенце за прајмере који су коришћени за амплификацију маркера на *P16* локусу (Bouzidi и сар., 2002)

(5'-3') СЕКВЕНЦА		ПРАЈМЕР	Температура анилинга прајмера
Forward	GGTAATGGCTGTTGAATTTATGGAGC	HaP1	57°
Reverse	AGCATGATCCGGCTAGAGCCTTCTA		
Forward	GTCTACTACATGGTTTCCGTTTTTC	HaP2	59°
Reverse	TGCTTCTTCSTTCTATCTCACTC		
Forward	GTTTGTGGATCATCTCTATGCG	HaP3	59°
Reverse	TGCTTCTTCSTTCTATCTCACTC		

У случају свих коришћених прајмера HaP, амплификација је извршена са 40ng геномске ДНК, у присуству 0,4mM dNTP, 1U Таq ДНК полимеразе (Fermentas), 1X Таq пуфер, 0,6μM прајмера (Forward и Reverse), 3mM MgCl₂, 2μg/μl BSA (Bovine Serum Albumine). PCR са прајмерима HaP2 и HaP3 је урађен у Mastercycler gradient Eppendorf апарату користећи програм:

1 циклус: иницијална денатурација ДНК 4 min на 95°C;

30 циклуса:

- Денатурација на 95°C у трајању од 10s
- Анилинг на 59°C у трајању од 30s
- Екстензија на 67°C у трајању од 30s
- Финална екстензија на 67°C у трајању од 5 min

У случају амплификације фрагмената ДНК прајмером НаР1, коришћен је сличан програм при чему је једина разлика била температура анилинга прајмера која је износила 57°C. Продукти PCR реакције су раздвојени електрофорезом на 1% TBE агарозном гелу (SIGMA A-9539).

Слике гелова су снимљене са Bio-Print system (Vilber Laurmat, France), а величина умножених фрагмената је одређена користећи програм BIO-CAPT V. 97 (Vilber Laurmat, France).

3.6. Дигестија PCR производа и мапирање RGA и CAPS маркера

У циљу откривања кодоминантних CAPS маркера, коришћена су два рестрикциона ензима. PCR продукти добијени прајмером НаР3, су инкубирани 2h на 37°C са рестрикционим ензимима *RsaI* (Sigma) и *HhaI* (Amersham Biosciences), следећи метод Konieczny and Ausubel (1993).

Дигестија PCR производа је извршена у присуству 1X рестрикционог пуфера и 1U одговарајућег рестрикционог ензима. После дигестије рестрикционим ензимима CAPS маркери су раздвојени електрофорезом на 1% TBE агарозном гелу.

Односи раздвајања оцењених маркера у F₃ потомству испитиваних мапирајућих популација тестирани су χ^2 тестом. Тестирана је хипотеза да се оцењени маркери наслеђују на доминантно/рецесиван начин, односно да је наслеђивање у односу 3:1. На основу резултата χ^2 теста израчуната је вероватноћа за ниво значајности 0.05 на основу које је процењена прихватљивост постављене хипотезе. Доминантни хаплотипови откривени после амплификације са НаР1, НаР2 и НаР3 прајмерима, као и CAPS маркери су мапирани на мапе везаности које су конструисане помоћу програма MAPMAKER Version 2.0 (Lander и сар., 1987). Процент рекомбинација је претворен у центиморгана (сМ) преко мапирајуће функције према Kosambi (1944).

3.7. Промене у *Pl6* геномском региону

За испитивање промена у *Pl6* геномском региону коришћена је популација састављена од 37 рекомбинантних инбред линија сунцокрета (RIL). RIL су произведене из почетног укрштања JM8xHa19, где је линија JM8 извор гена *Pl6* за отпорност према пламењачи. Отпорност линија сунцокрета на патотип пламењаче 730 је одређена помоћу технике инокулације целог семена. Детаљи теста за процену отпорности, гајење биљака, ДНК екстракција, прајмер секвенце за ген *Pl6*, PCR услови, услови за дигестију PCR производа са рестрикционим ензимима у циљу откривања CAPS маркера и раздвајање PCR производа електрофорезом су исти као у претходним огледима и детаљно су описани у претходним потпоглављима.

3.8. Експресија гена важних у одговору биљака на стрес проузрокован инфекцијом патогеном *Plasmopara halstedii*

Екстрахована РНК је уз помоћ реверзне транскриптазе (Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) преведена у cDNK која је служила за анализу транскрипата гена важних у одговору биљака на стрес. За анализу транскрипата гена који су важни у одговору биљке на стрес (Насаох, Наохох, HaSODc, HaSODp, HaSOD1, Pal, Nachi, HaPR5, HaEDS1, HaEDR1), као и гена аналога за отпорност према болестима (RGA на *Pl6* локусу), коришћен је семиквантитативни RT-PCR. За умножавање фрагмената у PCR-у коришћено је 11 прајмера, а свака реакција у PCR-у урађена је у 2 понављања. Секвенце за прајмере који су коришћени за амплификацију маркера приказане су у Таб. 5.

Табела 5. Секвенце прајмера, Tm (температура анилинга прајмера) и број циклуса у PCR-у

Ген	Опис	Прајмер	Tm(°C)	Број циклуса	Референца	Приступни број
Ha-EDS1	Сигнални ген (повећана осетљивост на болести)	Forward 5'-GTCCCTCGGATAATGCTTGCTC-3' Reverse 5'-CATGCAGCATAACTTGCAACAG-3'	53	36	Radwan и сар., 2005.	AY645209
Ha-EDR1	Сигнални ген (повећана отпорност на болести)	Forward 5'-TTATACAAACTGCTCCATCGTAC-3' Reverse 5'-TTGGAGTCTTCAAATCCCTGTGC-3'	55	33	Radwan и сар., 2005.	AY645208
Начи	Хитиназа	Forward 5'-TTGGGTCTGTGGCTAACAAA-3' Reverse 5'-GATTTGCATGGGGATATTGC-3'	59	30	Mazeyrat и сар., 1999.	U96640
Ha-PR5	Ген који се активира у процесу патогенезе	Forward 5'-GGATGCAACAATCCTTGCACGG-3' Reverse 5'-TGGTCGGGTCATCTTGAGGG-3'	59	30	Radwan и сар., 2005, 2010.	AF364864
Наохох	Оксалат оксидаза	Forward 5'-GTTCAAGAGGGTGGACTTCG-3' Reverse 5'-TTTCTCCCCATTCACCTTGCT-3'	59	30	Hu и сар., 2003.	AU718274
Насаох	Карбохидрат оксидаза	Forward 5'-TCTTCTGCAACTTCCCGTTC-3' Reverse 5'-AACATGTTCCGGCTGTGATGA-3'	54	33	Custers и сар., 2004.	AAL77103
PAL	Фенилаланин амонијум лиаза	Forward 5'-ATAACAATGGGTGCTTTCG-3' Reverse 5'-GTTTTCTTGCAGGAAATCAA-3'	59	30	Mazeyrat и сар., 1999.	Y12461
HaSOD1	Cu/Zn –прекурсор супероксид дисмутаза	Forward 5'-AGCGTTGAAGGCGTTGTTAC-3' Reverse 5'-GCGAATTTCTGCTTTCAGGAG-3'	59	30	Fernandez и сар., 2011.	AJ786257
HaSODc	Цитоплазматска Cu/Zn –супероксид дисмутаза	Forward 5'-AATCCTCATGGAAAGGAGCA-3' Reverse 5'-TCATCAGGATCAGCATGGAC-3'	59	30	Herbette и сар., 2003.	AY172569
HaSODp	Пластидна Cu/Zn –супероксид дисмутаза	Forward 5'-CAAACGGGTGCATATCAACA-3' Reverse 5'-AAGCTCATGAACCAAGG-3'	59	30	Herbette и сар., 2003.	AY172568
Ha-EF1	Конститутивни елонгациони фактор ("housekeeping" ген)	Forward 5'-AGGCGAGGTATGATGAAATTGTCA-3' Reverse 5'-GTCTCTGGGCTCATTTGTTGGT-3'	59	30	Korossi и сар., 2011.	AAM19764

PCR амплификација је извршена са 500ng cDNK, у присуству 0,4 mM dNTP, 1U Taq ДНК полимеразе (Fermentas), 1X Taq пуфер, 0,6μM прајмера (Forward и Reverse), 3mM MgCl₂, 2μg/μl BSA (Bovine Serum Albumine). PCR са већином коришћених прајмера је урађен у Mastercycler gradient Eppendorf апарату користећи програм који се изводи у следећим условима:

1 циклус: иницијална денатурација ДНК 4 min на 95°C;

30 циклуса:

- Денатурација на 95°C у трајању од 10s
- Анилинг на 59°C у трајању од 30s
- Екстензија на 67°C у трајању од 30s
- Финална екстензија на 67°C у трајању од 5 min

Код прајмера Насаох, Ha-EDR1 и Ha-EDS1, коришћен је сличан програм при чему је једина разлика била температура анилинга прајмера и број циклуса (Таб. 5). Продукти реакције PCR су раздвојени електрофорезом на 1% ТВЕ агарозном гелу (SIGMA A-9539) који је обојен етидијум бромидом. Квантификација производа PCR реакције урађена је применом програма BIO-CAPT (Vilber Lourmat, France). Након квантификације извршена је нормализација у односу на сигнале присутне код Ha-EF1 (који је коришћен као конститутивно присутан односно "housekeeping" ген), а релативне акумулације транскрипата гена приказане су графички као у раду Radwan и сар., (2005).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Начин наслеђивања отпорности према патотипу 730 пламењаче

Линије сунцокрета На336, ЈМ8 и На338 се често користе у савременим програмима оплемењивања као извори гена отпорности према проузроковачу пламењаче (Vert и сар., 2001; Јосић и сар., 2012). На336 и ЈМ8 су донори *Pl6* гена, а На338 је донор *Pl7* гена (Таб. 2). У овом раду испитивано је потомство из укрштања линије сунцокрета На26S (родитељска линија осетљива на пламењачу) са линијом ЈМ8. Осетљива родитељска линија На26S је такође укрштена и са линијама На338 и На26R. Из ових укрштања произведене су три мапирајуће популације; прва се састојала од 73 F₃ фамилије, друга од 75 а трећа такође од 73 F₃ фамилије.

Отпорност родитељских линија сунцокрета и њиховог F₃ потомства на патотип пламењаче 730 је испитивана на најмање 50 биљака од сваке инбред линије и F₃ фамилије применом технике инокулације целог семена. Код осетљивих инфицираних биљака на котиледонима је дошло до појаве зооспорангије, беле навлаке састављене од спора *Plasmopara halstedii* (Сл. 7). Све биљке на којима није дошло до спорулације оцењене су као отпорне (Сл. 8). Линије ЈМ8, На338 и На26R су биле 100% отпорне (R), док је линија На26S била 100% осетљива (S).

У првој популацији, од 73 оцењене F₃ фамилије 52 фамилије су биле отпорне, док је 21 фамилија била осетљива. (Таб. 6). Резултати теста отпорности у другој популацији показали су да је од 75 оцењених F₃ фамилија, 56 фамилија било отпорно а 19 фамилија су осетљиве према патотипу 730 пламењаче, док је у случају треће популације 54 F₃ фамилије било отпорно а 19 су осетљиве. Резултати χ^2 теста су потврдили да је однос раздвајања отпорних и осетљивих F₃

фамилија одговарао односу 3 : 1 у све три испитиване популације (Таб. 6). На основу добијених резултата потврђено је да је отпорност на патотип пламењаче 730 контролисана једним геном.

Табела 6. Отпорност на патотип 730 пламењаче у испитиваним популацијама

Испитивана популација	Осетљив родитељ	Отпоран родитељ	Број F ₃ фамилија	Однос раздвајања (експерименталне вредности оцењених F ₃ фамилија) отпорне : осетљиве	Очекивани однос раздвајања отпорне:осетљиве	χ^2	P
1.	Ha26S	JM8	73	52 : 21	3 : 1	0,55	0,46
2.	Ha26S	Ha338	75	56 : 19	3 : 1	0,00	0,95
3.	Ha26S	Ha26R	73	54 : 19	3 : 1	0,04	0,84



Слика 7. Спорулација на котиледонима осетљивих биљака



Слика 8. Отпорне биљке не показују симптоме пламењаче

4.2. Наслеђивање маркера за аналоге гена отпорности на пламењачу у испитиваним мапирајућим популацијама сунцокрета

У овом раду су за испитивање наслеђивања отпорности према пламењачи, на молекуларном нивоу, коришћени PCR маркери који су лоцирани у региону *P16* локуса (Bouzidi и сар., 2002; Slabaugh и сар., 2003; Panković и сар., 2004). У анализи геномске ДНК која је изолована из 73 групна узорка у првој, 75 групних узорка у другој и 73 групна узорка у трећој популацији коришћена су три пара прајмера: HaP1, HaP2 и HaP3 (Таб. 4). Лисни материјал са 5-12 појединачних биљака из сваке F₃ фамилије је груписан у 1 узорак. Укупно је анализирано 73 групна узорка у првој, 75 у другој и 73 групна узорка у трећој испитиваној популацији.

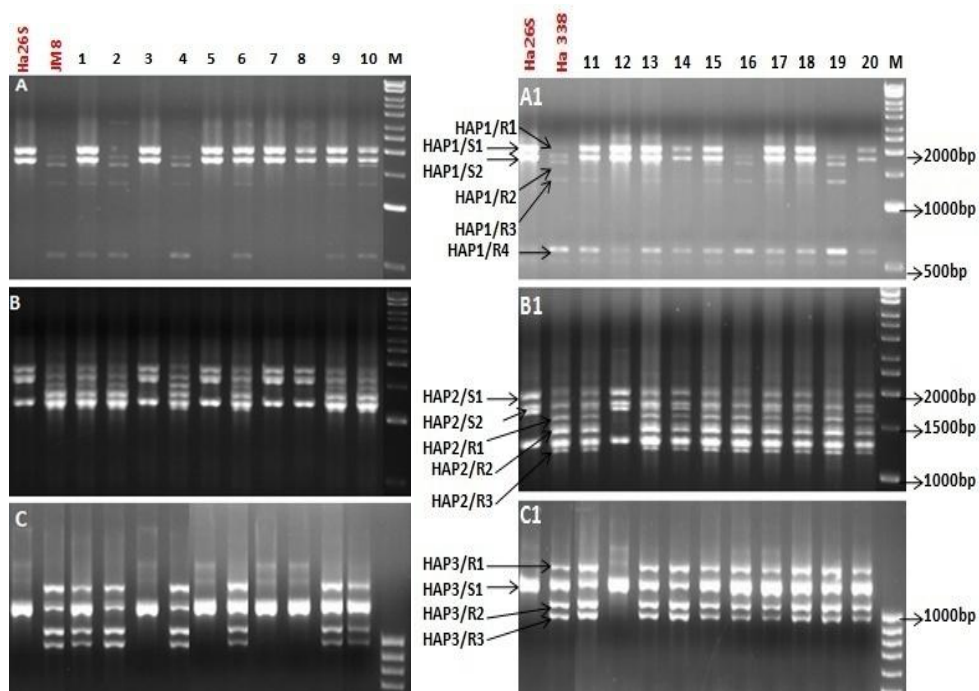
Четири маркера (R1 1870bp, R2 1690bp, R3 1340bp, R4 590bp) који су специфични за отпорне родитељске линије (JM8, Ha338) умножени су прајмером HaP1 (Сл. 9A и 9A1). На слици 9A су приказани и резултати добијени на 10 F₃

фамилија (F₃3.-F₃12.) из прве мапирајуће популације. Види се да се хаплотип који одговара отпорној родитељској линији појављује код 2 F₃ фамилије (позиција 2 и 4, Сл. 9А). Од укупно 73 испитане F₃ фамилије у првој мапирајућој популацији, овај хаплотип се појавио код 48 F₃ фамилија (Таб. 7А). Појава овог хаплотипа је такође установљена и код две F₃ фамилије приказане на слици 9А1 (позиције 16 и 19), односно укупно 56 од 75 F₃ фамилија у другој мапирајућој популацији (Таб. 7В). Два маркера (S1 2020bp и S2 1780bp), специфични за осетљивог родитеља (На26S) умножени су у 8 F₃ фамилија приказаних на слици 9А (позиције 1, 3, 5-10), а такође и код 8 F₃ фамилија приказаних на слици 9А1 (11-15, 17, 18 и 20). Ова 2 маркера су умножена у укупно 19 F₃ фамилија прве мапирајуће популације, као и код 17 F₃ фамилија друге мапирајуће популације (Табела 7А и В).

Резултати добијени прајмером НаР2 су приказани на Слици 9В и 9В1. Три маркера (R1 1530bp, R2 1370bp, R3 1190bp) су умножена код отпорних родитељских линија (JM8, На338 и На26R). Маркери карактеристични за отпорне родитељске линије умножени су код 6 F₃ фамилија приказаних на Слици 9В (1, 2, 4, 6, 9 и 10) као и код 9 F₃ фамилија приказаних на Слици 9В1 (11, 13-20). Хаплотип карактеристичан за отпорне родитељске линије је добијен код укупно 51 F₃ фамилије у првој мапирајућој популацији, односно код 53 F₃ фамилије друге мапирајуће популације (Табела 7А и В). У осетљивој родитељској линији (На26S), као и код четири F₃ фамилије у првој мапирајућој популацији (Сл. 9В позиције 3, 5, 7 и 8), односно једне F₃ фамилије у другој мапирајућој популацији (Сл. 9В1 позиција 12), умножена су два маркера (S1 1950bp и S2 1610bp). Хаплотип карактеристичан за осетљиву родитељску линију је добијен укупно код 21 F₃ фамилије у првој мапирајућој популацији, односно у 22 F₃ фамилије у случају друге мапирајуће популације (Таб. 7А и В).

Фрагменти умножени прајмером НаР3 приказани су на Слици 9С и 9С1. Три фрагмента (R1 1720 bp, R2 1060bp, R3 940bp) су била карактеристична за отпорне родитељске линије. Овакав хаплотип се појавио код 6F₃ фамилија приказаних на Слици 9С (1, 2, 4, 6, 9 и 10), као и код 9F₃ фамилија приказаних на Слици 9С1 (11, 13-20). Од укупно 73 анализираних F₃ фамилије из прве мапирајуће популације, појава овог хаплотипа је присутна код 52 F₃ фамилије (Таб. 7А). У

другој мапирајућој популацији овај хаплотип је присутан код 56 од укупно 75 анализираних F₃ фамилија (Таб. 7В).

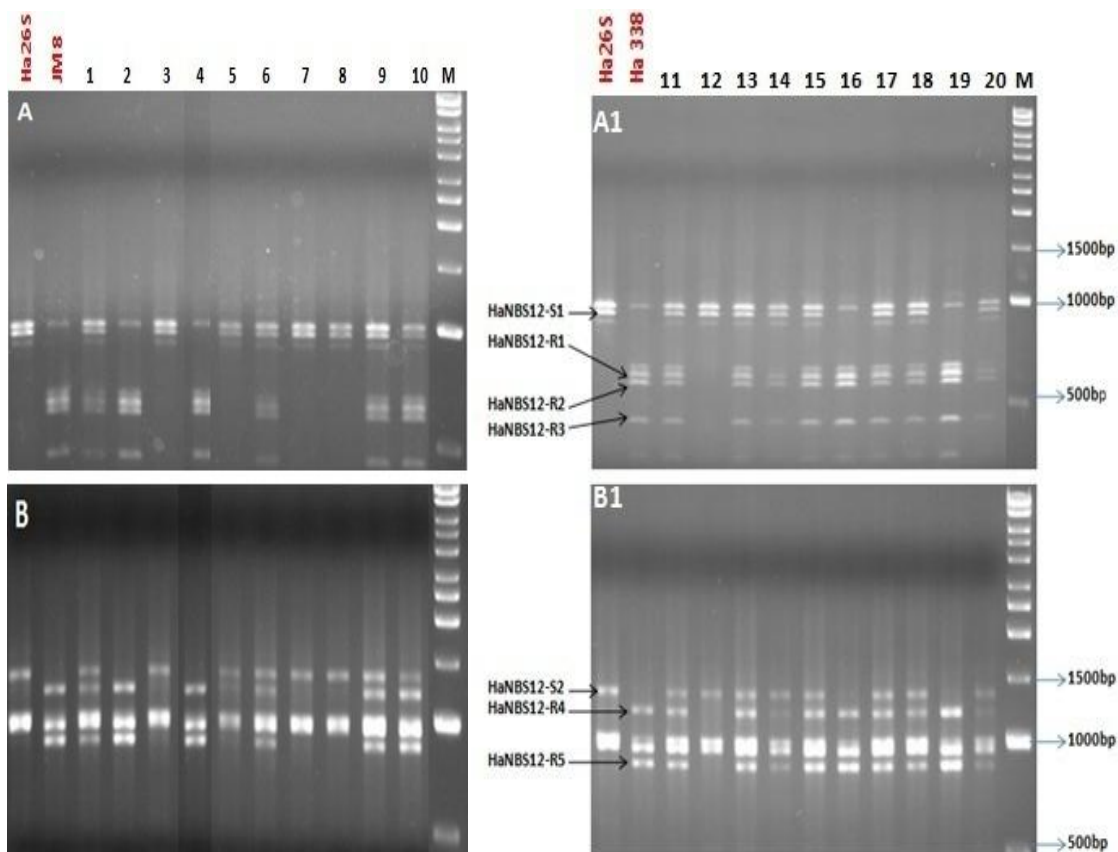


Слика 9. А, В, С, А1, В1, С1. Умножени фрагменти добијени прајмерима НаР1, НаР2 и НаР3; Профил осетљиве родитељске линије (На26S) и профили отпорних родитељских линија ЈМ8 и На338 на сликама гелова означени су црвеном бојом. Профили добијени на 10 F₃ фамилија (F₃3.-F₃12.) из укрштања На 26S X ЈМ8 приказани су на позицијама 1-10. Позиције 11-20 одговарају F₃ фамилијама (F₃127.-F₃136.) из укрштања На 26S X На338. Са М је означен стандард 1kb (гелови А, А1, В и В1) ДНК лествица (Pharmacia Biosciences) и 100bp Fermentas (гелови С и С1). Фрагменти величине 500, 1000, 1500, и 2000 bp су обележени стрелицама. Означено је 15 маркера који су умножени у осетљивој или отпорним родитељским линијама.

*Профили добијени на 10 F₃ фамилија из укрштања На26S X На26R нису приказани као слика гелова. Профили осетљиве На26S и отпорне линије На26R са свим коришћеним прајмерима одговарају профилу осетљиве односно отпорних родитељских линија које су коришћене за добијање прве и друге мапирајуће популације.

Један амплификовани фрагмент означен као (S1 1330bp) био је заједнички и за отпорне (ЈМ8, На338) и за осетљиву родитељску линију (На26S) (Сл. 9С и 9С1). Овај фрагмент означен као HAP3/S1 (1330 bp) био је присутан код свих анализираних F₃ фамилија у све три испитиване популације.

PCR производи добијени прајмером НаР3 су инкубирани рестрикционим ензимима *RsaI* и *HhaI*, а резултати су приказани на Слици 10 А, А1, В и В1. Дигестијом производа PCR реакције добијених прајмером НаР3 рестрикционим ензимима *HhaI* и *RsaI* добијени су CAPS маркере уз помоћ којих је могуће разликовати хомозиготне отпорне од хетерозиготне отпорних фамилија.



Слика 10. А, А1, В и В1. CAPS маркери добијени дигестијом PCR продуката умножених прајмером HaP3. Рестрикциони ензими *RsaI* (А) и *HhaI* (В) су коришћени за дигестију. CAPS маркери у спрегнутој фази са присуством отпорности (R) и неспрегнутој фази са присуством отпорности (S) су означени стрелицама. М означава стандард (1kb ДНК лествица Pharmacia Biosciences); фрагменти величине 1500, 1000 и 500 bp су обележени стрелицама. Профил осетљиве родитељске линије (Ha26S) и профили отпорних родитељских линија JM8 и Ha338 на сликама гелова означени су црвеном бојом. Профили 10 F₃ фамилија (F₃3.-F₃12.) из укрштања Ha 26S X JM8 приказане су на позицијама 1-10. Позиције 11-20 одговарају F₃ фамилијама (F₃127.-F₃136.) из укрштања Ha26S X Ha338.

*Профили добијени на 10 F₃ фамилија из укрштања Ha26S X Ha26R нису приказани као слика гелова. Профили осетљиве Ha26S и отпорне линије Ha26R су одговарали профилима осетљиве односно отпорних родитељских линија које су коришћене за добијање прве и друге мапирајуће популације.

У отпорним родитељским линијама (JM8 и Ha338), појављују се CAPS маркери означени као Ha-NBS-12/R1 (635 bp), Ha-NBS-12/R2 (605 bp), Ha-NBS-12/R3 (425 bp) (Слика 10А и А1) као и Ha-NBS-12/R4 (1210 bp), Ha-NBS-12/R5 (880 bp) (Слика 10В и В1), који су у спрегнутој фази са присуством отпорности. Појава ових маркера установљена је и код две F₃ фамилије приказане на Слици 10А и В (2 и 4), као и код две F₃ фамилије приказане на Слици 10А1 и В1 (16 и 19). Фрагменти који су у неспрегнутој фази са присуством отпорности Ha-NBS-12/S1 (970 bp) и Ha-NBS-12/S2 (1380 bp) појављују се код осетљиве родитељске линије (Ha26S), као и код 4 F₃ фамилије (3, 5, 7 и 8 приказаних на Слици 10А и В, а такође и код F₃ фамилије 12 приказане на Слици 10А1 и В1). У првој мапирајућој популацији идентификоване су 22 F₃ фамилије са идентичним хаплотипом као код отпорног родитеља, 19 са идентичним хаплотипом као код осетљивог родитеља, а 32 F₃ фамилије је имало фрагменте из оба хаплотипа (Таб. 7А). У другој мапирајућој популацији идентификовано је 19 F₃ фамилија са идентичним хаплотипом као код отпорног родитеља, 18 са идентичним хаплотипом као код осетљивог родитеља, а 38 F₃ фамилија је имало фрагменте из оба хаплотипа (Таб. 7В).

Табела 7А, 7В и 7С. Очекивани односи сегрегације за RGA маркере који су у спрегнутој фази (маркери означени са R) или неспрегнутој фази (маркери означени са S) са геном који обезбеђује отпорност на патотип пламењаче 730, и односи сегрегације у случају CAPS маркера у испитиваним популацијама сунцокрета.

Табела 7. А				
F₃ потомство из укрштања JM8 xHa26S				
DNK маркер (хаплотип)	Однос сегрегације (експерименталне вредности)	Очекивани однос раздвајања	χ^2	P
HaP1S	54 : 19	3 : 1	0,04	0,90
HaP1R	49 : 24	3 : 1	3,33	0,05
HaP2S	52 : 21	3 : 1	0,55	0,50
HaP2R	51 : 22	3 : 1	1,03	0,25
HaP3	52 : 21	3 : 1	0,55	0,50
<i>HhaI</i>	22 : 32 : 19	1 : 2 : 1	1,36	0,50
<i>RsaI</i>	22 : 32 : 19	1 : 2 : 1	1,36	0,50
патотип 730	52 : 21	3 : 1	0,55	0,50
Табела 7. В				
F₃ потомство из укрштања Ha338 xHa26S				
ДНК маркер (хаплотип)	Однос сегрегације (експерименталне вредности)	Очекивани однос раздвајања	χ^2	P
HaP1S	58 : 17	3 : 1	0,22	0,75
HaP1R	56 : 19	3 : 1	0,004	0,95
HaP2S	53 : 22	3 : 1	0,75	0,50
HaP2R	56 : 19	3 : 1	0,004	0,95
HaP3	56 : 19	3 : 1	0,004	0,95
<i>HhaI</i>	19 : 38 : 18	1 : 2 : 1	0,04	0,97
<i>RsaI</i>	19 : 38 : 18	1 : 2 : 1	0,04	0,97
патотип 730	56 : 19	3 : 1	0,004	0,95

Табела 7. наставак

Табела 7. С				
F₃ потомство из укрштања				
Ha26R xHa26S				
ДНК маркер (хаплотип)	Однос сегрегације (експерименталне вредности)	Очекивани однос раздвајања	χ^2	P
HaP1S	56 : 26	3 : 1	1,97	0,16
HaP1R	59 : 23	3 : 1	0,41	0,52
HaP2S	62 : 20	3 : 1	0,02	0,90
HaP2R	61 : 21	3 : 1	0,02	0,90
HaP3	61 : 21	3 : 1	0,02	0,90
<i>HhaI</i>	27 : 34 : 21	1 : 2 : 1	1,68	0,50
<i>RsaI</i>	27 : 34 : 21	1 : 2 : 1	1,28	0,50
патотип 730	54 : 19	3 : 1	0,04	0,84

Начин наслеђивања, тј однос сегрегације за неколико RGA маркера (добитених након амплификације са HaP1, HaP2 и HaP3 прајмерима), односно хаплотипова и CAPS маркера у три испитиване популације сунцокрета су представљени у Табели 7. Тестирана је хипотеза да се RGA маркери наслеђују на доминатно/рецесиван начин, односно да је наслеђивање у односу 3:1. На основу резултата χ^2 теста израчуната је вероватноћа за ниво значајности 0.05. Према добијеним резултатима ова хипотеза је прихватљива за све RGA маркере осим за HaP1R и то само у случају популације под редним бројем један (Таб. 7А). У све три испитиване популације сви остали маркери се уклапају у доминатно – рецесивни тип наслеђивања, односно раздвајали су се у односу 3:1, без обзира на родитељске линије које су биле извори *Pl* гена. CAPS маркери (*HhaI* и *RsaI*) су се увек раздвајали у односу 1:2:1, односно наслеђују се кодоминантно (Таб. 7А, 7В и 7С).

4.3. Скрининг RGA хаплотипова

Неколико маркера (Bouzidi и сар., 2002; Slabaugh и сар., 2003) за отпорност сунцокрета према пламењачи је мапирано на LG8 у *P16* геномском региону (Bouzidi и сар., 2002; Slabaugh и сар., 2003). Један од циљева овог рада је био да се утврди распоред доминантних RGA и кодоминантних CAPS маркера на линкејд мапама *P16* региона сунцокрета у испитиваним популацијама сунцокрета које су коришћене за мапирање.

Приликом скрининга RGA хаплотипова добијених са НаP1 и НаP2 прајмерима на геномској ДНК изолованој из F₃ фамилија у три мапирајуће популације, примећено је да се не појављују само хаплотипови типични за отпорног или осетљивог родитеља, већ су некад заступљени хаплотипови оба родитеља истовремено. Због тога је присуство хаплотипова који одговарају отпорном или осетљивом родитељу добијених са НаP1 и НаP2 прајмерима обележено на следећи начин. У случају НаP1R одсуство хаплотипа отпорног родитеља је обележено са В, док је присуство обележено са D. У случају НаP1S одсуство хаплотипа осетљивог родитеља је означавано са А а присуство са С. На исти начин су означавани хаплотипови НаP2R и НаP2S. У случају хаплотипова добијених прајмером НаP3 присуство хаплотипа отпорног родитеља је обележено са D, а присуство хаплотипа осетљивог родитеља са В. Код кодоминантних маркера добијених дигестијом фрагмената рестрикционим ензимима *HhaI* и *RsaI*, после амплификације са прајмером НаP3, појава хаплотипа отпорног родитеља означена је са А, осетљивог са В, а присуство оба хаплотипа истовремено са Н. Из Табеле 8А, 8В и 8С се види да су хаплотипови НаP1 R и S и НаP2 R и S, наслеђивани у комбинацијама BC, DA и DC. Хаплотип НаP3 и пратећи *HhaI* и *RsaI* су наслеђивани у комбинацијама В, В, В; D, А, А и D, Н, Н. Најчешће наслеђивање хаплотипова било је у следећим комбинацијама:

BC BC BBB;

DA DA DAA;

DC DC DHH.

Међутим, дошло је и до појаве рекомбинација између маркера. У првој мапирајућој популацији рекомбинације између маркера су се појавиле у пет F_3 фамилија (10, 14, 17, 54, 63 и 74), које су у табели 8А означене црвеном бојом. У табели 8В је црвеном бојом означено седам F_3 фамилија (82, 115, 117, 118, 124, 126 и 150) из друге мапирајуће популације код којих је дошло до рекомбинација између маркера, док је у трећој популацији црвеном бојом означено три F_3 фамилије код којих је дошло до рекомбинација између маркера (Табела 8С).

Табела 8А, 8В и 8С. Оцена отпорности F₃ фамилија базирана на присуству специфичних маркера на *Pl6* локусу користећи прајмере HaP1, HaP2, HaP3 и рестрикционе ензиме *HhaI* и *RsaI*.

У случају прајмера HaP1 и HaP2: A=одсуство хаплотипа осетљивог родитеља; B=одсуство хаплотипа отпорног родитеља; C=присуство хаплотипа осетљивог родитеља; D=присуство хаплотипа отпорног родитеља;

У случају прајмера HaP3: B=хаплотип осетљивог родитеља; D= хаплотип отпорног родитеља;

У случају отпорности на патотип пламењаче 730: B=хаплотип осетљивог родитеља; D= хаплотип отпорног родитеља;

У случају рестрикционих ензима *HhaI* и *RsaI*: A=присуство хаплотипа отпорног родитеља; B= присуство хаплотипа осетљивог родитеља; H=присуство оба хаплотипа

Табела 8А.

Редни број	Прајмер/генотип	HaP1R	HaP1S	HaP2R	HaP2S	HaP3	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>	Отпорност патотип 730
1.	1. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
2.	2. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
3.	3. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
4.	4. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
5.	5. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
6.	6. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
7.	7. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
8.	8. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
9.	9. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
10.	10. F ₃	D	C	B	C	B	B	B	B
11.	11. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
12.	12. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
13.	13. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
14.	14. F ₃	B	C	D	C	D	H	H	D
15.	15. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
16.	16. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
17.	17. F ₃	B	C	D	C	D	H	H	D
18.	18. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
19.	19. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
20.	20. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
21.	21. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
22.	22. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
23.	23. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
24.	24. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
25.	25. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
26.	26. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
27.	27. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
28.	28. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D

F₃ потомство из укрштања JM8xHa26S

Табела 8А. наставак

	Редни број	Прајмер/ генотип	HaP1R	HaP1S	HaP2R	HaP2S	HaP3	HhaI	RsaI	отпорност патотип 730
F ₃ потомство из укрштања JM8xHa26S	29.	29. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	30.	30. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	31.	31. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	32.	32. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	33.	33. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	34.	34. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	35.	35. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	36.	36. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	37.	37. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	38.	38. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	39.	39. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	40.	41. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	41.	44. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	42.	45. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	43.	46. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	44.	47. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	45.	48. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	46.	49. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	47.	50. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	48.	51. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	49.	52. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	50.	53. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	51.	54. F ₃	D	C	D	A	D	H	H	D
	52.	55. F ₃	B	C	B	C	D	B	B	D
	53.	56. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	54.	57. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	55.	58. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	56.	59. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	57.	60. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	58.	61. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	59.	62. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	60.	63. F ₃	B	C	D	C	D	H	H	D
	61.	64. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	62.	65. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	63.	66. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	64.	67. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	65.	68. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	66.	69. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	67.	70. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	68.	71. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	69.	72. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	70.	73. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	71.	74. F ₃	D	C	D	A	D	H	H	D
	72.	75. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	73.	76. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B

Табела 8 В.

Редни број	Прајмер/ генотип	HaP1R	HaP1S	HaP2R	HaP2S	HaP3	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>	отпорност патотип 730
1.	78. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
2.	79. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
3.	80. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
4.	81. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
5.	82. F ₃	D	A	D	C	D	H	H	D
6.	83. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
7.	84. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
8.	85. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
9.	86. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
10.	87. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
11.	88. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
12.	89. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
13.	90. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
14.	91. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
15.	92. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
16.	93. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
17.	94. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
18.	95. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
19.	96. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
20.	97. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
21.	98. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
22.	99. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
23.	100. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
24.	101. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
25.	102. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
26.	103. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
27.	104. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
28.	105. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
29.	106. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
30.	107. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
31.	108. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
32.	109. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
33.	110. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
34.	111. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
35.	112. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
36.	113. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
37.	114. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
38.	115. F ₃	D	C	D	A	D	H	H	D
39.	116. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
40.	117. F ₃	D	C	D	A	D	H	H	D
41.	118. F ₃	D	C	D	A	D	H	H	D
42.	119. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
43.	120. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
44.	121. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D

F₃ потомство из укрштања Ha338xHa26S

Табела 8В. наставак

	Редни број	Прајмер/ генотип	HaP1R	HaP1S	HaP2R	HaP2S	HaP3	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>	отпорност патотип 730
F ₃ потомство из укрштања Ha338xHa26S	45.	123. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	46.	124. F ₃	D	C	D	A	D	A	A	D
	47.	125. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	48.	126. F ₃	D	C	D	A	D	A	A	D
	49.	127. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	50.	128. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	51.	129. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	52.	130. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	53.	131. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	54.	132. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	55.	133. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	56.	134. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	57.	135. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	58.	136. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	59.	137. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	60.	138. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	61.	139. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	62.	140. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	63.	141. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	64.	142. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	65.	143. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	66.	144. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	67.	145. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
	68.	146. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	69.	147. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D
70.	148. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B	
71.	149. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D	
72.	150. F ₃	D	C	D	A	D	H	H	D	
73.	151. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B	
74.	152. F ₃	D	C	D	C	D	H	H	D	
75.	153. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B	

Табела 8С.

Редни број	Прајмер/ генотип	HaP1R	HaP1S	HaP2R	HaP2S	HaP3	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>	отпорност патотип 730
1.	3. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
2.	4. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
3.	5. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
4.	6. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
5.	7. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
6.	9. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	-
7.	10. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
8.	11. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
9.	12. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
10.	13. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
11.	14. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
12.	15. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
13.	16. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
14.	17. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	-
15.	18. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
16.	19. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
17.	20. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
18.	21. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
19.	22. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	-
20.	23. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
21.	24. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
22.	25. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
23.	26. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
24.	27. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	-
25.	28. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	-
26.	29. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
27.	30. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
28.	31. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
29.	32. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
30.	33. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
31.	34. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
32.	35. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
33.	36. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	-
34.	37. F ₃	B	C	B	C	D	D	D	D
35.	38. F ₃	B	C	B	C	D	H	H	D
36.	39. F ₃	B	C	D	A	D	H	H	D
37.	40. F ₃	B	C	B	C	D	A	A	D
38.	41. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D
39.	42. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D
40.	43. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D
41.	44. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D

F₃ потомство из укрштања Ha26RxHa26S

Табела 8С. наставак

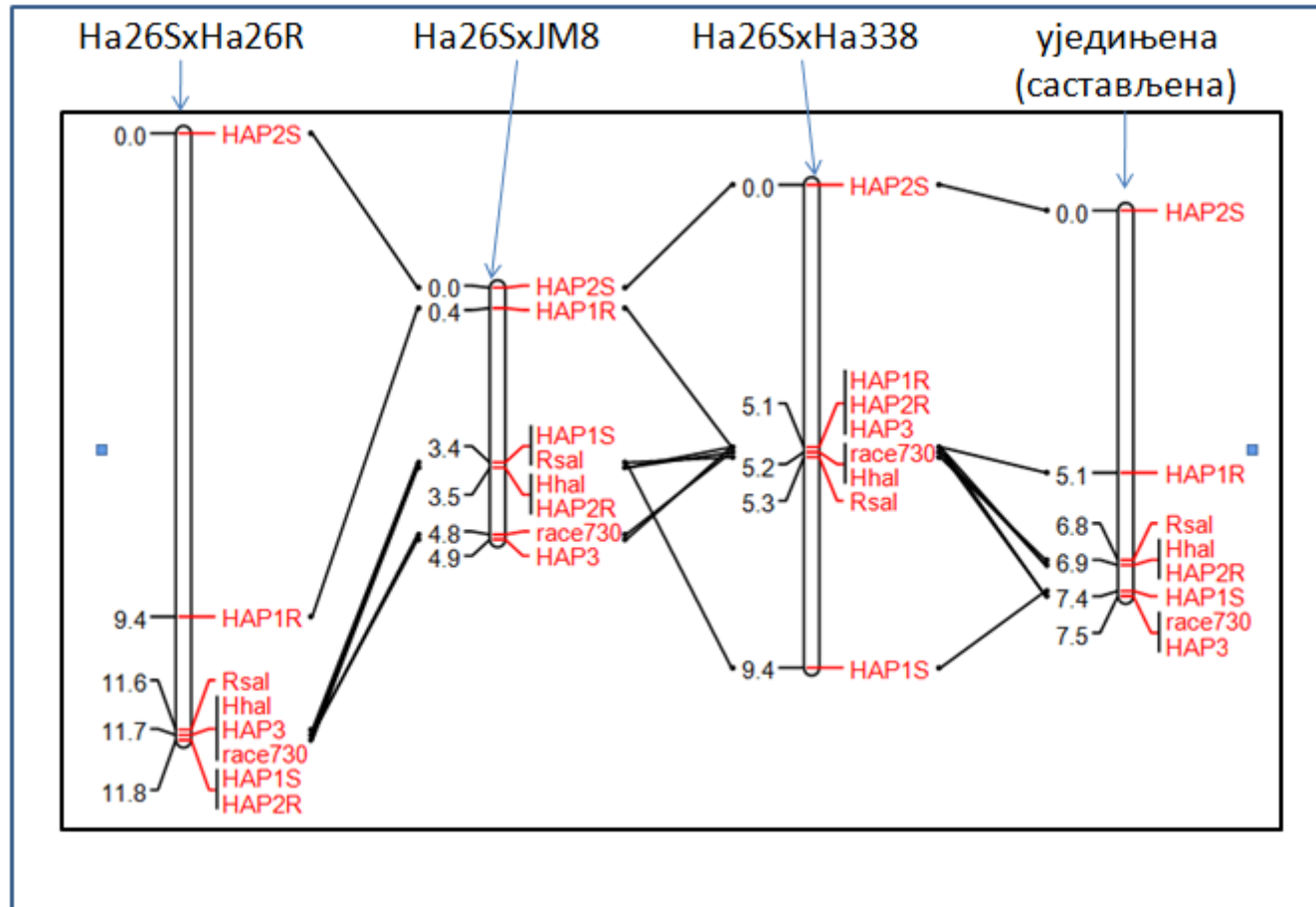
	Редни број	Прајмер/ генотип	HaP1R	HaP1S	HaP2R	HaP2S	HaP3	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>	отпорност патотип 730
F ₃ потомство из укрштања Ha26RxHa26S	42.	45. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	43.	46. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	44.	47. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	-
	45.	48. F ₃	B	C	D	A	D	H	H	D
	46.	49. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	47.	50. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	48.	51. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	49.	52. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D
	50.	53. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	51.	54. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	52.	55. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	-
	53.	56. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	54.	57. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	55.	58. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	56.	59. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	57.	60. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	58.	61. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	59.	62. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D
	60.	63. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	61.	64. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	62.	65. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	63.	66. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	64.	67. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D
	65.	68. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	66.	69. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	67.	70. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	68.	71. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
	69.	72. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	70.	73. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	71.	74. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D
	72.	75. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B
	73.	76. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D
74.	77. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D	
75.	78. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D	
76.	79. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	D	
77.	80. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D	
78.	81. F ₃	B	C	B	C	B	B	B	B	
79.	82. F ₃	D	A	D	A	D	H	H	D	
80.	83. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D	
81.	84. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D	
82.	85. F ₃	D	A	D	A	D	A	A	D	

Седам хаплотипова у спрегнутој или неспрегнутој фази са присуством отпорности, 5 доминантних и 2 кодоминантна (Таб. 7), су мапирана у свакој популацији. Рекомбинације између маркера су израчунате из података за сваку мапирајућу популацију посебно (Таб. 8А, 8В и 8С), а процена хетерогености је тестирана користећи максимум вероватноће према Morton (1956). Резултати теста хетерогености између рекомбинантних фракција за сваки пар маркера између три популације, омогућили су конструисање уједињене мапе.

4.3.1. Линкејц мапе *Pl6* региона сунцокрета

Линкејц мапе за сваку мапирајућу популацију као и композитна мапа базирана на уједињеним подацима из свих популација су конструисане према програму MAPMARKER Verzion 2.0 (Lander и сар., 1987) и приказане су на Слици 11.

LG8



Слика 11. Линкејџ мапе *Plb* региона сунцокрета у испитиваним популацијама за мапирање као и уједињена (састављена) мапа која показује положај RGA и CAPS маркера који пружају отпорност на патотип пламењаче 730

На линкејџ мапама *Pl6* региона сунцокрета добијеним на три испитиване мапирајуће популације маркери су распоређени на дистанци од ~5 до ~12 cM. Распоред маркера HaP2S и HaP1R је био идентичан у све три мапирајуће популације. Маркери *RsaI* и *HhaI* су мапирани као следећи по редоследу код свих популација за мапирање изузев популације два (Ha26SXHa338), где је њихов положај померен за 0.2 cM. Следећи је маркер HaP3, он се једино код мапирајуће популације (Ha26SXJM8) налази на крају локуса. Положај гена за отпорност према патотипу пламењаче 730 је сличан код све три мапирајуће популације. Регион се код популације (Ha26SXHa26R) завршава са маркерима HaP1S и HaP2R. Код популација у којима су као донори *Pl* гена коришћене линије JM8 и Ha338 маркер HaP2R косегрегира са другим маркерима у средини региона. Резултати теста хетерогености између рекомбинантних фракција за сваки пар маркера између три популације, омогућили су конструисање уједињене мапе. Утврђено је 28 парова фракција рекомбинације у три мапирајуће популације. Ни за једну фракцију рекомбинације није утврђена значајна хетерогеност заснована на различитом генетичком пореклу ($p > 0.05$). Такође вредности за вероватноћу редоследа маркера у свакој мапирајућој популацији (L_{\max}) нису биле значајно веће од вредности добијених за све податке заједно (L_{order}) као што је приказано у Табели 9.

Табела 9. Тест хетерогености редоследа маркера на линкејд групама код три популације коришћене за мапирање

Популација	L_{\max}	L_{order}	χ^2_{order}	p
Ha26SxHa26R	-56,87	-56,87	0,00	1,00
Ha26SxJM8	-47,67	-47,68	0,05	0,83
Ha26SxHa338	-47,42	-47,91	2,26	0,13
Укупно(total)	-151,96			
Удружено(pooled)	154,66			
χ^2_{map}	12,43			
p	0,002			
p_{corr}	0,014			

L_{\max} -логаритам вредности за вероватноћу редоследа маркера у свакој популацији коришћеној за мапирање (Ha26, JM8, Ha338)

L_{order} - логаритам вредности за вероватноћу редоследа маркера из обједињених података

χ^2_{order} -статистички тест хомогености за редослед маркера $(2\ln 10)[L_{\max} - L_{\text{order}}]$ који прати χ^2 дистрибуцију са једним степеном слободe

χ^2_{map} -тест хетерогености за линкејд групе $(2\ln 10)[L_{\text{total}} - L_{\text{pooled}}]$ који прати χ^2 дистрибуцију са $n-1$ степена слободe, при чему је; n -број анализираних популација, p -номинални ниво значајности, p_{corr} -ниво значајности коригован према Bonferroni корекционом фактору, $p_{\text{corr}}=1-(1-p)^n$ где је n број маркера (хаплотипова) тестираних истовремено ($n=7$)

Линкејд групе конструисане из различитих мапирајућих популација су биле хомогене ($p_{\text{CORR}} = 0.014$) што указује да су збирне рекомбинантне фракције прецизне за утврђивање удаљености циљних гена. Пошто разлике између процената рекомбинација у анализираним популацијама нису значајне, може се закључити да су резултати мапирања конзистентни без обзира на родитељске линије које су коришћене као извор *Pl* гена за отпорност.

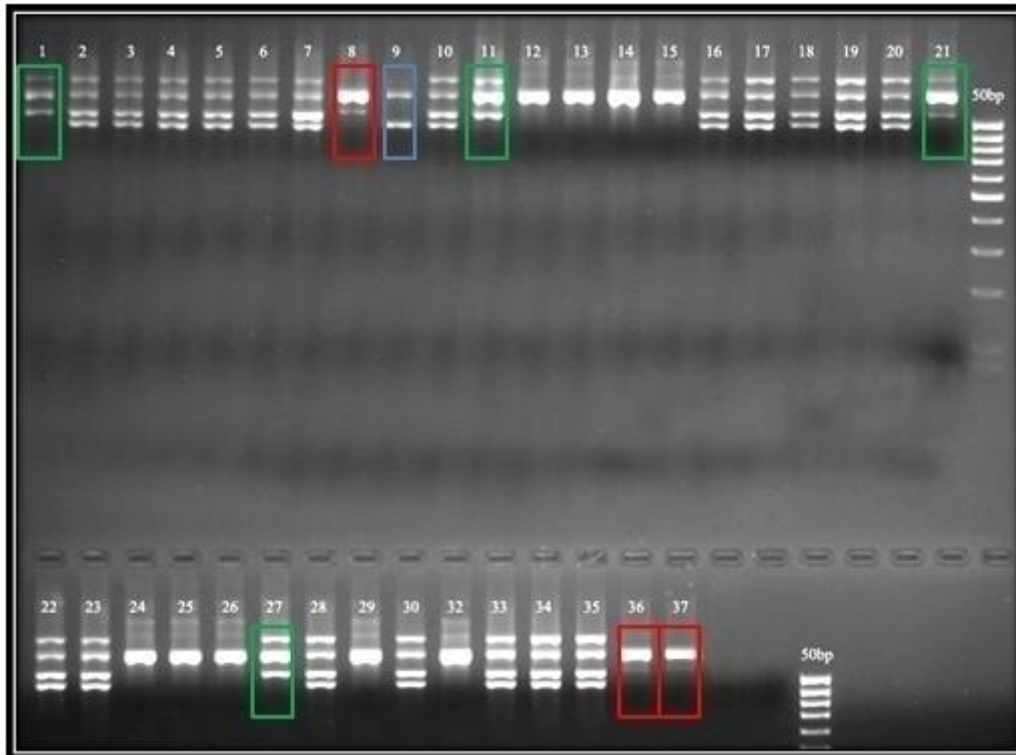
4.4. Промене у *Pl6* геномском региону у рекомбинантним инбред линијама сунцокрета

Познато је да су NBS-LRR гени заступљени у многим биљним врстама и одликује их висока стопа мутација. Због тога су промене у *Pl6* геномском региону очекиване у току процеса селекције сунцокрета према проузроковачу пламењаче. Да би проценили валидност маркера за њихову примену у маркер асистираној селекцији за стварање биљака отпорних према проузроковачу пламењаче, испитана је и популација сунцокрета коју чини 37 рекомбинантних инбред линија сунцокрета (RILs).

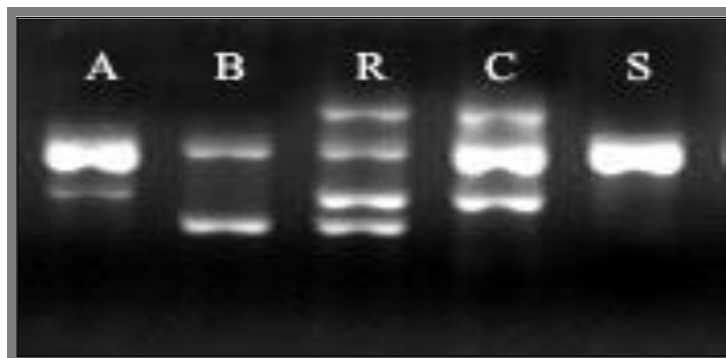
Сегрегација неколико *Pl6* маркера (HaP1, HaP2, HaP3 и CAPS), односно хаплотипова који су спрегнути или неспрегнути са геном који обезбеђује отпорност на патотип пламењаче 730, у 37 RILs (које се налазе у F₁₀ генерацији самооплодне после почетних укрштања JM8xHa19) су приказани у Табели 10. На слици 12 приказани су резултати амплификације са прајмерима за HaP3. Рекомбинантне инбред линије код којих је примећена појава нових хаплотипова, који се разликују од хаплотипова отпорне и осетљиве родитељске линије су означене правоугаонцима. Нови хаплотипови (А, В и С) су издвојени (Слика 13). Слично је примећено и са HaP2 прајмерима. У Табели 10 се види да су ове промене фиксирани у осам од 37 RILs (1, 8, 9, 11, 21, 27, 36 и 37). У неким случајевима појава нових хаплотипова је примећена и са прајмером HaP1 и CAPS маркерима (RILs: 8, 9, 36, 37). У три RILs (10, 17, 18) нови хаплотипови су откривени само са прајмером HaP1 (Таб. 10).

Табела 10. Сегрегација маркера (амплификованих са HAP1, HAP2 и HAP3 прајмерима), односно хаплотипова који су у спрегнутој или неспрегнутој фази са геном који обезбеђује отпорност на патотип 730 пламењаче и кодоминантни *HhaI* маркер у популацији састављеној од 37 RILs

RILs	HAP1	HAP2	HAP3	<i>HhaI</i>
1.	S	C	C	H
2.	R	R	R	R
3.	R	R	R	R
4.	R	R	R	R
5.	R	R	R	R
6.	R	R	R	R
7.	R	R	R	R
8.	A	A	A	A
9.	B	B	B	B
10.	B	R	R	R
11.	S	C	C	H
12.	S	S	S	S
13.	S	S	S	S
14.	S	S	S	S
15.	S	S	S	S
16.	R	R	R	R
17.	B	R	R	R
18.	B	R	R	R
19.	R	R	R	R
20.	R	R	R	R
21.	S	C	C	H
22.	R	R	R	R
23.	R	R	R	R
24.	S	S	S	S
25.	S	S	S	S
26.	S	S	S	S
27.	S	C	C	H
28.	R	R	R	R
29.	S	S	S	S
30.	R	R	R	R
32.	S	S	S	S
33.	R	R	R	R
34.	R	R	R	R
35.	R	R	R	R
36.	A	A	A	A
37.	A	A	A	A



Слика 12. НаРЗ у популацији састављеној од 37 рекомбинантних инбред линија (RILs)



Слика 13. НаРЗ у отпорној (R) и осетљивој (S) родитељској линији, и нови хаплотипови (A, B и C) који се појављују у рекомбинантним инбред линијама у F₁₀ генерацији самооплодне после почетног укрштања (JM8 x Ha19).

Да би се проверила повезаност између појаве нових хаплотипова и отпорности на пламењачу, испитана је отпорност 20-77 појединачних биљака из шест RILs (Таб. 11). Види се да хаплотип А (са једним додатним фрагментом у односу на осетљивог родитеља) одговара осетљивом фенотипу. Са друге стране хаплотипови С и В (са једним или два фрагмента који недостају у поређењу са отпорним родитељем) одговарају отпорном фенотипу. У RIL 21 неочекивано је дошло до сегрегације тј. до појаве осетљивих и отпорних биљака у F₁₀ генерацији.

Табела 11. Однос између хаплотипова добијених са прајмером НаРЗ и фенотипова (биљке отпорне или осетљиве на патотип 730 пламењаче)

Линија	Хаплотип након амплификације са прајмером НАРЗ	Број биљака	Фенотип (биљке отпорне или осетљиве на патотип 730 пламењаче)
RIL 36	A	50	осетљиве
RIL 37	A	54	осетљиве
RIL 9	B	77	отпорне
RIL 1	C	65	отпорне
RIL 11	C	54	отпорне
RIL 21	C	20	10 осетљиве
			10 отпорне

Хомозиготност *Pl6* гена код биљака из RIL 9 и RIL 21 је испитана коришћењем кододоминантних маркера *HhaI* и *RsaI* (Таб. 12).

Табела 12. Однос између хаплотипова добијених са прајмером НАР3, кодоминантних маркера (*HhaI* и *RsaI*) и фенотипа (биљке отпорне или осетљиве на патотип 730 пламењаче)

R-отпорност; S-осетљивост; H-хетерозиготност; А, В и С - појава нових хаплотипова

	фенотип / хаплотип након амплификације са прајмером НАР3	хаплотип В (RIL 9)	хаплотип С (RIL 21)
патотип 730	отпорне	77	10
	осетљиве	/	10
НАР 3	R	/	/
	S	/	10
	A	/	/
	B	77	/
	C	/	10
<i>HhaI</i>	R	/	/
	S	/	10
	H	/	10
	A	/	/
	B	77	/
<i>RsaI</i>	R	/	/
	S	/	10
	H	/	10
	A	/	/
	B	77	/

Резултати указују на то да су отпорне биљке хетерозиготне. Ово објашњава појаву осетљивих биљака у каснијим генерацијама самооплодње. У исто време присуство хетерозиготног локуса у F₁₀ генерацији самооплодње се не очекује.

4.5. Оцена отпорности линија сунцокрета након секундарне инфекције суспензијом спора *Plasmopara halstedii*

Две линије сунцокрета, осетљива и отпорна према патотипу пламењаче 730 су коришћене у овом делу испитивања. Осетљива линија је На26S, док је отпорној линија На26R, присутан ген (*Pl6*) за отпорност према патотипу 730. Овај ген за отпорност према пламењачи је унесен из почетног укрштања На26 x На336. Инокулација обе испитиване линије сунцокрета са суспензијом спора *Plasmopara halstedii* (патотип 730), извршена је на биљкама у фази првог пара листова. Дванаест дана након секундарне инфекције суспензијом спора *Plasmopara halstedii*, на листовима осетљиве линије (На26S) појавили су се типични симптоми болести (Tourvieille de Labrousche и сар., 2000а), односно хлороза листова са или без спорулације (Слика 14А), док код отпорне линије (На26R) ови симптоми нису били присутни (Слика 14В).



Слика 14. Листови осетљиве На26S (А) и отпорне На26R (В) линије сунцокрета 12 дана након секундарне инфекције суспензијом спора *Plasmopara halstedii* (патотип 730)

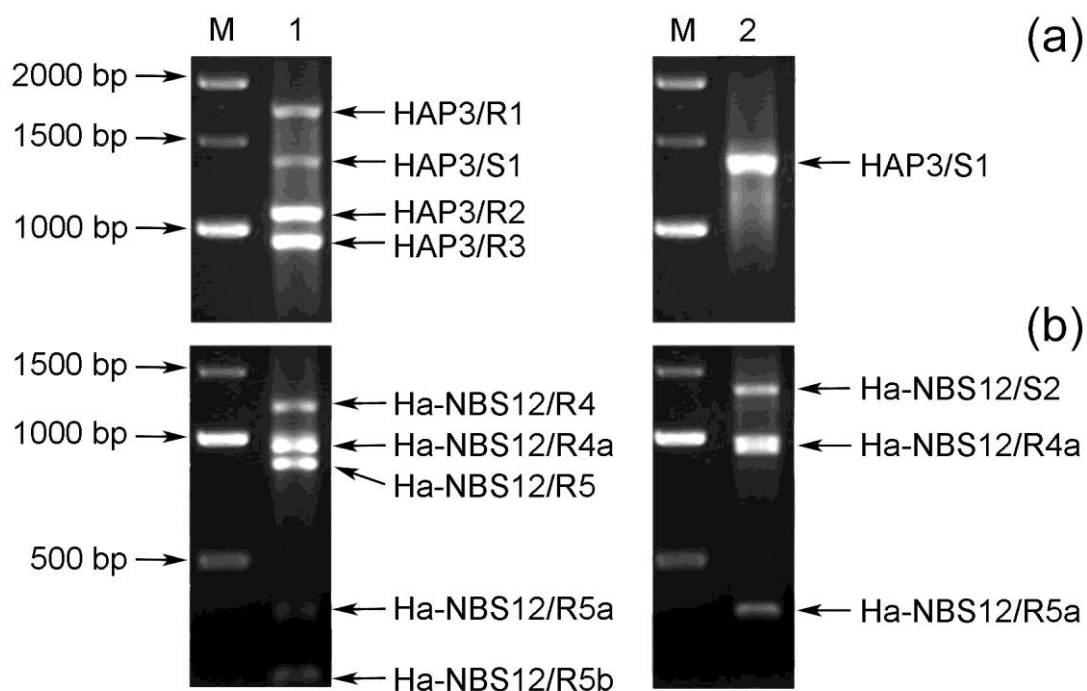
4.6. Експресија гена за отпорност *Pl6* и гена важних у одбрамбеном одговору биљака на стрес у листовима две линије сунцокрета након секундарне инфекције

Циљ овог дела истраживања је био да се испита експресија *Pl6* гена, као и гена (Насаох, Наохох, НаSODc, НаSODp, НаSOD1, Насhi, НаPR5, НаEDS1, НаEDR1) који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *Plasmopara halstedii*. У листовима младих биљака сунцокрета, праћена је експресија ових гена, у периоду 2-96 сати након инфекције спорама *P. halstedii*, односно након прскања водом у случају контролних биљака.

4.6.1. Испитивање присуства RGA за отпорност према патотипу пламењаче 730 у На26S и На26R линији сунцокрета

Пре него што смо започели анализу експресије гена, проверено је присуство RGA за отпорност према патотипу пламењаче 730 у анализираним линијама. Лисни материјал са 10 појединачних биљака осетљиве линије сунцокрета (На26S) спојен је у 1 групни узорак. Од отпорне линије сунцокрета (На26R) такође је прикупљен лисни материјал са 10 појединачних биљака и спојен у један групни узорак. Присуство RGA за отпорност према патотипу пламењаче 730 анализирано је на геномској ДНК која је екстрахована из групног узорка осетљиве (На26S) као и из групног узорка линије сунцокрета (На26R) која је отпорна према патотипу пламењаче 730. Хаплотип добијен прајмером НаP3 на геномској ДНК испитиваних линија, састоји се од четири фрагмента у отпорној линији (Слика 16а, трака 1). Три фрагмента су била специфична само за отпорну линију : НаP3/R1 (1720 bp), НаP3/R2 (1060 bp) и НаP3/R3 (940 bp). Један фрагмент, НаP3/S1 (1330 bp) је био заједнички за отпорну и осетљиву линију (Слика 16а трака 1 и 2). PCR производи добијени са прајмером НаP3, су инкубирани 2h на 37°C са рестрикционим ензимом *HhaI*. Након дигестије са овим ензимом запажена су три фрагмента која су била присутна само у отпорној

линији: Ha-NBS12/R4 (1218 bp), Ha-NBS12/R5 (890 bp) и Ha-NBS12/R5b (254 bp) (Слика 16b, трака 1). Ови фрагменти нису били присутни у осетљивој линији. Код осетљиве линије био је присутан фрагмент Ha-NBS12/S2 (1330 bp) који не постоји код отпорне линије (Слика 16b, трака 2). Два фрагмента обележени као Ha-NBS12/R4a (961bp) и Ha-NBS12/R5a (371bp) били су заједнички односно присутни и код отпорне и код осетљиве линије сунцокрета.



Слика 16. а) Хаплотипови добијени прајмером HaP3 на геномској ДНК изолованој из отпорне Ha26R (трака1) и осетљиве линије сунцокрета Ha26S (трака 2). б) Хаплотипови добијени након дигестије производа PCR реакције рестрикционим ензимом *HhaI*. М означава стандард (1kb ДНК лествица) (Pharmacia Biosciences).

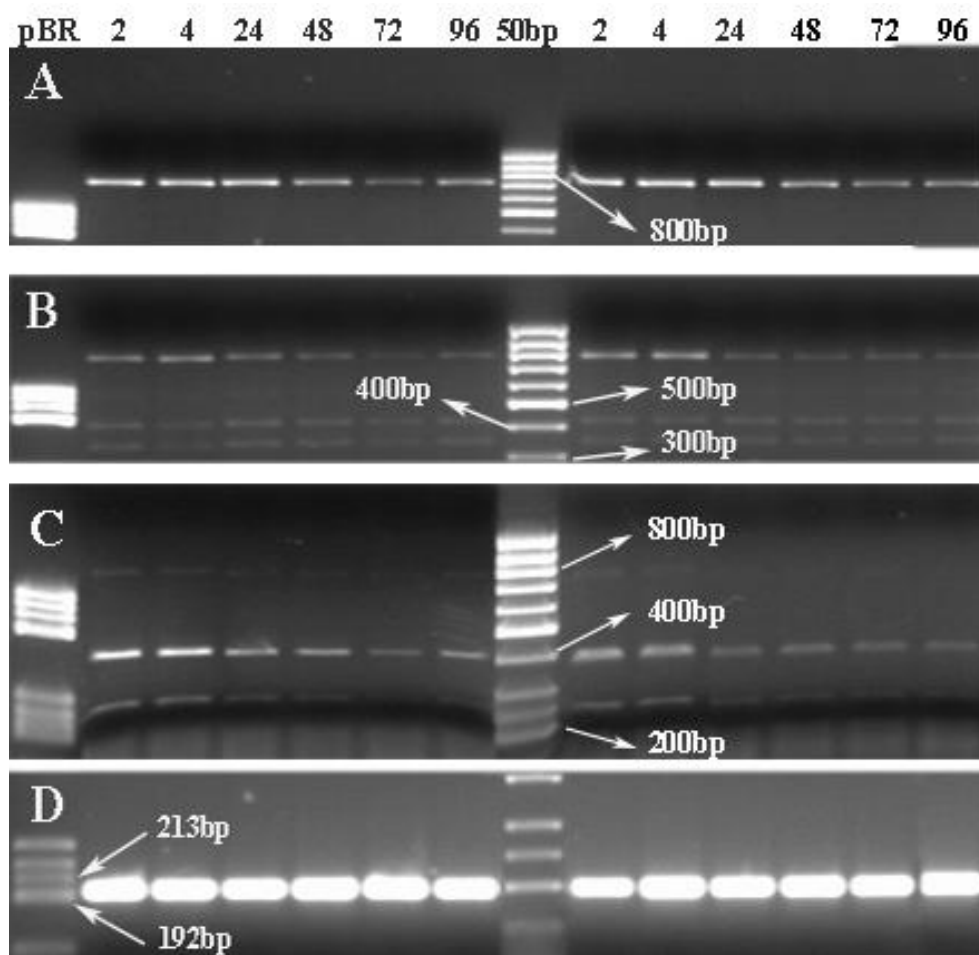
4.6.1.1. Експресија гена за отпорност *Pl6*

Експресија гена за отпорност *Pl6* је испитивана након секундарне инфекције у временским интервалима приказаним на слици 17А. У истим временским интервалима узети су групни узорци контролних и инокулисаних биљака обе линије сунцокрета из којих је екстрахована РНК. Екстрахована РНК је уз помоћ реверзне транскриптазе преведена у cDNK која је служила за анализу експресије гена.

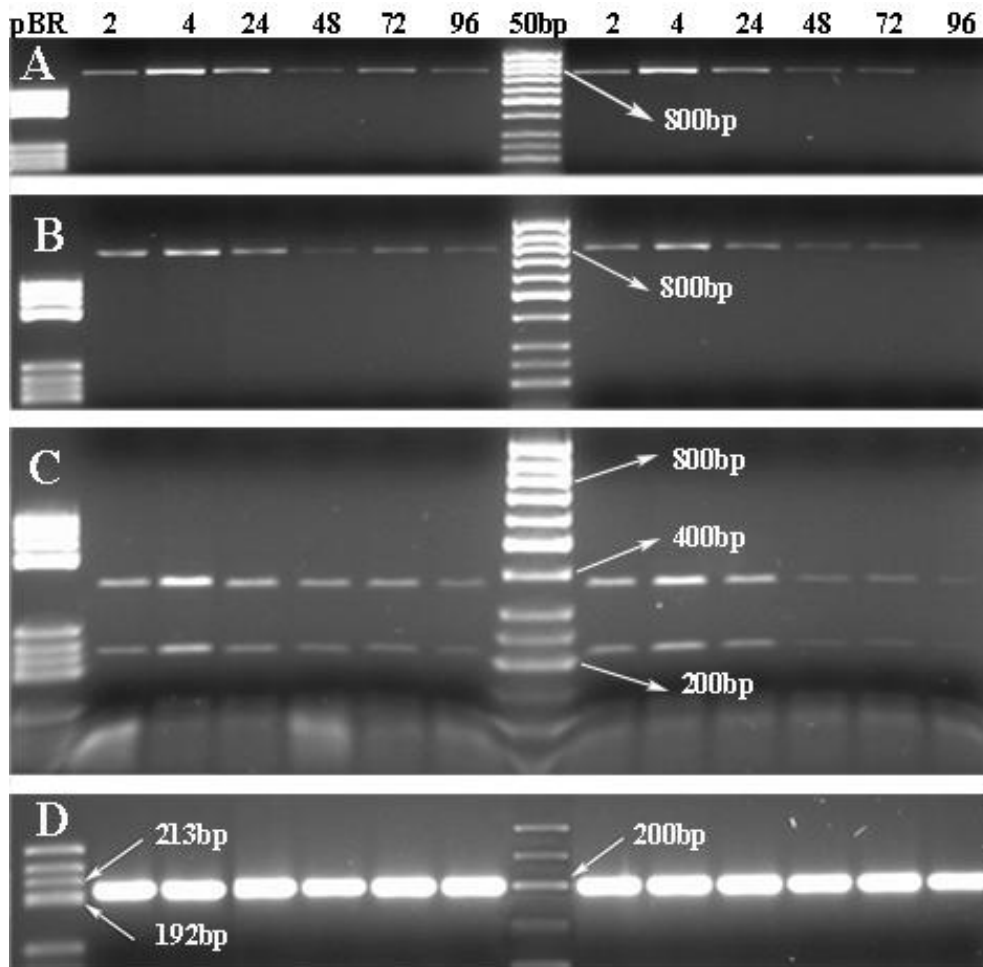
Након амплификације cDNK испитиваних изогених линија са прајмером НаРЗ, уочава се само један фрагмент (≈ 800 bp) код инфицираних и код контролних биљака отпорне и осетљиве линије и то у свим анализираним временским интервалима након инфекције. Генерално посматрано, експресија је већа у отпорној линији сунцокрета. Фрагмент величине ≈ 800 bp који је конститутивно експримиран у отпорној линији (Сл. 17А), има јаку експресију до 24h после третмана, након чега следи смањење експресије. Након дигестије PCR фрагмента од ≈ 800 bp рестрикционим ензимом *HhaI*, и даље се види фрагмент од 800 bp (Сл. 17В) и још два краћа фрагмента (≈ 450 bp и 350 bp). Резултати указују на постојање два фрагмента од ≈ 800 bp, од којих један има рестрикционо место за *HhaI* а други нема. Слични резултати добијени су и са рестрикционим ензимом *RsaI*. Један комигрирајући фрагмент нема *RsaI* рестрикционо место тако да је исте величине као и пре рестрикције (≈ 800 bp), међутим други комигрирајући фрагмент је након дигестије исечен на 3 мања фрагмента величина ≈ 400 bp, 250 bp и 150 bp (Сл. 17С).

У осетљивој линији експресија гена *Pl6* (≈ 800 bp) је најјача 4h после третмана (прскање водом или суспензијом спора *P. halstedii*), након чега долази до смањења експресије (Сл. 18А). Смањење експресије посматрано у функцији времена након инфекције је израженије код осетљиве у односу на отпорну линију сунцокрета. Експримирани фрагмент (≈ 800 bp) код осетљиве линије сунцокрета (Сл. 18В) нема рестрикционо место за ензим *HhaI*. Међутим, рестрикциони ензим *RsaI* има рестрикциона места и сече овај фрагмент на четири краћа фрагмента приближних величина око 380, 225, 125 и 90 bp (Сл. 18С).

Резултати рестрикционе анализе указују на експресију два фрагмента од по ≈ 800 бр у отпорној линији, док у осетљивој линији долази до експресије само једног фрагмента који се у односу на отпорну линију разликује по броју рестрикционих места за *RsaI* и *HhaI* ензиме.



Слика 17 А, В, С и D. Експресија гена *Pl6* 2-96 сати у контролним условима (лева страна гела А) и након инфекције спорама *P. halstedii* (десна страна гела А) у листовима отпорне линије сунцокрета. Дигестија PCR фрагмената (приказаних на слици А) рестрикционим ензимом *HhaI* приказана је на слици В, док је дигестија рестрикционим ензимом *RsaI* приказана на слици С. На слици D је приказана експресија "housekeeping" гена HaEF1. ДНК стандарди су: pBR322 DNA/BsuRI (*HaeIII*) и Gene Ruler™ 50bp (Fermentas GmbH, Germany).

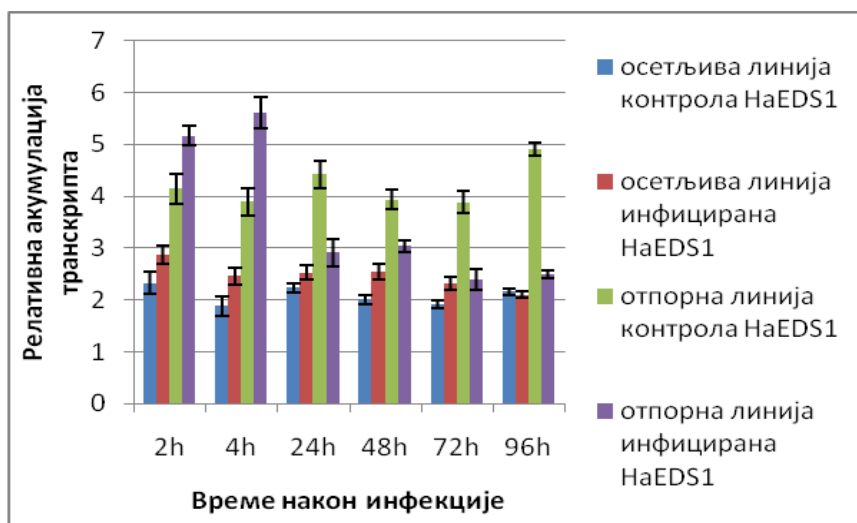


Слика 18 А, В, С и D. Експресија гена *Pl6* 2-96 сати у контролним условима (лева страна гела А) и након инфекције спорама *P. halstedii* (десна страна гела А) у листовима осетљиве линије. Дигестија PCR фрагмената (приказаних на слици А) рестрикционим ензимом *HhaI* приказана је на слици В, док је дигестија рестрикционим ензимом *RsaI* приказана на слици С. На слици D је приказана експресија "housekeeping" гена *HaEF1*. ДНК стандарди су: pBR 322 DNA/BsuRI (*HaeIII*) и Gene Ruler™ 50bp (Fermentas GmbH, Germany).

4.6.2. Експресија гена важних у одбрамбеном одговору биљака на стрес (секундарна инфекција суспензијом спора *Plasmopara halstedii*)

Анализом експресије гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *P. halstedii*, обухваћено је неколико категорија гена: гени за сигнализацију (HaEDS1 и HaEDR1), гени укључени у синтезу водоник пероксида (Насаох и Наохох), гени укључени у антиоксидативни одговор (HaSODc и HaSODp) и гени везани за одговор на патогене (Hachi, PAL, HaPR5). Анализе експресија наведених гена у листовима отпорне и осетљиве линије сунцокрета 2-96h након инфекције суспензијом спора *Plasmopara halstedii* (патотип 730), или прскања стерилном дестилованом водом (контрола) приказане су на сликама 18-24.

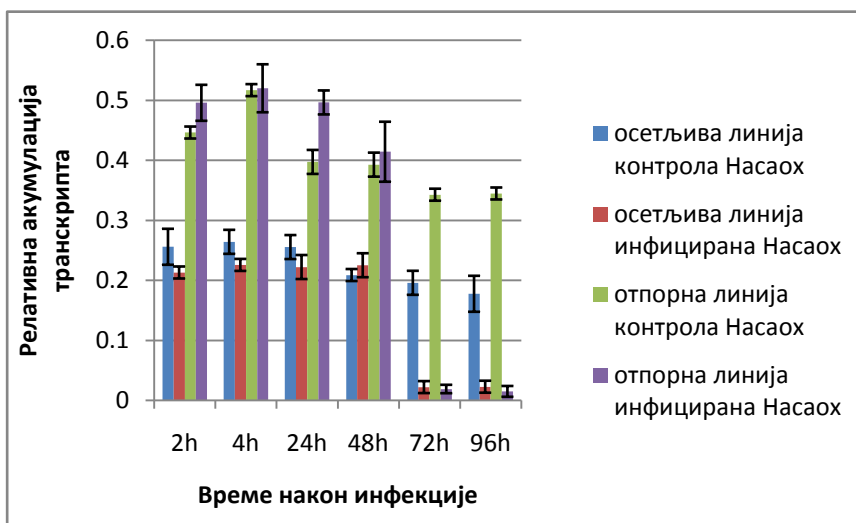
Експресија гена који је укључен у сигнализацију (HaEDS1) је већа код отпорне линије сунцокрета у интервалима 2 до 4h након инфекције спорама *P. halstedii* (Сл. 18). Након овог временског интервала, у инфицираном третману отпорне линије долази до драстичног смањења у експресији овог гена. У временском интервалу 24-96h након инфекције експресија HaEDS1 већа је у контролном него у инфицираном третману отпорне линије, што нам указује на то да у каснијим фазама овај ген није индукован инфекцијом са *P. halstedii*.



Слика 18. Експресија гена HaEDS1 у осетљивој и отпорној линији сунцокрета 2-96 сати након инфекције патотипом 730 пламењаче

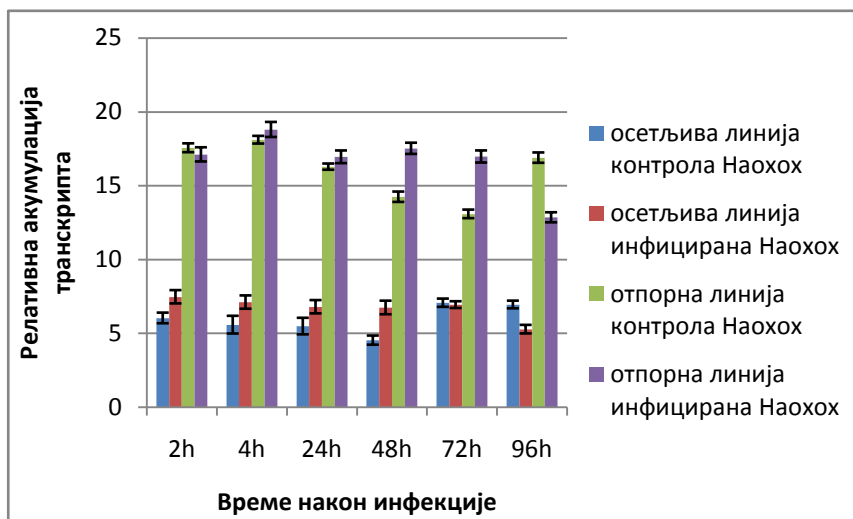
Експресија гена *HaEDR1* који је укључен у сигнализацију, није индукована након инфекције биљака проузроковачем пламењаче. Ни у једном анализираном временском интервалу, нити у једној од испитиваних линија није детектовано повећање експресије овог гена након инфекције патогеном (резултати нису приказани).

Висока акумулација транскрипта карбохидрат оксидазе (*Насаох*) код обе анализиране линије сунцокрета, примећена је до 24 h како у контроли тако и у третману након инфекције суспензијом спора *Plasmopara halstedii*. Експресија је приближно два пута већа код отпорне линије. Посматрано у функцији времена након инфекције, после 48 сати долази до драстичнијег смањења експресије код обе линије сунцокрета. Смањење експресије је нарочито изражено у временским тачкама 72 и 96 сати након инфекције суспензијом спора *P. halstedii* (Сл. 19).



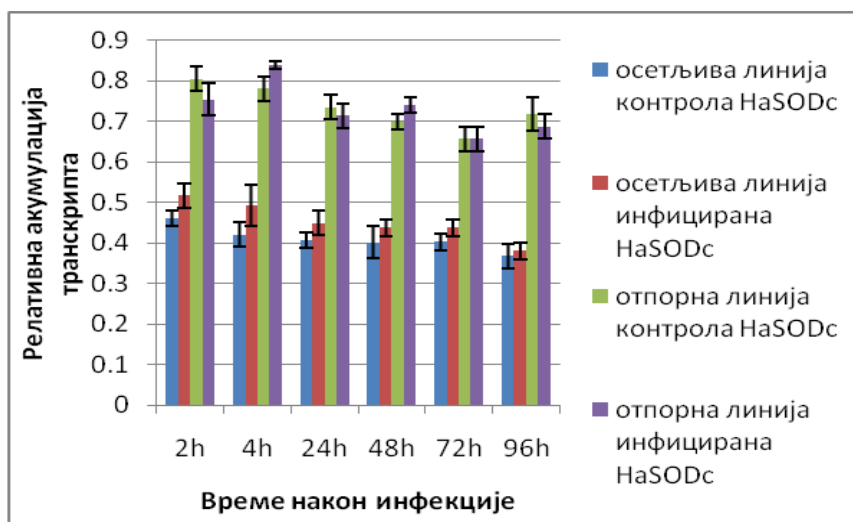
Слика 19. Експресија гена *Насаох* у осетљивој и отпорној линији сунцокрета 2-96 сати након инфекције патотипом 730 пламењаче

Експресија оксалат оксидазе (*Наохох*) је приближно 3 пута већа код отпорне линије у свим временским интервалима. Инфекција не доводи до значајнијих промена експресије *Наохох* код осетљиве линије сунцокрета. Међутим, код отпорне линије у временском интервалу од 48-96h након инфекције, долази до значајнијих варирања у експресији оксалат оксидазе. (Сл. 20).



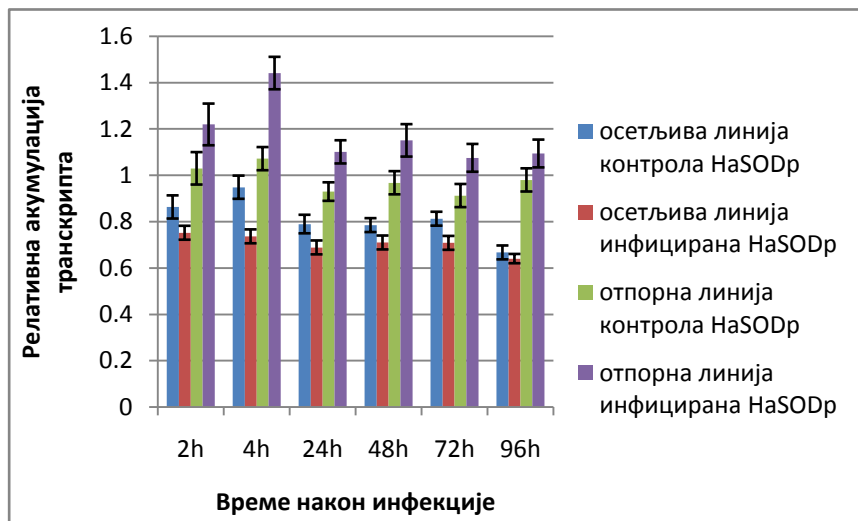
Слика 20. Експресија гена Наохох у осетљивој и отпорној линији сунцокрета 2-96 сати након инфекције патотипом 730 пламењаче

Акумулација транскрипта антиоксидативног ензима цитоплазматске супероксид дисмутазе (HaSODc) је висока код отпорне линије сунцокрета у свим временским интервалима у оба третмана. У случају осетљиве линије експресија је приближно два пута мања у односу на отпорну линију, са тенденцијом да се смањује са временом након инфекције (Сл. 21).



Слика 21. Експресија т гена HaSODc у осетљивој и отпорној линији сунцокрета 2-96 сати након инфекције патотипом 730 пламењаче

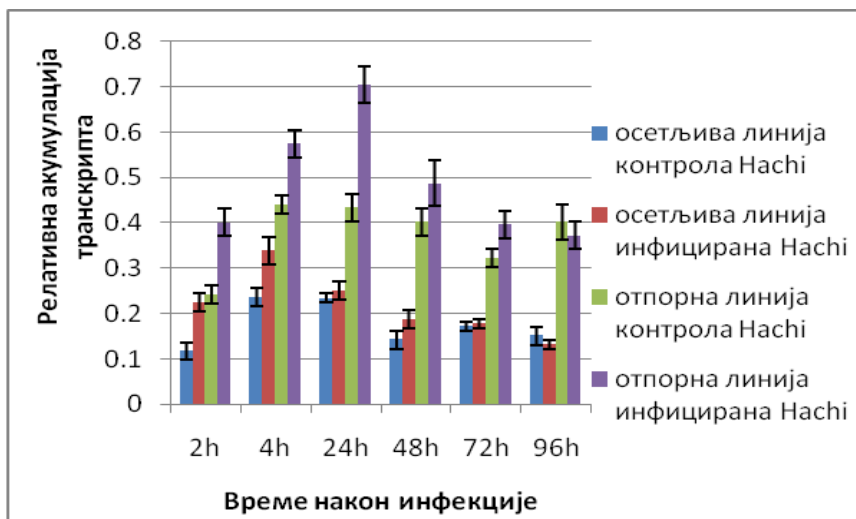
Слични трендови примећени су и у случају акумулације транскрипта ензима пластидне супероксид дисмутазе (HaSODp) који су приказани на Слици 22.



Слика 22. Експресија гена HaSODp у осетљивој и отпорној линији сунцокрета 2-96 сати након инфекције патотипом 730 пламењаче

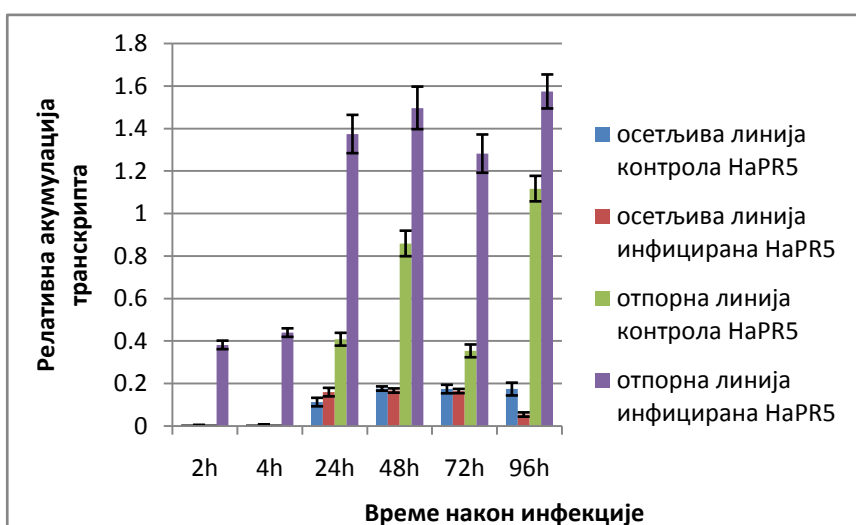
Акумулација транскрипта антиоксидативног ензима супероксид дисмутазе (HaSOD1) показују да овај ензим има високу експресију која је приближно 4 пута већа код отпорне у односу на осетљиву линију сунцокрета. Инфекција не доводи до значајнијих промена експресије ни код једне линије и нема тенденцију смањења са временом након инфекције (резултати нису приказани). Фенилаланин амонијум лиаза (Pal) је био високо експримиран у обе линије, у свим временским интервалима након инфекције код оба третмана (резултати нису приказани).

Експресија хитиназе која припада групи PR гена односно гена који се активирају у процесу патогенезе већа је приближно два пута у отпорној линији. Јака експресија са тенденцијом пораста изражена је у временским тачкама 2h, 4h и 24h након инфекције код отпорне линије сунцокрета, након чега долази до смањења експресије са временом након инфекције. У случају осетљиве линије максимум у експресији хитиназе забележен је у тачки 4h након инфекције (Сл. 23).



Слика 23. Експресија гена Hsi1 у осетљивој и отпорној линији сунцокрета 2-96 сати након инфекције патотипом 730 пламењаче

Занимљиви резултати су добијени у случају акумулације транскрипта NaPR5 гена (Сл. 24). У тачкама 2h и 4h након инфекције транскрипт NaPR5 гена акумулира се само код отпорне инфициране линије сунцокрета. У осталим узорцима експресија почиње 24h након инфекције. Код отпорне линије, експресија овог гена достиже свој максимум 96h након инфекције и значајно је већа него у контролном третману, и то у свим временским интервалима. У тачки 96h након инфекције експресија NaPR5 гена је чак више од 15 пута већа код отпорне инфициране линије него код осетљиве инфициране линије.



Слика 24. Експресија гена NaPR5 у осетљивој и отпорној линији сунцокрета 2-96 сати након инфекције патотипом 730 пламењаче

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Распрострањеност патотипова пламењаче

Пламењача сунцокрета је једна од најдеструктивнијих болести гајеног сунцокрета (*Helianthus annuus* L.). Проузроковач ове болести је *Plasmopara halstedii* са више од 35 патотипова који су до сада описани широм света (Gulya 2007; Gascuel и сар., 2015). Северна Америка, центар порекла и сунцокрета и *Plasmopara halstedii* има највећи број пријављених сојева (патотипова) пламењаче, 28 до сада. У Европи је до данас идентификовано 24 патотипа (Sedlarova и сар., 2016; Virányi и сар. 2015). Разноврсност патотипова пламењаче је далеко мања у осталим областима узгајања сунцокрета, са десет патотипова пријављених у Африци, пет у Аргентини, и само три патотипа пламењаче у Индији и Кини. Најзаступљенија четири патотипа пламењаче широм света су 700, 710, 730, и 770. У Србији је преодминантан патотип 730 пламењаче. Примена фунгицида и гајење генетички отпорних биљака према пламењачи су две главне методе које се користе за контролу ове болести. Пошто примена фунгицида знатно повећава трошкове производње и загађује животну средину, стварање генетичке основе за отпорност сунцокрета према проузроковачу пламењаче, један је од главних циљева у савременим оплемењивачким програмима (Vear и сар., 1997; Roeckel-Drevet и сар 2003; Gulya и сар., 2007; Ћурчић и Панковић, 2011).

5.2. Начин наслеђивања отпорности према проузроковачу пламењаче

Између сунцокрета и пламењаче постоји типичан однос ген за ген, тј. за сваки ген који условљава отпорност домаћина постоји специфичан ген патогености код паразита. Отпорност сунцокрета на већину патотипова пламењаче је контролисана појединачним генима (Vear и сар., 1997; Molinero-Ruiz и сар., 2003; Qi и сар., 2016). Више аутора је показало да постоји моногено наслеђивање отпорности према једној или више раса пламењаче. Иако је показано да је отпорност сунцокрета према патотипу 730 пламењаче контролисана моногено (Tan и сар., 1992), у литератури се могу наћи резултати који показују да је отпорност према овом патотипу пламењаче контролисана са два гена (Miller и Gulya, 1991; Molinero-Ruiz и сар., 2002; Rahim и сар., 2002). У зависности од материјала који је коришћен при укрштању, разликују се резултати о типу наслеђивања отпорности према расама 100 и 300 (Rahim и сар., 2002). Више аутора (Tan и сар., 1992; Molinero-Ruiz и сар., 2003;) је показало да је отпорност према патотипу пламењаче 730 контролисана појединачним генима.

Начин наслеђивања отпорности према патотипу 730 пламењаче у популацијама које су коришћене у нашем експерименту процењен је техником инокулације целог семена. Резултати χ^2 теста су потврдили да однос сегрегације отпорних и осетљивих F_3 фамилијама одговара односу 3 : 1 у свим испитиваним популацијама. На основу добијених резултата потврђено је да је отпорност на патотип пламењаче 730 контролисана једним геном и доминантно-рецесивним типом наслеђивања. Ови резултати су у сагласности са опсежним испитивањима спроведеним у Шпанији (Molinero-Ruiz и сар., 2003), и у Србији (Pankovic и сар., 2006) у којима је потврђено да је отпорност на патотипове пламењаче 310 и 703, као и на патотип 730 под контролом појединачних гена и доминантно рецесивним наслеђивањем. Међутим, моногено наслеђивање отпорности је познато као обично најмање трајан извор отпорности.

5.3. Аналоги гена за отпорност на пламењачу-поређење добијених резултата са резултатима аутора који су радили на истој проблематици

Маркери који су анализирани у овом раду су лоцирани у гену од интереса (*Pl6* ген), или у његовој непосредној близини што је уједно и најповољнија ситуација у маркер асистираној селекцији. У том случају, праћењем наслеђивања маркера уједно смо пратили и наслеђивање отпорности према пламењачи.

Резултати приказани на Слици 16а показују да се хаплотипови који су добијени са прајмером НаРЗ на геномској ДНК изолованој из отпорне На26R и осетљиве линије сунцокрета На26S, разликују од хаплотипова које су са истим прајмером али са другим линијама сунцокрета добили аутори (Bouzidi и сар., 2002). Фрагменти који су амплификовани на биљном материјалу који је коришћен у овом раду су били мањи за око 40-100 bp у поређењу са величином фрагмената које су добили (Bouzidi и сар., 2002). Још значајније је то што је уочен један фрагмент означен као НаРЗ/S1, који је био заједнички односно присутан и у осетљивој и у линији сунцокрета отпорној на патотип пламењаче 730. Међутим, Bouzidi и сар., (2002) су само у линији сунцокрета Н52 која је осетљива на све патотипове пламењаче уочили аналогни фрагмент означен као AF316416.

Након дигестије PCR производа добијеног са прајмером НаРЗ са рестрикционим ензимом *HhaI*, у линији сунцокрета На26S, отпорној према патотипу 100 али осетљивој на патотип 730 пламењаче, запажен је један несечен фрагмент означен као На-NBS12/S2 (1330 bp), као и два додатна фрагмента означена као На-NBS12/S2a (996 bp), На-NBS12/S2b (340 bp) (Слика 16b, трака 2). На-NBS12/S2 је аналоган фрагменту AF316416 добијеном у осетљивој линији сунцокрета На52 (Bouzidi и сар., 2002), међутим CAPS маркери означени као На-NBS12/S2a и На-NBS12/S2b указују на присуство гена за отпорност према патотипу 100 пламењаче.

Према секвенцама фрагмената из отпорне линије На335 (Bouzidi и сар., 2002), очекује се да ће се након дигестије са рестрикционим ензимом *HhaI* добити четири фрагмента. Међутим, у линији На26R након дигестије са рестрикционим ензимом *HhaI* примећено је пет фрагмената другачијих величина (Сл. 16b).

5.4. *Pl6* геномски регион сунцокрета

Генетичка основа отпорности сунцокрета (*Helianthus annuus* L) према *Plasmopara halstedii*, проузроковачу пламењаче, контролисана је генима који су означени као *Pl* гени. Са еволуцијом гљиве *P. halstedii*, појављују се нове физиолошке расе (патотипови) пламењаче које успевају да превазиђу постојеће (*Pl*) гене за отпорност према пламењачи. Гени *Pl1* и *Pl2* су први откривени (Brahm и сар., 2000) и обезбеђују отпорност на патотип 100, односно на патотип 100 и 300 пламењаче (Gedil и сар., 2001). Отпорност према патотиповима 100, 300, 700 и 730 је уведена из три дивље врсте сунцокрета; *H. annuus* (извор отпорности за *Pl6* ген), *H. praecox* ssp. *runyonni* Heiser (извор отпорности за *Pl7* ген) и *H. argophyllus* (извор отпорности за *Pl8* ген) (Miller и Gulya, 1988, 1991). До данас је описано више од 20 гена који обезбеђују отпорност према *P. halstedii*, при чему *Pl6* ген, који је унесен из дивљих врста *Helianthus-a*, обезбеђује отпорност на 4 најраспрострањенија соја (Miler и Gulya, 1991).

Vear и сар., (1997), су први указали на постојање комплексног *Pl6* геномског региона на LG8, који је према њиховом мишљењу подељен у два региона на коме су лоцирана најмање 2 тесно везана гена (ген *Pl6* и *Pl2*), који пружају отпорност на већину патотипова пламењаче. Brahm и сар., (2000a), су такође закључили да је *Pl2* ген део *Pl6* региона који укључује неколико везаних гена. Bouzidi и сар., (2002) су потврдили постојање више *Pl* гена у *Pl6* геномском региону.

Gedil и сар., (2001) су одредили положај гена *Pl1* и гена кандидата за отпорност (HaRGC1) на SSR мапи (LG8). Slabaugh и сар., (2003), су мапирали 24 HaRGC1 локуса на сегменту од 2-4сМ на LG8, и идентификовали IFLP маркере (енг. Intron Fragment Length Polymorphysm) и SSR маркере који могу да се користе за идентификацију познатих гена отпорности према пламењачи.

За гене *Pl1*, *Pl2*, *Pl6*, *Pl7* као и за недавно описани ген *Pl15*, показано је да су груписани на LG8 SSR мапе (Gedil и сар., 2001; Slabaugh и сар., 2003; Radwan и сар., 2008; de Romano и сар., 2010). Vear и сар., (2012) сматрају да је кластер гена на LG8 још комплекснији него што се првобитно сматрало. Према мишљењу ових аутора у овом генском кластеру постоје два *Pl2* гена који су означени као *Pl2a* и *Pl2b*. Ген *Pl2a* се налази у кластеру са генима *Pl1*, и *Pl 6/7*, док је ген *Pl2b* изван

тог кластера и сегрегира независно од гена *Pl1*, *Pl2a* и *Pl 6/7*. Неколико доминантних маркера (Bouzidi и сар., 2002; Slabaugh и сар., 2003) за отпорност сунцокрета према проузроковачу пламењаче је позиционирано у овом региону. Bouzidi и сар., (2002), су на основу парцијалног RGA производа (Gentzbittel и сар., 1998) клонирали и секвенцрали RGA целе дужине и развили специфичне прајмере који умножавају 13 STS (енг. Sequence Tagged Site) маркера који су везани на Pl6 геномском региону, на LG8 (SSR мапа). Ових тринаест маркера припадају TIR-NBS-LRR класи гена кандидата за отпорност и груписани су на генетичкој дистанци од око 3 cM. У овој тези су коришћена 3 прајмера (HaP1, HaP2 и HaP3) које су развили Bouzidi и сар., (2002). Користећи ове прајмере амплификовано је 15 RGA (Resistance Gene Analogues) у региону Pl6. У отпорним линијама сунцокрета Ha26R, Ha338 и JM8 умножено је 10 RGA (HaP1/R1, HaP1/R2, HaP1/R3, HaP1/R4, HaP2/R1, HaP2/R2, HaP2/R3, HaP3/R1, HaP3/R2, HaP3/R3), који овим линијама обезбеђују отпорност према патотипу пламењаче 730, који је преобладајући патотип пламењаче у Србији. Резултати истраживања приказани у овом раду показују да су на генетичким мапама добијеним на три испитиване мапирајуће популације у региону *Pl6* маркери распоређени на генетичкој дистанци од ~5 до ~12 cM. Упркос разликама које постоје између мапа, распоред локуса и линкејд раздаљине анализираних маркера су добро одржаване између мапа.

На основу добијених резултата може се закључити да кодоминантни CAPS маркери за отпорност сунцокрета према патотипу пламењаче 730 који су добијени у овом раду могу бити коришћени у маркер асистираној селекцији за ову особину, без обзира на родитељске линије које су коришћене као извори гена за отпорност. Међутим, резултати добијени испитујући популацију састављену од 37 RIL указују на то да се у *Pl6* геномском региону јављају промене чак и у касним генерацијама самооплодње у току стварања биљака отпорних на пламењачу. Ипак, употреба једног доминантног и кодоминантних CAPS маркера обезбеђује ефикасну идентификацију биљака отпорних на патотип пламењаче 730.

5.5. Експресија гена кандидата за отпорност према патотипу 730 пламењаче

Проучавање функционалних гена кандидата за отпорност сунцокрета према пламењачи најчешће се до сада изводило поређењем линија које не само да се разликују по присуству гена за отпорност према пламењачи, већ и по целокупној генетској основи. У овом раду за испитивање експресије гена кандидата за отпорност, као и гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес коришћене су две линије сунцокрета од којих је једна отпорна (Ha26R), а друга (Ha26S) осетљива према патотипу пламењаче 730. Отпорност је у линију Ha26R унешена из почетног укрштања Ha26S X Ha336. Две испитиване линије сунцокрета разликују се по присуству *Pl6* гена за отпорност према патотипу пламењаче 730, док је остатак генетичке основе ових линија готово идентичан. Промене у експресији *Pl6* гена као одговор биљака на секундарну инфекцију суспензијом спора *Plasmopara halstedii* (патотип 730), испитиване су у раним фазама (2-96 h) након инфекције, како би се пратио рани одговор овог гена на инфекцију узрочником пламењаче.

Познато је да код сунцокрета постоје два типа отпорности према проузроковачу пламењаче. То су тип I и тип II отпорности (Mouzeyar и сар., 1994). Код типа I отпорности раст патогена је ограничен и инфекција се задржава у базалном региону хипокотила, док у случају отпорности типа II патоген може dospети и до котиледона (Radwan и сар., 2005, 2011). Генерално код отпорних генотипова као одговор на напад патогена долази до хиперсензитивне реакције (HR). Као резултат HR на месту напада патогена долази до програмиране ћелијске смрти у року 12-24 сата након инфекције са патогеном (Levine и сар., 1996). У неким случајевима до програмиране ћелијске смрти може доћи и касније, односно неколико дана након инфекције сунцокрета са *P. halstedii* (Radwan и сар., 2005). Radwan и сар., (2011) сугеришу да код генотипова који имају тип I отпорности долази до хиперсензитивног одговора који је праћен конститутивном експресијом TIR-NBS-LRR гена. Исти аутори су показали да између отпорне и осетљиве линије сунцокрета према проузроковачу пламењаче, нема значајније разлике у

погледу релативне акумулације транскрипата два TIR-NBS-LRR гена који су мапирани на LG1 и LG8.

У истраживању чији резултати су приказани у овој тези, извор гена за отпорност према патотипу пламењаче 730 била је линија Ha336 која има тип I отпорности. Резултати овог истраживања у погледу експресије гена кандидата за отпорност код отпорне и осетљиве линије сунцокрета након секундарне инфекције суспензијом спора *Plasmopara halstedii*, указују на конститутивну експресију овог гена. Ови резултати су у сагласности са резултатима (Radwan и сар., 2011) и (Franchel и сар., 2013).

Franchel и сар., (2013) су уочили експресију једног TIR-NBS-LRR гена за отпорност према патотипу 300 пламењаче. Овај ген је означен као TIR3 ген и нема хомолога места за везивање HaP3 прајмера. Ово указује да се ген за отпорност који је проучаван у овом раду разликују од раније објављених, што је у складу са опсежним проучавањем Radwan и сар., (2008) који указују на то да је *P16* регион на LG8 огроман и комплексан са много различитих функционалних гена за отпорност. Резултати добијени са Ha26R и Ha26S линијама сунцокрета указују да ген за отпорност проучаван у овом раду, има конститутивну експресију и у контролном и у третману инокулисаном суспензијом спора *P. halstedii*, и то код обе линије сунцокрета.

У отпорној линији Ha26R поред фрагмента који је конститутивно присутан код обе линије (~800bp), постоји још један додатни фрагмент који је исте величине, али му се секвенца разликује у неколико SNP-ова у односу на конститутивно присутан фрагмент. Претпоставља се да овај додатни фрагмент који је присутан само у отпорној линији Ha26R обезбеђује овој линији отпорност на патотип 730 пламењаче.

5.6. Експресија гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *P. halstedii*

Процеси који одређују исход интеракције између биљака и патогена су комплексни. Проучавање експресије гена у условима абиотичког и биотичког стреса од кључног је значаја за разумевање молекуларних механизма који су укључени у одговор биљака на стрес.

Анализом експресије гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *P. halstedii*, обухваћено је неколико категорија гена: гени за сигнализацију (HaEDS1 и HaEDR1), гени укључени у синтезу H₂O₂ (Насаох и Наохох), гени укључени у антиоксидативни одговор (HaSODc и HaSODp) и гени везани за одговор на патогене (Начи, PAL, HaPR5). Промене у експресији гена као одговор биљака на секундарну инфекцију суспензијом спора *Plasmopara halstedii* (патотип 730), испитиване су у временском интервалу 2-96h након инфекције, како би смо пратили рани одговор ових гена на инфекцију са узрочником пламењаче.

Препознавање абиотичког или биотичког стреса код биљака најчешће се дешава на нивоу мембране захваљујући присуству рецепторних протеина за које се везују сигнални молекули. Реакција биљака на стрес започиње везивањем сигналних молекула за рецепторе на нивоу мембрана. Затим долази до активације низа интрацелуларних сигналних реакција које преносе информацију о стресу кроз ћелију, након чега долази до повећане експресије одређених гена и синтезе протеина стреса. Резултати до којих су дошли Radwan и сар., (2005) показују да експресија гена HaEDS1 и HaEDR1 који су укључени у сигналне путеве, у временском интервалу 36h до 15 дана након примарне инфекције сунцокрета, није индукована инфекцијом патотипом 300 *P. halstedii*, како у отпорној тако ни у осетљивој линији сунцокрета. Резултати добијени у овом раду показују да секундарна инфекција суспензијом спора *P. halstedii* (патотип 730) доводи до експресије HaEDS1 гена код отпорне линије у интервалима 2 до 4h након инфекције. Након овог временског интервала, у инфицираном третману отпорне линије долази до драстичног смањења у експресији овог гена. На основу ових резултата закључили смо да до експресије овог гена (који је укључен у сигналне

путеве) и синтезе протеина стреса, долази само у раним фазама након секундарне инфекције сунцокрета са *P. halstedii*. У временском интервалу 24-96h након инфекције експресија HaEDS1 већа је у контролном него у инфицираном третману отпорне изогене линије, што нам указује на то да у каснијим фазама овај ген није индукован инфекцијом *P. halstedii*, што је у сагласности са резултатима аутора (Radwan и сар., 2005). Експресија гена HaEDR1 који је укључен у сигнализацију, није индукована након инфекције биљака проузроковачем пламењаче, ни у једном анализираном временском интервалу након инфекције, што је такође у сагласности са другим резултатима (Radwan и сар., 2005).

Производња реактивних једињења кисеоника (енг. Reactive Oxygen Species-ROS) и протеина који се активирају у биљкама у случају инфекције неким патогеном (Pathogenesis-related-proteins) су неке од молекуларних промена које се дешавају при хиперсензитивној реакцији биљака на стрес (Oliveira и сар., 2016). Често примећена појава у случају хиперсензитивне реакције је и повећана експресија гена који су важни у антиоксидативном одговору биљака на стрес.

У многим интеракцијама биљака и патогена производња водоник пероксида се дешава међу раним реакцијама. Поред директне антимицробне активности, H_2O_2 је сигнал који доводи до активације гена који су важни у одбрамбеном одговору биљака на стрес (Guidetti-Gonzalez и сар., 2007). Ну и сар., (2003) су показали да третман водоник пероксидом доводи до индукције експресије карбохидрат оксидазе (Насаох). Међутим, резултати Custers и сар., (2004) указују да експресија овог гена код сунцокрета такође може бити индукована гљивичним патогенима који су вероватно одговорни за стварање екстрацелуларног H_2O_2 . Аутори радова (Ну и сар., 2003; Custers и сар., 2004) сугеришу да оксалат оксидаза (Наохох) као и карбохидрат оксидаза (Насаох) такође могу имати важну улогу у производњи H_2O_2 који је битан у одбрамбеном одговору сунцокрета након биотичког или абиотичког стреса. Према резултатима добијеним у овом раду, висока конститутивна експресија транскрипта карбохидрат оксидазе (Насаох) примећена је до 24 h код отпорне линије. Дрastiчније смањење експресије код обе линије сунцокрета забележено је на 48 сати. Смањење експресије је нарочито изражено 72 и 96 сати након инфекције суспензијом спора *P. halstedii*. Добијени резултати показују да је експресија

оксалат оксидазе (Haохох) конститутивна и приближно 3 пута већа код отпорне линије сунцокрета у свим временским интервалима.

Повећана акумулација транскрипта, антиоксидативних ензима цитоплазматске супероксид дисмутазе (HaSODc) и пластидне супероксид дисмутазе (HaSODp) показују на повећани потенцијал за хиперсензитивну реакцију сунцокрета након инфекције узрочником пламењаче (*Herbette* и сар., 2003). Исти аутори су пронашли јако али пролазно повећање транскрипта HaSODc код отпорних биљака сунцокрета, 3-6 h после секундарне инфекције са *P. halstedii*. Резултати приказани у овој тези показују да је експресија HaSODc висока код отпорне линије сунцокрета у свим временским интервалима у оба третмана, док је у случају осетљиве линије експресија приближно два пута мања у односу на отпорну линију, са тенденцијом да се смањује са временом након инфекције. Слични трендови примећени су и у случају транскрипта HaSODp.

Као резултат хиперсензитивне реакције на месту инфекције са неким патогеном, у ткиву биљке домаћина долази до стварања некротичних лезија које су јасно одвојене од осталог здравог ткива. Ова рана ћелијска смрт често се наводи као одбрамбени механизам који инхибира развој патогена. Истовремено са почетком хиперсензитивног одговора, долази и до транскрипционе активације гена који кодирају ензиме за биосинтезу фитоалексина и лигнина. Многи од ових гена, као што су Pal (Mowton и сар., 1980) и хитиназа (Sahai и Monocha, 1993), кодирају ензиме укључене у синтезу продуката који успоравају или инхибирају инвазију патогена. Mazeurat и сар., (1999), су установили да су Pal и хитиназа добри маркери за отпорност у периоду до 72 сата након секундарне инфекције сунцокрета са *P. halstedii*.

Резултати приказани у овом раду указују да је експресија хитиназе која припада групи PR гена односно гена који се активирају у процесу патогенезе, већа приближно два пута у отпорној линији Ha26R. Највећа експресија забележена је у временским тачкама 2h, 4h и 24h након инфекције код отпорне линије. Слични резултати добијени су у раду Mazeurat и сар., (2003). Ови аутори су испитивали промене у експресији хитиназе (*chi*) и фенилаланин амонијум лиазе (Pal) након секундарне инфекције отпорне и осетљиве линије сунцокрета са два патотипа пламењаче (патотип 100 и 703). Промене у експресији ових гена праћене су у

интервалу 6-72 сата након секундарне инфекције. Њихови резултати показују да је у отпорној линији експресија ових гена знатно већа него у осетљивој линији сунцокрета и највећа је 24 и 48 сати након инфекције. Међутим, резултати приказани у овој тези показују да је експресија фенилаланин амонијум лиазе висока код обе испитиване линије сунцокрета и то у свим посматраним временским интервалима контролних биљака, као и биљака инфицираних проузроковачем пламењаче и не може се повезати са отпорношћу.

Протеини који се активирају у биљкама у случају инфекције неким патогеном (PR протеини) груписани су у 17 класа (PR-1 до PR-17) (Saboki и сар., 2011). PR-5 класа обухвата протеине који поседују антифунгална својства. Аутори Radwan и сар., (2004; 2005) су показали да је експресија PR-5 гена индукована од шестог дана након инфекције патотипом 300 *P. halstedii*, и код отпорне и код осетљиве линије сунцокрета. Релативна акумулација транскрипта HaPR5, повећава се и до 20 пута код линија сунцокрета које имају тип II отпорности према проузроковачу пламењаче (Radwan и сар., 2010; 2011). Линија сунцокрета коришћена у овом раду има типа I отпорности а највеће промене у експресији HaPR5 се бележе 2-4 h након инфекције. Експресија овог гена у оба третмана и код обе анализиране линије почиње од 24h након инфекције. У случају отпорне линије сунцокрета, експресија овог гена достиже свој максимум 96 h након инфекције. У овој временској тачки релативна акумулација транскрипта HaPR5 гена је чак више од 15 пута већа код отпорне инфициране линије него код осетљиве инфициране линије, што је у сагласности са резултатима до којих су дошли и аутори (Radwan и сар., 2010; 2011).

Анализом експресије гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *P. halstedii*, установљено је да је већина испитиваних гена имала конститутивну експресију која је израженија у отпорној линији сунцокрета и то нарочито у раним фазама након инфекције. Експресија HaEDS1, HaSODp, Hachi, Насаох и Наохох код отпорне линије је сукцесивно повећана у временском интервалу 4-48h након инфекције. Највећа квантитативна разлика у експресији гена између отпорне и осетљиве линије сунцокрета након инфекције суспензијом спора *P. halstedii*, је индукција експресије HaPR5 гена у раним фазама након инфекције код отпорне линије. Добијени резултати показују

да рани одговор биљака након секундарне инфекције узрочником пламењаче, одговара хиперсензитивном одговору.

Од свих испитиваних гена у одговору на инфекцију узрочником пламењаче само је ген *NaPR5* био индукован већ два сата после инфекције у линији сунцокрета која има и ген *Pl6*. Добијени резултати указују да је експресија гена *Pl6* комплексна, да постоји повезаност отпорности са експресијом гена *NaPR5* и да у том правцу треба наставити будућа истраживања у овој области. Посебно треба нагласити да резултати приказани у овом раду, односно добијени CAPS маркери имају и практичну примену у маркер асистираној селекцији за отпорност сунцокрета према пламењачи.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Наслеђивање гена за отпорност сунцокрета према патотипу 730 пламењаче испитивано је у три мапирајуће популације, које су се састојале од 73-75 F₃ фамилија сунцокрета, а настале су из почетног укрштања линија различитих по присуству *Pl* гена.

- Резултати теста отпорности након инфекције биљака F₃ фамилија свих испитиваних мапирајућих популација су показали да однос раздвајања отпорних и осетљивих F₃ фамилија одговара односу 3 : 1, чиме је потврђено да је отпорност на патотип пламењаче 730 контролисана једним геном.

- Наслеђивање RGA на *Pl6* локусу је испитивано на gDNK из F₃ фамилија истих мапирајућих популација применом три PCR прајмера (HaP1, HaP2 и HaP3) којима се умножило неколико хаплотипова. У свим мапирајућим популацијама ови доминантни хаплотипови су се раздвајали у односу 3:1, без обзира на родитељске линије које су биле извори *Pl* гена, чиме је на молекуларном нивоу потврђено да је отпорност на патотип пламењаче 730 контролисана једним геном. Након амплификације са прајмером HaP3 запажен је само један фрагмент који је присутан како код осетљиве тако и код отпорних родитељских линија. Дигестијом продуката PCR реакције рестрикционим ензимима добијени су CAPS хаплотипови (маркери) који су увек сегрегирани у односу 1:2:1, што указује да се ради о доминантно рецесивном типу наслеђивања. Добити CAPS маркери омогућавају разликовање хомозиготних од хетерозиготних отпорних биљака и могу се практично применити у асистираној селекцији за отпорност сунцокрета према патотипу 730 пламењаче.

- На основу резултата добијених у испитивању наслеђивања RGA конструисане су линкејд мапе *Pl6* локуса за све испитиване мапирајуће популације сунцокрета. Сви хаплотипови су лоцирани на *Pl6* локусу на удаљености ~5 до ~12 cM. Разлике примећене на испитиваним популацијама сунцокрета нису значајне, тако да се може закључити да су резултати мапирања конзистентни, без обзира на родитељске линије које су коришћене као извор *Pl* гена за отпорност.

•У популацији сунцокрета састављеној од рекомбинантних инбред линија примећена је појава нових хаплотипова, који се разликују од хаплотипова отпорне и осетљиве родитељске линије, што указује да се у *Pl6* гену јављају промене чак и у касним генерацијама самооплодне у току стварања биљака отпорних на пламењачу. Ипак, употреба једног доминантног и кододоминантних CAPS маркера обезбеђује ефикасну идентификацију биљака отпорних на патотип пламењаче 730, без обзира на родитељске линије које се у почетном укрштању користе као даваоци или примаоци *Pl* гена.

Да би се појаснила функција гена за отпорност према пламењачи испитиваног у овом раду, проучавана је експресија десет гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес. Брзе промене у одговору ових гена праћене су након секундарне инфекције.

•Резултати амплификације на cDNK испитиваних изогених линија са прајмером HaP3, указују да постоји конститутивна експресија гена за отпорност у обе испитиване линије. Резултати добијени након дигестије PCR производа указују да у отпорној линији сунцокрета Ha26R поред фрагмента који је конститутивно присутан код обе линије (~800bp), постоји још један додатни фрагмент који је исте величине, али му се секвенца разликује у неколико појединачних нуклеотида у односу на конститутивно присутан фрагмент. Претпоставља се да овај додатни фрагмент који је присутан само у отпорној линији Ha26R обезбеђује отпорност на патотип 730 пламењаче.

•Анализом експресије гена који су важни у одговору биљке на биотички стрес проузрокован инфекцијом гљивом *P. halstedii*, обухваћено је неколико категорија гена: гени за сигнализацију (HaEDS1 и HaEDR1), гени укључени у синтезу H₂O₂ (Hасаох и Наохох), гени укључени у антиоксидативни одговор (HaSODc и HaSODp) и гени везани за одговор на патогене (Hachi, PAL, HaPR5). Установљено је да је већина испитиваних гена имала конститутивну експресију која је израженија у отпорној линији сунцокрета и то нарочито у раним фазама након инфекције. Међутим шест гена је имало повећану експресију после секундарне инфекције. HaEDS1 сигнални ген је имао повећану експресију 2h након инфекције, што указује на активност салицилног пута сигнализације. У

истој тачки је повећана и експресија гена за одговор на патогене: хитиназе и гена NaPR5. Експресија осталих гена: NaSODp, Nasaoh и Naohoh се повећава од 4 до 48 h након инфекције у отпорној линији. Ови резултати указују да рани одговор на секундарну инфекцију код отпорних биљака одговара хиперсензитивној реакцији.

7. ЛИТЕРАТУРА

Аћимовић, М., 1998: Болести сунцокрета, Научни институт за ратарство и повртарство, Нови Сад, 13-77.

Bachlava, E., O. E. Radwan, G. Abratti, S. Tang, W. Gao, A. F. Heesacker, M. E. Bazzalo, A. Zambelli, A. J. Leon and S. J. Knapp, 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.

Baack, E. J., K. D. Whitney, L. H. Rieseberg, 2005: Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. *New Phy.*, 167, 623-630

Benc, A and O. Spring, 1995: Identification and characterization of an auxin-degrading enzyme in downy mildew infected sunflower. *Phys. and Mol. Plant Path.*, 46, 163-175.

Bent, A. F. 1996: Plant disease resistance gene-function meets structure. *Plant Cell*, 8, 1757-1771.

Bert, P. F., D. Tourvieille de Labrouhe, J. Philippon, S. Mouzeyar, I. Jouan, P. Nicolas and F. Vear 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.

Berry S. T., A. J. Leon, C. C. Hanfrey, P. Challis, A. Burkholz, S. Barnes, G. K. Rufener, M. Lee and P. D. S. Caligari 1995: Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 195-199.

Bouzidi, M. F., S. Badaoui, F. Cambon, F. Vear, D. Tourvieille de Labrouhe, P. Nicolas and S. Mouzeyar, 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.

Brahm, L., V. Hahn, T. Rocher and W. Friedt, 2000: Molecular markers as a tool in a breeding for resistance against sunflower downy mildew. In: Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, 12-15 June 2000, J43-J48.

Concetta de Pinto, M., F. Tommasi, L. De Gara, 2002: Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Phys.*, 130, 698-708.

Custers, J. H. H., S. J., Harrison, M. B., Sela-Buurlage, E., van Deventer, W., Lageweg, P. W., Howe, , P. J., van der Meijs, A. S., Ponstein, B. H., Simons, L. S. Melchers, and M. H., Stuiver, 2004: Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *The Plant Journal*, 39, 147-160.

Ćurčić, N. i D. Saftić Panković, 2011: Gajenje genetički otpornih biljaka prema bolestima u cilju zaštite životne sredine. Monografija, Educons Univerzitet, 1-102.

Dangl, J. L. and J. D. G. Jones, 2001: Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411, 826-833.

Delledonne, M., Y. Xia., R. A. Dixon, C. Lamb 1998: Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585-588.

Delmotte, F., X. Giresse, S. Richard-Cervera, J. M. Baya, F. Vear, J. Tourvieille, P. Walser, D. Tourvieille de Labrouhe 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.

de Romano, B. A., C. Romano, M. Bulos, E. Altieri, C. Sala, 2010: A new gene for resistance to downy mildew in sunflower. Proc. 8th European Sunflower Biotechnology Conference, Antalya, Turkey.141-146.

Desikan, R., S. A. H. Mackemess, J. T. Hancock, S. J. Neill, 2001: Regulation of Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*, 127, 159-172.

Doerge, R. 2002: Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Rev.*, 3, 43-52.

Duñle, C. M., V. Hahn, S. J. Knapp and E. Bauer 2004: *Pl_{Arg}* from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 1083-1086.

Ellis, J., P. Dodds and T. Pryor, 2000: Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 278-284.

Fernandez-Ocana, A., M. Chaki, F. Luque, M. V. Gomez-Rodriguez, A. Carreras, R. Valderrama, J. C. Begara-Morales, L. E. Hernandez, F. J. Corpas and J. B. Barroso, 2011: Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *J. Plant Physiol.*, 168, 1303-1308.

Ferreira, A., M. F., da Silva, E. da Costa, L. Silva and C. D. Cruz, 2006: Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.*, 29, 182-192.

Franchel, J., M. F. Bouzidi, G., Bronner, F. Vear, P. Nicolas and S. Mouzeyar, 2013: Positional cloning of a candidate gene for resistance to the sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii* race 300. *Theor. Appl. Genet.*, 126, 359-367.

Gascuel, Q., Y. Martinez, M. C. Boniface, F. Vear, M. Pichon and L. Godiard, 2015: The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Mol. Plant Pathol.*, 16, 109-122.

Gascuel, Q., A. Bordat, E. Sallet, N. Pouilly, S. Carrere, F. Roux and P. Vincourt, 2016: Effector Polymorphisms of the Sunflower Downy Mildew Pathogen *Plasmopara halstedii* and Their Use to Identify Pathotypes from Field Isolates. *PLOS ONE*, 11, 1-19.

Gebhardt, C., 1997: Plant genes for pathogen resistance – variation on a theme. *Trends Plant Sci.*, 2, 243-244.

Gedil, M. A., M. B. Slabaugh, S. Berry, R. Johnson, R. Michelmore, J. F. Miller, T. J. Gulya and S. J. Knapp, 2001: Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: Genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene. *Plant Genome*, 44, 205-212.

Gentzittel, L., F. Mouzeyar, S. Badaoui, E. Mestries, F. Vear, D. Tourvieille de Labrouhe, P. Nicolas 1998: Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 96, 519-525.

Gentzbittel, L., E. Mestries, S. Mouzeyar, F. Mazeyrat, S. Badaoui, F. Vear, D. Tourvieille de Labrouhe and P. Nicolas, 1999: A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. Theor. Appl. Genet., 99, 218-234.

Gomez-Vasquez, R., R. Day, H. Buschmann, S. Randles, J. R. Beeching and R. M. Cooper, 2004: Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. Annals of Bot., 94, 87-97.

Guidetti-Gonzalez, S., J., Freitas-Astúa, A. M. do Amaral, N. F. Martins, A. Mehta, M. S. Silva, and H. Carrer, 2007: Genes associated with hypersensitive response (HR) in the citrus EST database (CitEST). Genetics and Molecular Biology 30, 943-956.

Gulya, T., W. E. Sackston, F. Viranyi, S. Maširević and K. Y. Rashid, 1991a: New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. J. Phytopathol., 132, 302-311

Gulya, T. J., F. Viranyi, S. Maširević and K. Y. Rashid, 1991b: Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. Helia 14, 161-167.

Gulya, T. J., D. Tourvieille de Labrouhe, S. Maširević, A. Penaud, K. Y. Rashid and F. Viranyi, 1998: Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: Gulya T., Vear F. (eds) I. S. A. Symposium «Sunflower Downy Mildew». Fargo, USA, 13-14 January, 130-136.

Gulya, T. J., 2000: Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew and control through genetics and alternative fungicides. In: Proceedings of 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, G16-G21.

Gulya, T. J. 2007: Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. Proc 2nd International Downy Mildew Symposium "Advances in Downy Mildew Research", Olomouc, Czech Republic, 2-6 July 2007, 121-134.

Gulya, T. J., S. Markell, M. McMullen, B. Harveson and L. Osborne, 2011: New virulent races of downy mildew: distribution, status of DM resistant hybrids, and

USDA sources of resistance. In: Proceedings of 33th Sunflower Research Forum. Fargo ND <https://www.sunflowernsa.com/uploads/resources/575/gulyavirulentrescdownymildew.pdf>

Hammond-Kosack, K. E. and J. D. G. Jones, 1996: Resistance gene dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8, 1773-1791.

Herbette S., C. Lenne, D. Tourvieille de Labrouhe, J. R. Drevet and P. Roeckel-Drevet, 2003. Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPH families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiol. Plant.*, 119, 418-428.

Hermanns, M., A. J. Slusarenko and N. L. Schlaich, 2003: Organspecificity in a plant disease is determined independently of R gene signalling. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16, 752-759.

Hu, X., D. L. Bidney, N. Yalpani, J. P. Duvick, O. Crasta, O. Folkerts and G. Lu, 2003: Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.*, 133, 170-181.

Hu, J., J. Chen, T. J. Gulya and J. F. Miller, 2004: Trap markers for a sunflower downy mildew resistance gene from a new *Helianthus annuus* source, PI 468435. Proceedings of the 16th International Sunflower Conference, 29 August –2 September, Fargo, North Dakota, USA.

Jocić, S., D. Miladinović, I. Imerovski, A. Dimitrijević, S. Cvejić, N. Nagl and A. Kondić-Špika, 2012: Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower. *Helia*, 35(56), 61-72.

Kombrink, E. and E., Schmelzer, 2001: The Hypersensitive Response and its Role in Local and Systemic Disease Resistance. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107, 69-78.

Konieczny, A. and F. M. Ausubel, 1993: A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR based markers. *Plant J.* 4, 403-410.

Korell, M., L. Brahm, R. Horn and W. Fridt, 1996: Interspecific and intergeneric hybridisation in sunflower breeding. II: Specific uses of wild germplasms. *Plant Breeding Abstracts* 66, 1081-1091.

Körössi, K., B., Ban, B. Barna, and F. Viranyi, 2011: Biochemical and Molecular Changes in Downy Mildew-infected Sunflower Triggered by Resistance Inducers. *J. Phytopathol.*, 159, 471-478.

Kosambi, D. D., 1944: The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen.* 12, 172-175.

Lander, E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg, 1987: MAPMAKER: an interactive computer program for constructing genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.

Leclercq, P., 1969: Cytoplasmic male sterility in sunflower. *Ann. Amelior. Plantes.* 19, 99-106.

Leclercq, P., Y. Couderonand and M. Dauge, 1970: Selection pour la resistance au mildious du tournesol a partir d'hybrides Topinambour x Tournesol. *Ann. Amelior. Plantes.*, 20, 363-373.

Levine, A., R. I. Pennel, M. E. Alvarez, R. Palmer and C. C. Lamb, 1996: Calcium mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*, 6, 427-437.

Liu, Z., T. J. Gulya, G. J. Seiler, B. A. Vick and C. C. Jan, 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.

Ljubich, A. and T. Gulya, 1988: Cotyledon limited systemic downy mildew infection. *Sunflower forum*, Bismarck, USA, 9.

Маринковић, Р., Б. Дозет и Д. Васић, 2003: Оплемењивање сунцокрета (Монографија). Школска књига, Нови Сад.

Martin, G. B., 1999: Functional analysis of plant disease genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 273-279.

Mazeyrat, F., S. Mouzeyar, I. Courbou, S. Badaoui, P. Roeckel-Drevet, 1999: Accumulation of defense related transcripts in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) infected with *Plasmopara halstedii*. *European J. of Plant Path.*, 105, 333-340.

Маширевић, С. и С. Јаснић, 2006: Пламењача сунцокрета (*Plasmopara halstedii*). *Биљни лекар*, 34, 4-5, 315-319.

McCouch, S. R and R. W. Doerge, 1995: QTL mapping in rice. *Trends Genet.*, 11, 482-487.

McInture, C. L., R. E. Casu, J. Drenth, D. Knight, V. A. Whan, B. J. Croft, D. R. Jordan and J. M. Manners, 2005: Resistance gene analogues in sugarcane and

sorghum and their association with quantitative trait loci for rust resistance. *Genome*, 48, 391-400.

Meyers, B. C., A. W. Dickerman, R. W. Michelmore, S. Subramonijum, B. W. Sobral, N. D. Young and S. Sivaramakrishnan, 1999: Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding super family. *Plant J.*, 20, 317-332.

Michelmore, R. W., 2000: Genomic approaches to plant disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 125-131.

Michelmore, R. W., 2003: The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 397-404.

Miller, J. F. and T. J. Gulya, 1987: Inheritance of resistance to race 3 of downy mildew in sunflower. *Crop Sci.*, 27, 210-212.

Miller, J. F. and T. J. Gulya, 1988: Registration of six downy mildew resistant sunflower germplasm lines. *Crop. Sci.*, 30, 430-431.

Miller, J. F. and T. J. Gulya, 1991: Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower. *Crop Sci.*, 31, 40-43.

Miller, J. F., 1992: Update on inheritance of sunflower characteristics. 13th Internat. Sunflow. Confer., Pisa, Italy, 905-945.

Molinero-Ruiz, M. L., J. M. Melero-Vara and J. Dominguez, 2002: Inheritance of resistance to race 330 of *Plasmopara halstedii* in three sunflower lines. *Plant Breed.*, 121, 61-65.

Molinero-Ruiz, M. L., J. M. Molero-Vara and J. Dominguez, 2003: Inheritance of resistance to two races of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in two *Helianthus annuus* L. lines. *Euphytica*, 131, 47-51.

Morton N. E., 1956: The detection and estimation of linkage between the genes for elliptocytosis and the Rh blood type. *American journal of human genetics*, 8, 80-96.

Mouzeyar, S., D. Tourvieille de Labrouche and F. Vear, 1993: Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *J. of Phyt.*, 139, 289-297.

Mouzeyar, S., D. Tourvieille de Labrouche and F. Vear, 1994: Effect of host-race combination on resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). J. of Phyt., 141, 249-258.

Mouzeyar, S., P. Roeckel-Drevet, L. Gentzbittel, J. Phillipon, D. Tourville de Labrouche, F. Vear and P. Nicolas, 1995: RFLP and RAPD mapping of the sunflower Pl1 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1. Theor. Appl. Genet., 91, 733-737.

Mowton, M. A., R. A. Dixon and C. J. Lamb, 1980: Elicitor modulation of the turnover of L-phenylalanine ammonia lyase in French bean cell suspension cultures. Biochimica and Biophysica Acta, 633, 162-175.

Mulpuri, S., Z. Liu, J. Feng, T. J. Gulya and C. C. Jan, 2009: Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, *Pl13* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet., 119, 795-803.

Oliveira, M. D. M., C. M. R. Varanda and M. R. F. Félix, 2016: Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. Phytochem. Lett. 15: 152-158.

Panković, D., S. Jocić, N. Lačok, Z. Sakač and D. Škorić, 2004: The use of PCR-based markers in the evaluation of resistance to downy mildew in NS-breeding material. Helia, 27, 142-158.

Saftić-Panković D., S. Jocić S, N. Radovanović, D. Škorić, 2006: Inheritance of resistance to race 730 of *Plasmopara halstedii* in cultivated sunflower. Proceedings of the 7th European Conference on Sunflower Biotechnology, September 3-6, Gengenbach Germany, 6.

Permingeat, H. R., M. V. Romagnoli and R. H. Vallejos, 1998: A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. Plant Mol. Biol. Rep., 16, 1-6.

Prats, E., M. E. Bazzalo, A. Leon, and J. V. Jorin, 2006: Fungi toxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. Euphytica, 147, 451-460.

Pustovojt, G. V., 1975: Results of breeding sunflower for group immunity from main pathogens of this plant by means of interspecific hybridization. / Resultaty selektsii podsolnečnika na gruppovoj immunitet k osnovnym patogenam etoj kultury

metodom nezhvidovoj gibrizatsii. Trudy Vses. Obshchestva Genetikov I Seleksioner, 1, 64-81.

Pustovojt, G. V. and E. K. Krokhin, 1977: Inheritance of resistance in interspecific hybrids of sunflower to downy mildew. Skh. Biol. 12, 231-236.

Qi, L. L., Y. M. Long, C. C. Jan, G. J. Ma, T. J. Gulya, 2015: *Pl₁₇* is a novel gene independent of known downy mildew resistance genes in the cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet. 128, 757-767.

Qi, L. L., M. E. Foley, X. W. Cai, T. J. Gulya, 2016: Genetics and mapping of novel downy mildew resistance gene, *Pl₁₈*, introgressed from wild *Helianthus argophyllus* into cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet., 129, 741-752.

Radwan, O., M. F. Bouzidi, F. Vear, J. Philippon, D. Tourvieille de Labrouhe, P. Nicolas and S. Mouzeyar, 2003: Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the *Pl5/Pl8* locus for resistance to downy mildew in sunflower. Theor. Appl. Genet., 106, 1438-1446.

Radwan, O., M. F. Bouzidi, P. Nicolas and S. Mouzeyar, 2004: Development of PCR markers for the *Pl5/Pl8* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. Theor. Appl. Genet., 109, 176-185.

Radwan, O., S. Mouzeyar, P. Nicolas and M. F. Bouzidi, 2005: Induction of a sunflower CC-NBS-LRR resistance gene analogue during incompatible interaction with *Plasmopara halstedii*. J. of Exp. Bot., 56, 564-575.

Radwan, O., S. Gandhi, A. Heesacker, B. Whitaker, C. Taylor, A. Ploick, R. Kesseli, A. Kozik, R. W. Michelmore and S. J. Knapp, 2008: Genetic diversity and genomic distribution of homologues encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. Mol. Genet. Genomics, 280, 111-125.

Radwan, O., 2010: Isolation and Expression of an LBS-LRR Protein-encoding Resistance Gene Candidate that Segregates with a Rust Resistance Gene in Sunflower. J. Phytopathol., 158, 433-443.

Radwan, O., M. F. Bouzidi and S. Mouzeyar, 2011: Molecular characterization of two types of resistance in sunflower to *Plasmopara halstedii*, the causal agent of downy mildew. Phytopathology, 101, 970-979.

Rahim, M., C. C. Jan and T. J. Gulya, 2002: Inheritance of resistance to sunflower downy mildew races 1, 2 and 3 in cultivated sunflower. *Plant Breed.*, 121, 57-60.

Rieseberg, L. H., H. Chai, R. Chai, R. Chan and C. Spore 1993: Genomic map of a diploid hybrid species. *Heredity*, 70, 285-293.

Roeckel-Drevet, P., G. Gagne, S. Mouzeray, L. Gentzbittel, J. Philippon, P. Nicolas, D. Tourvieille de Labrouhe and F. Vear, 1996: Colocation of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) resistance genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 91, 225-228.

Roeckel-Drevet, P., J. Tourvieille, T. J. Gulya, G. Charmet, P. Nicolas and D. Tourvieille de Labrouhe, 2003: Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Can. J. Microbiol.*, 49, 492-502.

Saboki, E., K. Usha and B. Singh, 2011: Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, A. Méndez-Vilas (Ed.), 1043-1047.

Saftić-Panković, D., S. Veljović-Jovanović, M. Pucarević, N. Radovanović and A. Mijić, 2006: Phenolics compounds and peroxidases in sunflower near isogenic lines after downy mildew infection. *Helia*, 29, 33-42.

Sahai A. S. and M. S. Monocha 1993: Chitinases of fungi and plants; their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.*, 11, 317-338.

Sedlářová M., R. Pospíchalová, Z. Drábková Trojanová, T. Bartůšek, L. Slobodianová, A. Lebeda, 2016: First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from the Czech Republic – short communication. *Plant Protec. Sci.*, 52: doi: 10.17221/7/2016-PPS

Seiler, G. J., 1991: Registration of 13 downy mildew tolerant interspecific sunflower germplasm lines derived from wild annual species. *Crop Sci.*, 31, 1714-1716.

Slabaugh, M. B., J. K. Yu, S. Tang, A. Heesacker, X. Hu, G. Lu, D. Bidney, F. Han and S. J. Knapp, 2003: Haplotyping and mapping a large cluster of downy mildew resistance gene candidates in sunflower using multilocus intron fragment length polymorphisms. *Plant Biotech. J.*, 1, 167-185.

Spring, O., A. Benz and V. Faust, 1991: Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on the development and metabolism of sunflower. J. Plant Dis. Prot., 98, 597-604.

Staskawiez, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, J. G. Ellis and J. D. G. Jones, 1995: Molecular genetics of plant disease resistance. Science, 268, 661-667.

Škorić, D., 1992: Achievements and future directions of sunflower breeding. Field Crops Res., 30, 231-270.

Takahama, U. and T. Oniki, 2000: Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. J. Plant Res., 113, 301-309.

Tal, B. And D. J. Robeson, 1986 a: The metabolism of sunflower phytoalexins ayapin and scopoletin. Plant-fungus interaction. Plant Physiol., 82, 167-172.

Tal, B. and D. J., Robeson, 1986 b: The induction by fungal inoculation of ayapin and scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. Phytochem., 25, 77-79.

Tan, A. S., C. C. Jan and T. J. Gulya, 1992: Inheritance of resistance to race 4 of sunflower downy mildew in wild sunflower accessions. Crop Sci., 32, 949-952.

Tang, S., J. K. Yu, M. B. Slabaugh, D. K. Shintani and S. J. Knapp, 2002: Simple sequence repeat map of the sunflower genome. Theor. Appl. Genet., 105, 1124-1136.

Tourvieille de Labrouhe, D., M. Ducher, J. Philippon, C. Meliala and P. Walser, 2000a: Les methods d'analyse du mildiou. In: Le mildiou du tournesol, CETIOM, INRA, Paris, 53-56.

Tourvieille de Labrouhe, D., T. J. Gulya, S. Maširević, A. Penaud, K. Y. Rashid and F. Viranyi, 2000b: New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). Proc. 15th Inter. Sunflower Conf., Toulouse, France, 12-15 June, I61-I66.

Vear, F., L. Gentzbittel, J. Philippon, S. Mouzeyar, E. Mestries, P. Roeckel-Drevet, D. Tourvieille de Labrouhe and P. Nicolas, 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., D. Tourvieille de Labrouhe, S. Roche, M. C. Boniface, A. Bordat, and P. Vincourt, 2012: Genetic analysis of the sunflower downy mildew resistance gene *Pl2*. <http://www.asagir.org.ar/asagir> 2008/buscar_congreso_indice_4_1.asp

Virányi, F. and T. J. Gulya, 1996: Expression of resistance in the *Plasmopara halstedii*-sunflower pathosystem. Disease tolerance in sunflower. Beijing, China, 14-19.

Virányi F., T. J. Gulya, D. Tourvierille de Labrouhe, 2015: Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) populations from different continents. *Helia*, 38, 149–162.

Vranceanu, V. A. and F. Stoianescu, 1970: Immunity to sunflower downy mildew due to a single dominant gene. *Probl. Agric.*, 2, 34-40.

Vranceanu, V. A., N. Pirvu and F. M. Stoianescu, 1981: New sunflower downy mildew resistance genes and their management. *Helia*, 4, 23-27.

Wieckhorst, S., E. Bachlava, C. M. Dussle, S. Tang, W. Gao, C. Saski, S. J. Knapp, C. C. Schön, V. Hahn, E. Bauer 2010: Fine mapping of the sunflower resistance locus *Plarg* introduced from wild species *Helianthus argophyllus*. *Theor. Appl. Genet.*, 121, 1633-1644.

Yu, J. K., S. Tang, M. B. Slabaugh, A. Heesacker, G. Cole, M. Herring, J. Soper, F. Han, W.C. Chu, D. M. Webb, L. Thompson, K. J. Edwards, S. T. Berry, A. Leon, M. Gordona, C. Olungu, N. Maesand and S. J. Knapp, 2003: Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci.*, 43, 367-387.

Zimmer, D. E. and J. A. Hoes, 1978: Diseases. In: Sunflower science and technology. American Society of Agronomy, Madison, USA, 225-262.

Zimmer, D. E. and M. L. Kinman, 1972: Downy mildew resistance in cultivated sunflower and its inheritance. *Crop Sci.*, 12, 749-751.

Прилог 1.

Протокол за екстракцију ДНК (Permingeat и сар., 1998, Plant Molecular Biology Reporter 16, 1-6, модификовано)

Потребни раствори

Пуфер за екстракцију

100 mM Tris-HCl pH 8

20 mM EDTA

1,4 M NaCl

2% СТАВ

0,5 M глюкоза

ТЕ пуфер

100 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA

ТЕ пуфер разблажен

10 mM Tris-HCl pH 8

0,1 mM EDTA

-Хлороформ

-Изопропанол

-100% етанол

-3M CH₃COONa

1. Одмерити приближно 70 mg уситњеног биљног материјала у епруветицу (све радити у течном азоту)
2. Из течног азота узимати по један узорак, додати 1ml пуфера за екстракцију и брзо измешати на вортексу
3. Када је суспензија хомогена оставити у водено купатило на 60°C, 60 min уз повремено благо мешање
4. Додати 700 µl хлороформа, измешати инверзијом епруветице док се не направи емулзија

- 5.** Центрифугирати узорке 10 min на 10 000 rpm и 4°C
- 6.** После центрифугирања пребацити водену фазу у којој је ДНК у нову епруветицу, додати 0,8V хладног изопропанола и нежно мешати инверзијом епруветице 1-2 min на собној температури до преципитације нуклеинских киселина
- 7.** Оставити епруветице 30-60 min на -20°C, па центрифугирати 10 min на 10 000 rpm и 4°C
- 8.** Пипетом потпуно одвадити супернатант и тапкањем растворити ДНК у ТЕ пуферу. Потпуно растворити талог (ако треба грејати 5 min на 65°C).
- 9.** Преципитирати ДНК са 0,1V 3M натријум ацетата и 2V 100% етанола
- 10.** Оставити да преципитира на -20°C (1h), затим центрифугирати 10 min на 10 000 rpm
- 11.** Пипетом одвадити супернатант, кратко центрифугирати и пипетом отклонити остатке супернатанта
- 12.** Талог са ДНК просушити на собној температури (до 15 min)
- 13.** Растворити талог у разблаженом ТЕ пуферу (запремина пуфера зависи од количине ДНК)

Прилог 2.

Протокол за екстракцију РНК

(QIAQEN, Rneasy Mini Handbook, 52-55, модификовано)

1. Одмерити приближно 100 mg уситњеног биљног материјала у епруветицу (све радити у течном азоту)

2. Из течног азота узимати по један узорак, додати 450 μ l пуфера за екстракцију (RLT пуфер) и брзо измешати на вортексу.

3. Пренети лизат на QIAshredder колону која је постављена у 2ml колекциону тубу и центрифугирати 2 минута на 14 000 rpm. Пажљиво одвојити супернатант од талога који се створио у колекционој туби и пренети га у нову епруветицу.

4. Додати 0,5 V етанола (96-100%) и одмах измешати пипетом. Не центрифугирати.

5. Пренети узорак (најчешће око 650 μ l), укључујући преципитат (који се можда формирао) у RNeas-у колону која је постављена у 2ml колекциону тубу. Центрифугирати 15s на $\geq 10\ 000$ rpm. Из колекционе тубе одбацити све што је прошло кроз колону, а колекциону тубу поново користити и у следећем кораку (6).

6. Додати 700 μ l пуфра RW1 у RNeas-у колону и центрифугирати 15s на $\geq 10\ 000$ rpm да би се испрала мемрана RNeasy колоне. Из колекционе тубе одбацити све што је прошло кроз колону, а колекциону тубу поново користити и у следећем кораку (7).

7. Додати 500 μ l пуфра RPE у RNeasy колону и центрифугирати 15s на $\geq 10\ 000$ rpm да би се испрала мемрана RNeasy колоне. Из колекционе тубе одбацити све што је прошло кроз колону, а колекциону тубу поново користити и у следећем кораку.

8. Додати 500 μ l пуфра RPE у RNeasy колону и центрифугирати 2 min на $\geq 10\ 000$ rpm да би се испрала мемрана RNeasy колоне.

9. Пренети RNeasy колону у нову епруветицу од 1,5 ml. Додати 60 μ l Rnase free воде директно на мембрану RNeasy колоне. Затворити поклопац колоне и оставити да стоји десетак минута а затим центрифугирати 2 min на $\geq 10\ 000$ rpm. Одбацити RNeasy колону а екстраховану РНК чувати у замрзивачу на -70° C.

Биографија

Наташа Турчић је рођена 26. 10. 1977. године у Шапцу где је завршила Основну школу и Гимназију природно-математичког смера. Дипломирала је 2002. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Новом Саду, смер професор биологије-хемије. Постдипломске студије на Пољопривредном факултету у Новом Саду, смер Генетика и оплемењивање биљака, уписала је школске 2002/2003. године. Све испите предвиђене планом и програмом положила је са просечном оценом 9,14 и магистрала 2. 07. 2007. године.

Докторску дисертацију под насловом: „Наслеђивање и експресија гена укључених у отпорност сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) према пламењачи ” пријавила је 2010 године. Наставно-научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду, на својој VIII редовној седници одржаној 11. јуна 2010. године, позитивно се изјаснило о подобности пријављене теме за израду докторске дисертације.

У периоду 2005-2009. је радила у Лабораторији за молекуларне маркере и физиологију стреса, Института за ратарство и повртарство у Новом Саду. Од 2009. до јуна 2016. била је запослена као асистент на Факултету заштите животне средине, Универзитета Едуконс у Сремској Каменици.

Од јануара 2011. до јуна 2016. била је ангажована на пројекту Министарства науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије под називом „Модификације антиоксидативног метаболизма биљака са циљем повећања толеранције на абиотски стрес и идентификација нових биомаркера са применом у биоремедијацији и мониторингу деградираних станишта“ (ИИИ 43010). Учествовала је у реализацији два пројекта Покрајинског секретаријата за науку и технолошки развој, као и међународног пројекта у оквиру ИПА програма међурегионалне сарадње са Мађарском.

Члан је друштва за физиологију биљака Србије. Аутор је или коаутор више од 30 научних радова и саопштења публикованих у домаћим и међународним часописима.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Наташа Ђурчић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Наслеђивање и експресија гена укључених у отпорност сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) према пламењачи

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена 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 интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 27.07.2016.

Наташа Ђурчић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Наташа Ђурчић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Наслеђивање и експресија гена укључених у отпорност сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) према пламењачи

Ментор проф. др Светлана Радовић

Потписани Наташа Ђурчић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада 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 докторанда

У Београду, 27.07.2016.

Наташа Ђурчић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Наслеђивање и експресија гена укључених у отпорност сунцокрета (*Helianthus annuus* L.) према пламењачи

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 полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 27. 07.2016.

